



UNIVERSITE SIDI MOHAMED BEN ABDELLAH
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

Projet de Fin d'Etudes

Licence Sciences & Techniques
Sciences Biologiques Appliquées et Santé
(LST - SBAS)

**L'immunoréactivité de l'anticorps anti
HER2 dans les tumeurs gastriques**

Présenté par : Imane LAKHAL

Encadré par : Pr. Mohamed IRAQUI HOUSSAINI (FST Fès)

Pr. Sanae BENNIS (CHU Hassan II –Fès et FMP–Fès)

Soutenu le : 08 Juin 2017

Devant le jury composé de :

- Pr. Mohamed IRAQUI HOUSSAINI: Encadrant
- Pr. Sanae BENNIS: Encadrante
- Pr. Abdelali Tazi : Examineur

Stage effectué à : Faculté de médecine et de Pharmacie de Fès. Centre médical de recherche biomédicale et translationnelle.

Année universitaire 2016-2017



Dédicace

*À la plus belle créature que Dieu a créée sur terre,
À cette source de tendresse, de patience et de générosité,
À ma mère, que Dieu ait son âme.*

*A mon père, symbole de l'affection, qui m'a toujours
soutenu, accordé son amour et son attention.*

*A mes sœurs et mes frères pour leur dévouement et leur
encouragement.*

Aux membres de ma famille pour leur disponibilité.

A tous mes professeurs, pour leurs efforts et leurs conseils.

*A mes amis : lamiae, amal, aziz, radouan, walid et anas
pour leur aide et leur fidélité.*

*Veillez accepter ici le témoignage de ma gratitude si grande
qu'elle puisse être, ne sera jamais à la hauteur de votre
bienveillance et de votre dévouement.*

Remerciement

Au terme de cette étude, je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance à mes Professeurs de la Faculté, pour l'intérêt avec lequel ils ont entouré ce travail.

Aucun mot ne saurait exprimer ma très haute considération et ma grande admiration pour leur ardeur au travail.

*Je tiens à exprimer tout particulièrement mes sentiments de gratitude, de respect et surtout d'une très grande considération envers Mr. **Mohamed IRAQUI HOUSSAINI** pour leurs valeureuses et pertinentes remarques, et aussi pour leur soutien, leurs conseils et leur compréhension tout au long de la réalisation de ce travail.*

*J'adresse mes vifs et chaleureux remerciements à Madame **BENNIS Sanae**, chef du laboratoire de biologie cellulaire et moléculaire à la faculté de médecine et de pharmacie de Fès de m'avoir accueillie dans son équipe et d'avoir accepté de diriger ce travail. Je la remercie aussi pour sa patience, et surtout pour sa confiance, ses remarques et ses conseils, sa disponibilité et sa bienveillance.*

*Je remercie également le professeur Mr. **TAZI Abdelali** d'avoir accepté de juger ce travail.*

*Je souhaite remercier Mr. **MALICK ADAMOU DABAL** et Mr. **JEAN PAUL NSHIZIRUNGU**, pour toute l'aide qu'ils m'ont apportés.*

Mes remerciements, vont également à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Liste des figures

Figure 1 : Gastrectomie totale pour un volumineux cancer en « lobe d'oreille ».....	6
Figure 2.a: Adénocarcinome bien différencié tubulopapillaire de type intestinal.....	7
Figure 2.b: Adénocarcinome de type diffus : nombreuses cellules tumorales isolées en « bague à chaton ».....	7
Figure 3.a: Emplacement du gène HER2 sur le chromosome 17.....	8
Figure 3.b: Structure du récepteur HER2.....	8
Figure 4: Voie de signalisation du récepteur HER2.....	10
Figure 5: Amplification du gène et surexpression du récepteur HER2.....	11
Figure 6 : Principe de l'immunohistochimie.....	12
Figure 7: Examen macroscopique d'une pièce opératoire.....	16
Figure 8: Automate permettant l'inclusion des échantillons fixés dans la paraffine après déshydratation.....	17
Figure 9: Inclusion dans la paraffine.....	17
Figure 10: Technique histologique.....	18
Figure 11: Coupe du tissu étalé sur lame et coloré en hématoxyline-éosine-safran.....	19
Figure 12: Appareil d'immunohistochimie.....	19
Figure 13: Répartition des sujets inclus dans l'étude en fonction du sexe.....	22
Figure 14: Répartition des sujets inclus dans l'étude en fonction de l'âge.....	23
Figure 15: Répartition des sujets inclus dans l'étude selon le milieu d'origine.....	23
Figure 16: Pourcentage de l'expression de récepteur HER2 pour chaque score.....	24
Figure 17: Répartition des sujets inclus dans l'étude selon le score de HER2.....	24

Figure 18: Répartition des cas surexprimés selon le sexe.....25

Figure 19: Immunomarquage HER2 3+ dans un cancer gastrique.....25

Figure 20: Marquage membranaire faible et incomplet.....26

Figure 21: Absence de coloration ou coloration membranaire dans les cellules tumorales.....26

Liste des tableaux

Tableau 1 : Score pour l'évaluation du statut HER2 pour les cancers de l'estomac.....13

Liste des abréviations

ADK: Adénocarcinomes.

CHU: Centre hospitalier universitaire.

HAS: Haute Autorité de santé.

HER2: Human epidermal growth factor receptor 2.

HES: Hématoxyline / éosine /safran.

HIS: Hybridation in situ.

HP: Helicobacter pylori.

IARC: International Agency for Research on Cancer.

IHC : Immunohistochimie.

OMS: Organisation mondiale de la santé.

RMN: Résonance magnétique nucléaire.

Résumé

La surexpression du récepteur HER2 a été détectée dans plusieurs cancers, parmi ces cancers on trouve la tumeur gastrique. Notre étude a été portée sur 35 cas de tumeurs gastriques (24 hommes et 11 femmes) d'une moyenne d'âge de 55ans. Le but de ce travail est d'évaluer la surexpression de l'HER2 dans les adénocarcinomes gastriques avancés tout en comparant nos résultats avec ceux de la littérature.

Dans notre étude, les patients HER2 positifs sont les moins nombreux (14%). Ce sont les HER2 négatifs qui présentent un pourcentage élevé (86%). Les protéines HER2 interviennent dans la régulation de la croissance, la division et la différenciation cellulaire. Cependant, leur présence en excès à la surface des cellules tumorales donne à la maladie un caractère agressif. On a, en effet, constaté dans le cas des HER2 positifs une agressivité plus importante de la cellule tumorale, des rechutes plus rapides de la maladie, la survenue plus fréquente de métastases et une résistance de la tumeur aux thérapeutiques conventionnelles. Mais ces cancers, bien particuliers, peuvent bénéficier de traitement ciblé. D'où l'intérêt de rechercher le statut HER2 pour une meilleure prise en charge des patients. Dans ce sens, la technique immunohistochimique est d'une grande importance.

Cette étude a montré que l'utilisation de l'immunohistochimie aux pratiques cliniques courantes est essentielle. Elle permet une meilleure prise en charge des patients par une thérapie ciblée tout en évitant les effets toxiques inutiles découlant d'un traitement inefficace.

SOMMAIRE

INTRODUCTION	1
Etude bibliographique.....	1
I. GENERALITES SUR LES TUMEURS GASTRIQUES	2
1. Définition	2
2. Epidémiologie.....	2
3. Facteurs de risque	3
3.1 Facteurs environnementaux.....	3
3.2 Facteurs comportementaux	3
3.3 Facteurs génétiques	4
3.4 Les pathologies pré-cancéreuses.....	4
4. Carcinogenèse gastrique.....	5
5. Diagnostic	5
5.1. Clinique.....	5
5.2. Anatomopathologique	5
5.2.1 Les formes macroscopiques	6
5.2.2 Les formes microscopiques.....	6
II. GENERALITES SUR HER2	8
1. Structure du récepteur HER2	8
2. Fonctionnement du récepteur HER2.....	9
3. Surexpression du récepteur HER2	10
III. ROLE DE L'IMMUNOHISTOCHEMIE DANS LA DETERMINATION DU STATUT HER2	11
1. Principe de l'immunohistochimie.....	11
2. Détermination du statut HER2.....	12

MATERIEL ET METHODES -----	14
I. ETUDE HISTOLOGIQUE-----	15
1. La fixation-----	15
2. L'inclusion-----	16
3. Réalisation des coupes ou microtomie-----	18
4. La coloration-----	18
5. Montage des lames-----	19
II. ETUDE IMMUNOHISTOCHIMIQUE-----	19
RESULTATS ET DISCUSSION -----	21
I. RESULTATS-----	22
1. Etude descriptive-----	22
1.1 Répartition selon le sexe-----	22
1.2 Répartition selon l'âge-----	22
1.3 Répartition géographique-----	23
2. Résultats immunohistochimiques-----	23
2.1 Répartition selon le score de HER2-----	24
2.2 Observation microscopique des différents scores HER2-----	25
II. DISCUSSION-----	27
CONCLUSION -----	28
REFERENCES -----	30

INTRODUCTION

Le cancer de l'estomac est l'un des tumeurs les plus fréquentes, il occupe le 5ème rang des cancers dans le monde soit 8,4% de tous les cancers [1], Il se développe aux dépens des tissus de l'estomac. Bien que son incidence ait diminué depuis plusieurs années dans presque toutes les régions du monde, le cancer gastrique reste un problème de santé publique majeur à l'échelle mondiale.

Actuellement, grâce aux progrès réalisés en endoscopie et en imagerie médicale, le diagnostic du cancer de l'estomac peut être fait à des stades précoces permettant ainsi un traitement curatif et une amélioration de la survie. 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 thérapie ciblées, qui permet d'éviter des traitements inutiles et d'améliorer la qualité de vie des patients.

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 dont le poids moléculaire est de 185 kDa [2]. La détermination du statut de ce récepteur dans les tumeurs gastriques se fait par une étude immunohistochimique (IHC), puis par une technique d'hybridation in situ fluorescente (HIS). Cependant l'immunohistochimie est suffisante dans la majorité des cas pour sélectionner les patients qui vont bénéficier d'un traitement ciblé anti-HER2 [3]. Il s'agit du trastuzumab (HerceptinMC) qui est un anticorps monoclonal qui bloque la partie extracellulaire de HER2 [4], ce qui provoque une inhibition de la prolifération des cellules tumorales et une réduction significative de la mortalité.

L'objectif de notre travail consiste à :

- Rapporter les aspects anatomopathologiques des tumeurs gastriques.
- Déterminer le statut de HER2 par l'immunohistochimie.

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I. GENERALITES SUR LES TUMEURS GASTRIQUES

1. Définition

L'estomac fait partie du système digestif. Il se trouve entre l'œsophage et le duodénum et se compose de trois parties principales qui sont le fundus, le corps et l'antrum.

Le cancer de l'estomac est une maladie qui se développe à partir d'une cellule de l'estomac initialement normale qui se transforme et se multiplie de façon anarchique pour former une tumeur maligne. 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.

Les adénocarcinomes représentent 90% des cancers gastriques et sont des tumeurs qui se développent à partir de la muqueuse. Les autres tumeurs gastriques comprennent des tumeurs stromales, des tumeurs endocrines ou des lymphomes [5].

2. Epidémiologie

Le cancer gastrique est en diminution depuis 50 ans dans les pays occidentaux. Ceci peut s'expliquer par la diminution de la prévalence de l'infection à *Helicobacter pylori* en rapport avec l'amélioration des conditions de vie et d'hygiène, ainsi que par des modifications d'habitudes alimentaires et du recours accru aux antibiotiques [6]. Cependant, bien que leur incidence annuelle diminue, il demeure l'une des dix premières causes mondiales de mortalité liée au cancer [7], il représente la troisième cause de décès par cancer dans le monde après celui des poumons et du foie [8].

Dans le monde, l'Afrique représente une région à faible risque du cancer gastrique, l'Europe occidentale et l'Amérique du Nord sont des régions à risque moyen, L'Asie (plus de 40 % des cas pour la Chine), l'Amérique du Sud (Andes) et l'Europe de l'Est ont les plus hautes incidences. [7].

En Afrique, l'incidence en 2002 était estimée à 15/100000 habitants chez l'homme contre 8,5/100000 habitants chez la femme. Au Mali Le cancer gastrique a montré une augmentation de l'incidence par rapport aux autres pays d'Afrique, ainsi qu'une incidence plus augmentée en Afrique Sub saharienne par rapport à l'Afrique du nord [9].

Au Maroc, le cancer de l'estomac représente le deuxième cancer du tube digestif le plus fréquent dans la région de Fès-Boulemane où il constitue 7% de l'ensemble des cancers masculins et 5% de l'ensemble des cancers féminins. [10].

Le cancer gastrique survient rarement avant l'âge de 40 ans, l'incidence augmente rapidement au-delà avec un pic pendant la septième décennie [7]. Il touche plus fréquemment les hommes (ratio 2/1) [11], et constitue le 2^{ème} cancer chez l'homme et le 3^{ème} cancer chez la femme en Asie et à travers le monde [12, 13].

3. Facteurs de risque

Le cancer de l'estomac est associé à plusieurs facteurs de risque. De manière générale, le cancer évolue préférentiellement sur des lésions cellulaires préexistantes. Ces lésions peuvent être causées par l'âge, mais aussi par des facteurs environnementaux, des facteurs comportementaux, des prédispositions génétiques ou encore des antécédents médicaux ou familiaux.

3.1 Facteurs environnementaux

Helicobacter pylori est une bactérie présente dans l'estomac humain, Elle est classée par l'agence internationale de recherche des cancers (IARC) comme facteur carcinogène, avec un risque relatif de cancer gastrique de 2 à 6 fois plus élevé chez les patients infectés par l'HP par rapport à une population non infectée [5, 12].

La réaction inflammatoire entraînée par la présence de *Helicobacter pylori* est le point de départ commun de tous les processus de cancérogenèse gastrique [14, 15]. Cette bactérie serait responsable d'environ 80 % des cancers de l'estomac. Elle est acquise dans l'enfance, et colonise la muqueuse gastrique et peut entraîner une gastrite chronique qui à son tour peut favoriser le développement d'un cancer. Environ 1 % des personnes infectées développeront un cancer de l'estomac.

3.2 Facteurs comportementaux

L'alimentation : Un des facteurs alimentaires les plus étudiés par ailleurs est le régime salé. Une étude écologique japonaise a suggéré une corrélation presque linéaire entre le taux de mortalité cumulée du cancer de l'estomac et le niveau médian d'excrétion de sel d'urine après 24h [16, 17].

La consommation de sel en grande quantité augmente le risque de gastrite atrophique et de métaplasie intestinale [18]. Des études expérimentales indiquent que le sel facilite la colonisation par *H. pylori* chez la souris [19], et induit des modifications de l'épithélium gastrique, le rendant plus susceptible aux carcinogènes.

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 [7].

Le tabagisme : a été considéré également comme facteur de risque de cancer gastrique, il était classé par l'IARC comme carcinogène du groupe 1 au niveau gastrique, plusieurs études coréennes ont montré une association entre la durée du tabagisme et l'incidence et la mortalité liée au cancer gastrique [20, 21, 22].

3.3 Facteurs génétiques

La prédisposition génétique est considérée comme étant un facteur de développement du cancer de l'estomac dans 5 à 10 % des cas. Par exemple, le fait d'être du groupe sanguin A, [23] peut augmenter de 10 % à 20 % le risque de développer un cancer gastrique, alors qu'un antécédent familial de cancer gastrique chez un parent de premier degré le multiplie par 2 par rapport à la population générale [24].

D'autres facteurs, plus étudiés, peuvent être cités :

- **Le syndrome de Lynch**

Les patients atteints de syndrome de Lynch qui présentent des mutations sur certains gènes (MLH1, MSH2, MSH6 et PMS2) de réparation de l'acide désoxyribonucléique (ADN), ont un risque de développer un cancer gastrique [25], qui est estimé à 20 % [26].

- **Le cancer gastrique diffus héréditaire**

Selon la Haute Autorité de santé (HAS), 1 à 3 % des cancers gastriques seraient héréditaires. Le cancer gastrique diffus héréditaire se caractérise par une transmission autosomique dominante du gène CDHI muté [27]. Ce gène code pour la protéine E-Cadhérine impliquée dans le processus d'adhésion intercellulaire. Il a été suggéré qu'une diminution de 50 % de la fonction normale de cette protéine (E-Cadhérine) déclencherait la carcinogenèse [28].

3.4 Les pathologies pré-cancéreuses

Certaines pathologies telles que la gastrite chronique atrophique, la dysplasie gastrique qui est considérée comme une altération morphologique qui précède la plupart des cancers de l'estomac, l'ulcère chronique de l'estomac, la gastrite hypertrophique de Ménétrier, la maladie de Biermer (gastrite atrophique auto-immune), les polypes adénomateux et une gastrectomie partielle, ont un risque de se dégénérer en un cancer gastrique [29].

4. Carcinogénèse gastrique

Une gastrite chronique ancienne, liée à une infection à *Helicobacter pylori*, à une maladie de Biermer, voire à une diète trop riche en sel, pourrait déterminer l'apparition d'une gastrite atrophique chronique avec métaplasie intestinale.

L'inflammation chronique déterminerait également une destruction cellulaire épithéliale d'où une augmentation de la production de radicaux libres, et une accélération du renouvellement cellulaire qui augmente le risque d'altération d'ADN.

Après l'inflammation, la muqueuse va passer au stade d'atrophie, de métaplasie intestinale, de dysplasie pour arriver au stade de cancer gastrique [30, 31].

5. Diagnostic

5.1. Clinique

Les cancers de l'estomac sont le plus souvent diagnostiqués chez des patients symptomatiques, présentant des formes évoluées. Les tumeurs débutantes sont habituellement asymptomatiques et rarement détectées en dehors d'un dépistage ciblé.

Une perte de poids et des douleurs abdominales représentent les symptômes les plus fréquents lors du diagnostic initial [7]. Une hémorragie digestive, des vomissements, une masse palpable, des brûlures d'estomac, une nausée et d'autres complications, peut diriger le médecin à prescrire des examens afin de vérifier la présence d'un cancer de l'estomac ou d'autres problèmes de santé.

De nombreux examens permettant de poser un diagnostic de cancer sont également employés : une endoscopie oeso-gastroduodénale associée à des biopsies [32], un dosage des marqueurs tumoraux (ex : HER2 qui peut favoriser la croissance d'une tumeur en cas d'une surexpression), une échoendoscopie, une résonance magnétique nucléaire (RMN) et d'autres.

5.2. Anatomopathologique

Elle joue un rôle diagnostique par l'examen des prélèvements biopsiques et un rôle pronostique par la détermination du degré de l'extension tumorale sur la pièce opératoire, elle permet aussi la différenciation entre les tumeurs bénignes et malignes et la stadification des tumeurs.

5.2.1 Les formes macroscopiques

Les formes macroscopiques correspondent aux différents aspects endoscopiques. Trois modes de développement sont possibles : bourgeonnement, infiltration ou ulcération.

Assez rarement, l'un d'eux prédomine pour donner naissance à:

- Des tumeurs végétantes polypoïdes ulcérées en surface,
- Des tumeurs infiltrantes comme les linites plastiques lorsque tout l'estomac est rétracté à paroi rigide épaisse et indilatable et ayant une couleur blanche,
- Des tumeurs ulcérimorphes qui présentent une ulcération avec des contours irréguliers [29].

Dans la plupart des cas, les trois aspects macroscopiques sont associés pour donner le cancer en « lobe d'oreille »; c'est une vaste ulcération à fond bourgeonnant creusée dans une masse infiltrante et entourée d'un bourrelet irrégulier (figure 1).

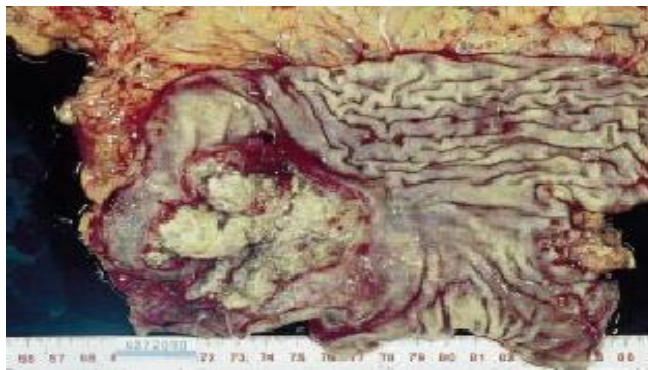


Figure 1: Gastrectomie totale pour un volumineux cancer en « lobe d'oreille» [29].

5.2.2 Les formes microscopiques

D'une façon générale, l'adénocarcinome gastrique est constitué de structures tubulaires, acinaires ou papillaires, tapissées de cellules de type gastrique ou intestinal.

De nombreuses classifications ont été proposées, basées soit sur des critères purement histocytologiques descriptifs, soit sur des critères de mode d'extension, donc d'évolutivité :

Classification de l'OMS

La classification de l'Organisation mondiale de la santé (OMS) décrit quatre types histologiques avec un degré de différenciation bien, moyen, peu différencié [33]. On distingue :

- . **L'adénocarcinome papillaire** : composé de saillies épithéliales digitiformes avec axes fibreux ;
- . **L'adénocarcinome tubulé** : composé de tubules dilatés et de ramifications de diamètre variable;
- . **L'adénocarcinome mucineux** : composé de cellules épithéliales malignes qui apparaissent en petits groupes flottant au sein de lacs de mucus.
- . **L'adénocarcinome à cellules indépendantes** : composé de cellules en bague à chaton caractérisées par une centrale optiquement claire et une gouttelette de la mucine cytoplasmique avec un noyau excentré.

Classification de Lauren

Elle inclut à la fois des critères histologiques et architecturaux et des critères de mode d'extension [34, 35]. Trois formes sont distinguées :

- . **La forme intestinale** : présente la structure d'un adénocarcinome tubulé ou papillaire à architecture compacte, bien limité en périphérie avec des cellules tumorales bien différenciées formant des structures glandulaires.
- . **La forme diffuse** : est surtout faite de cellules indépendantes peu différenciées mucosécrétantes ; elle est mal limitée et son pronostic est plus mauvais.
- . **La forme mixte** : rassemble les cas inclassables dans les deux précédentes (figure 2).

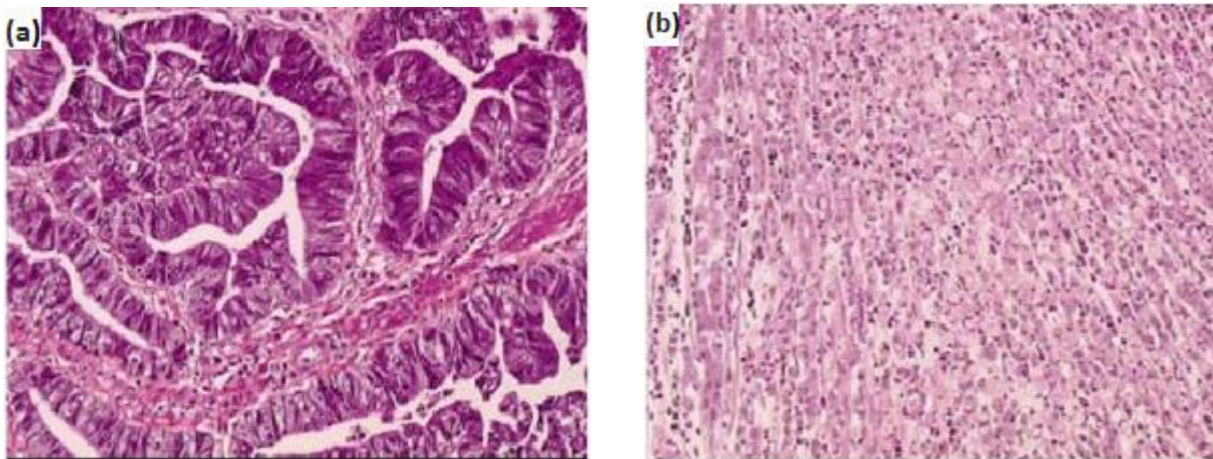


Figure 2: (a) Adénocarcinome bien différencié tubulopapillaire de type intestinal.

(b) Adénocarcinome de type diffus : nombreuses cellules tumorales isolées en « bague à chaton » [29].

II. GENERALITES SUR HER2

1. Structure du récepteur HER2

La protéine HER2 ou Human Epidermal Growth Factor Receptor-2 est une glycoprotéine membranaire constituée de 1255 acides aminés dont le poids moléculaire est de 185 kDa, elle est codée par un proto-oncogène appelé HER2/neu, localisé au niveau du chromosome 17 (chromosome 17q21) (figure 3.a) [36].

La protéine de surface HER2 qui est un récepteur membranaire à activité tyrosine kinase, transmet les signaux de croissance de l'extérieur vers l'intérieur de la cellule et intervient dans la régulation de la croissance, la division et la différenciation cellulaire.

Ce récepteur appartient à la famille HER, qui code quatre récepteurs transmembranaires appelés HER1, HER2, HER3 et HER4 et il est composé d'un domaine tyrosine kinase intracellulaire et présente une homologie avec les autres membres de la famille des récepteurs à 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). Les sous unités I et III du domaine extracellulaire sont des sites de fixation du ligand. Les sous unités II et IV sont des domaines riches en cystéine permettant l'interaction entre les monomères. Le domaine C-terminal est riche en résidus tyrosine qui correspondent aux sites de phosphorylation (figure 3.b) [37].

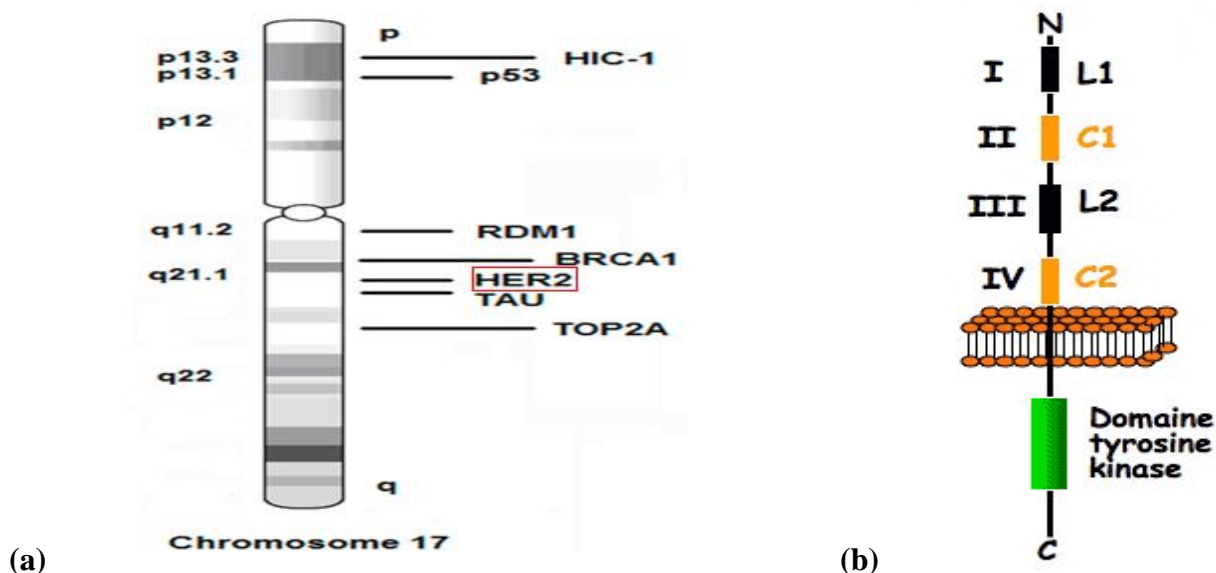


Figure 3 : (a) Emplacement du gène HER2 sur le chromosome 17 [57].

(b) Structure du récepteur HER2 [58].

2. Fonctionnement du récepteur HER2

Pour être actif, HER2 doit s'homodimériser ou s'hétérodimériser avec les autres récepteurs de sa famille. Le récepteur HER2 est en configuration ouverte avec un domaine extracellulaire fixe et ressemble à celle de l'état activé par le ligand [38, 39], alors que les autres récepteurs en absence de ligand sont en configuration fermée. La configuration fermée est caractérisée par des contacts étroits entre les domaines II et IV, et la configuration ouverte par des contacts étroits entre les domaines I et III. La configuration ouverte est plus favorable à la dimérisation via les boucles des domaines II et IV. Ce qui peut expliquer l'absence d'affinité de HER2 pour un ligand par sa structure ouverte car il ne requiert pas la fixation de ligand pour relâcher la conformation fermée. D'autre part, Graus-Porta et collaborateurs ont montré que HER2 était le partenaire privilégié pour la formation des hétérodimères [40]. 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.

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 (figure 4) [41].

Cette activation entraîne des actions variées sur le processus de cancérisation: augmentation de la division cellulaire, de l'angiogenèse, de la diffusion métastatique, inhibition de l'apoptose [42, 43].

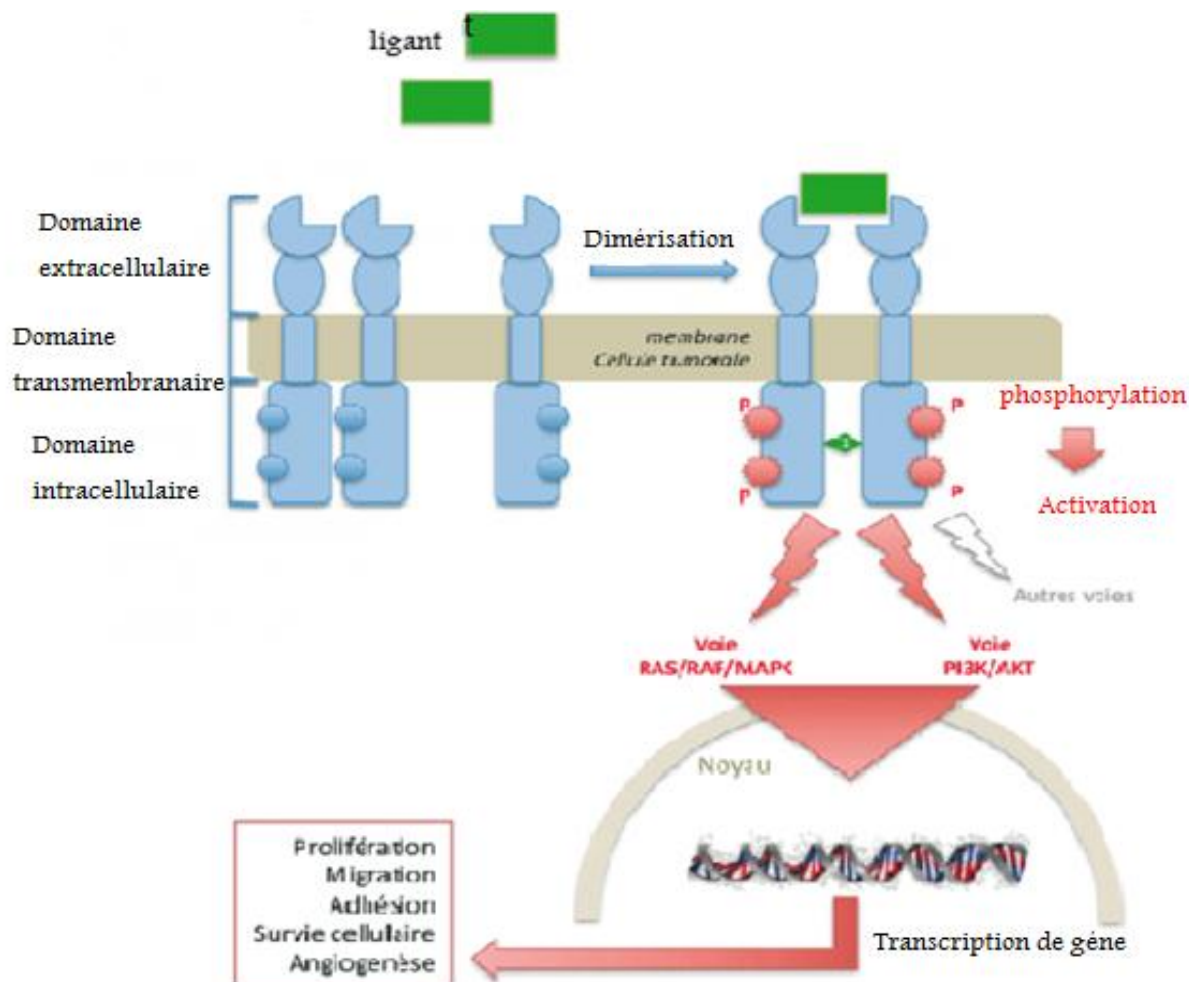


Figure 4 : Voie de signalisation du récepteur HER2 [59].

3. Surexpression du récepteur HER2

Les récepteurs HER2 ont été les premiers récepteurs membranaires clairement impliqués dans la genèse de beaucoup de cancers notamment les tumeurs solides par différents mécanismes.

La surexpression d'HER2 est rencontrée dans les cancers de l'estomac [44] dans 10 à 30% des cas [45,46]. Les mutations d'HER2 sont rares dans ces cancers et sa surexpression semble être le mécanisme principal par lequel HER2 promeut l'oncogenèse [47]. Le mode d'activation d'HER2 passe dans 95 à 98% par un phénomène d'amplification génique suivi d'une surexpression importante, cette surexpression aboutit à une activation continue des récepteurs HER2, ce qui induit le maintien de son activation, de la persistance des signaux de croissance vers le noyau en stimulant la croissance cellulaire. Ces tumeurs sont dites alors "HER2+" (Figure 5).

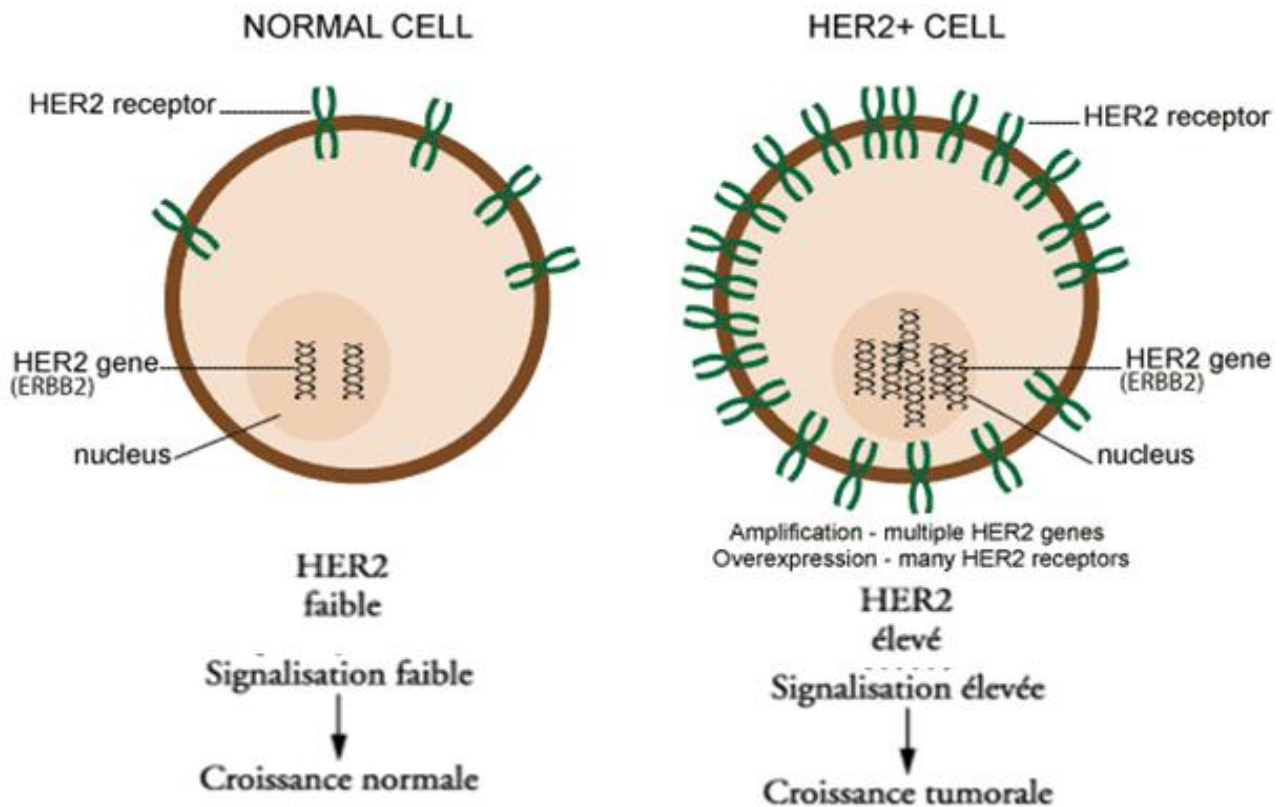


Figure 5: Amplification du gène HER2 et surexpression de récepteurs [60].

III. RÔLE DE L'IMMUNOHISTOCHEMIE DANS LA DÉTERMINATION DU STATUT HER2

1. Principe de l'immunohistochimie

L'immunohistochimie est une méthode qui permet de mettre en évidence certaines protéines cellulaires qu'elles soient cytoplasmiques, nucléaires ou membranaires (par exemple HER2), spécifiques à un type ou à une fonction cellulaire, par des anticorps (immunoglobulines) dirigés de façon spécifique contre ces antigènes, et rendus visibles au microscope par conjugaison avec des fluorochromes ou des enzymes donnant un signal coloré (figure 6) [48].

L'utilisation de l'immunohistochimie permet de faire des progrès considérables, en particulier dans le diagnostic des maladies cancéreuses en général [49].

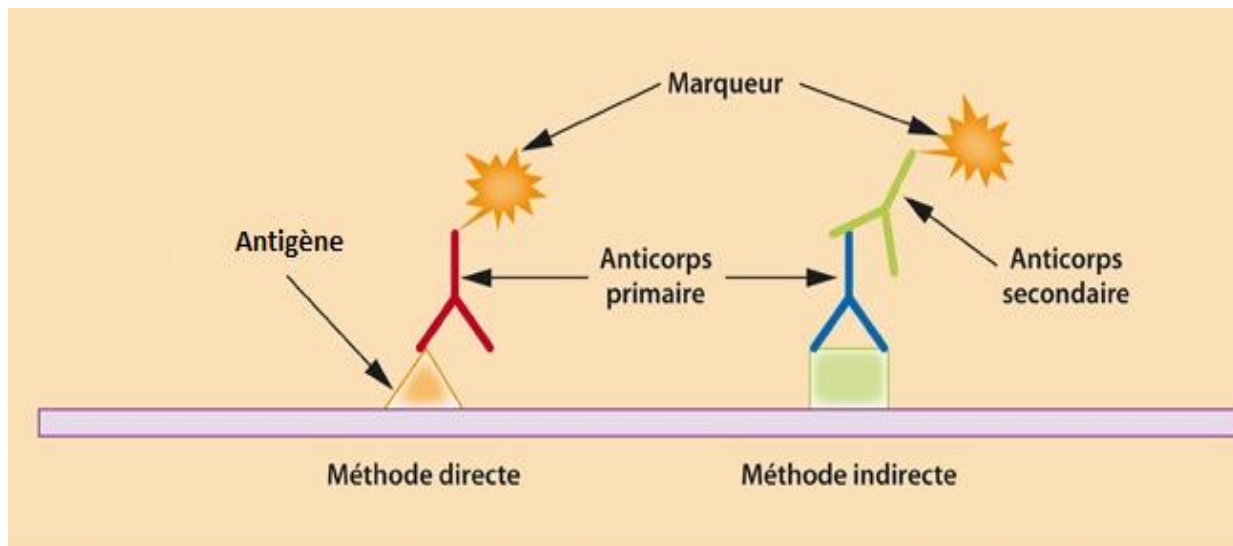


Figure 6: Principe de l'immunohistochimie [61].

2. Détermination du statut HER2

La détermination du statut HER2 est devenue de plus en plus importante. En outre, la sélection des patients pour une thérapie par le Trastuzumab repose sur la surexpression de cette protéine [50].

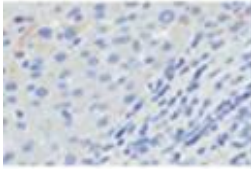
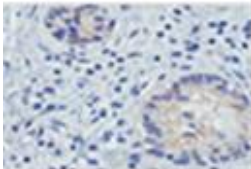
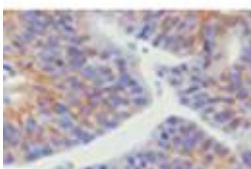
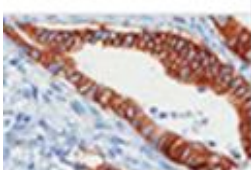
La détermination du statut HER2 pour les patients atteints de cancers gastriques se fait par IHC dans environ 90 % des cas, seuls les cas ambigus sont vérifiés par une technique d'Hybridation in situ fluorescente [51]. Le test est réalisé sur la tumeur primitive (pièce opératoire ou biopsies). Le score de l'IHC est basé sur l'intensité du marquage membranaire et sur le pourcentage de cellules marquées. Pour évaluer de façon reproductible l'intensité du marquage par IHC on doit prendre en compte le degré du grossissement microscopique (X) auquel le marquage membranaire est clairement visible, avec un seuil de 10 % de cellules marquées pour les pièces opératoires et le marquage d'au moins 5 cellules adjacentes cohésives pour les biopsies (tableau 1), soit :

- Grossissement faible (2,5 à 5 ×) : marquage complet baso-latéral et intense = score 3+ ;
- Grossissement intermédiaire (10 à 20 ×) : intensité moyenne ou faible = score 2+ ;
- Grossissement fort (40 ×) :
 - marquage membranaire peu intense, partiel = score 1+ ;
 - aucun marquage = score 0.

Les cas ambigus ou score 2+ seront testés par une technique d'HIS, à la recherche d'une éventuelle amplification du gène HER2 [51, 52].

Les patients présentant des tumeurs avec une expression membranaire intense et complète supérieure à 10 % des cellules tumorales (score dit “3+”) et/ou FISH “positives” peuvent bénéficier d’un traitement par le Trastuzumab. Les patients dont les tumeurs présentent un immunomarquage membranaire de plus de 10 % des cellules tumorales, mais avec une intensité modérée (score dit “2+”), peuvent également en bénéficier à condition qu’un statut complémentaire FISH “positif” soit objectif.

Tableau 1 : Score pour l’évaluation du statut HER2 pour les cancers de l’estomac [62].

	Score IHC	Profil de marquage (pièces opératoires)	Profil de marquage (biopsies)	Surexpression de HER2
	0	Pas de marquage ou marquage dans moins de 10 % des cellules tumorales (identifiable au grossissement X40)	Absence de réactivité dans l’ensemble des cellules tumorales	Négative
	1+	Marquage à peine visible dans plus de 10 % des cellules tumorales ; les cellules ne sont marquées que sur une partie de leur membrane (identifiable au grossissement X40)	Marquage à peine visible dans un amas de cellules tumorales cohésives adjacentes	Négative
	2+	Marquage membranaire complet, basolatéral ou latéral, d’intensité faible à modérée dans plus de 10 % des cellules tumorales (identifiable au grossissement X10-20)	Marquage membranaire complet, basolatéral ou latéral, d’intensité faible à modérée dans un amas de cellules tumorales cohésives adjacentes	Équivoque
	3+	Marquage membranaire complet, basolatéral ou latéral, d’intensité modérée à intense dans plus de 10 % des cellules tumorales (identifiable au grossissement X2, 5-5)	Marquage membranaire complet, basolatéral ou latéral, d’intensité modérée à intense dans un amas de cellules tumorales cohésives adjacentes	Positive

MATERIEL ET **METHODES**

I. ETUDE HISTOLOGIQUE

Le matériel biologique correspond à des biopsies prélevées chez les patients admis au service d'hépatogastro-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 :

1. La fixation

C'est une étape essentielle dans la préparation tissulaire. Son but est d'empêcher l'hydrolyse et la digestion enzymatique des protéines, d'éviter la putréfaction des tissus par les microorganismes, immobiliser les tissus in-situ, et garantir la conservation des structures et le durcissement des pièces, afin de garder le prélèvement dans un état aussi proche que possible de l'état vivant.

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 de tissu à fixer 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 incubés dans des cassettes susceptibles de subir une inclusion dans la paraffine (figure 7).

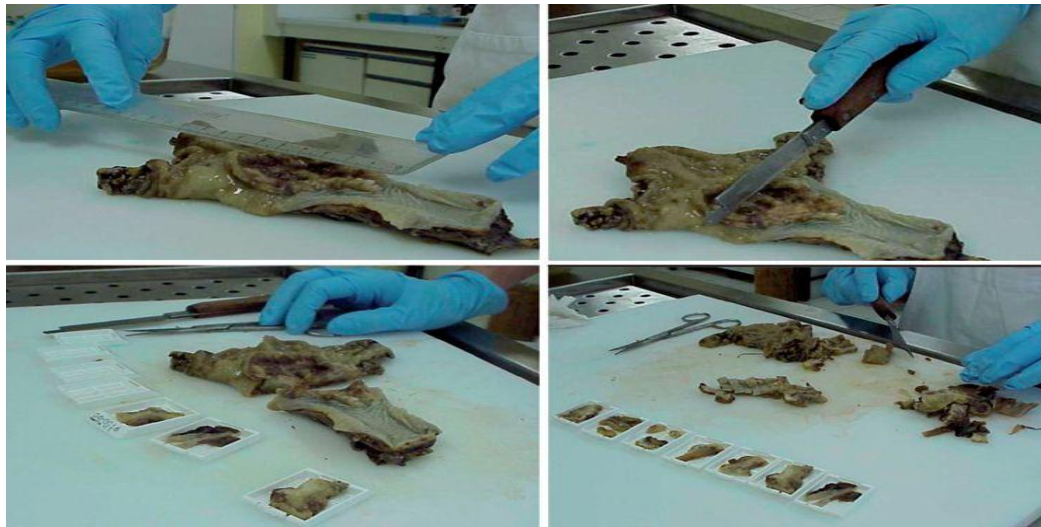


Figure 7: Examen macroscopique d'une pièce opératoire [63].

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 permettant d'obtenir des coupes minces au microtome. C'est le principe de l'inclusion.

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 qui est une substance liquide à chaud, solide à température ambiante et insoluble dans l'eau et dans l'alcool.

Pour réaliser cette étape, un automate d'inclusion est utilisé (Figure 8).

Cet automate peut se charger de toutes les phases conduisant à la mise à disposition d'un bloc de paraffine prêt à être coupé au microtome.

- **La déshydratation** : Elle consiste à retirer l'eau du tissu et à le 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% (1h x 3, 1h30 et 2h)
- **Eclaircissement** : Cette étape est destinée à remplacer l'alcool par un solvant de la paraffine. En remplaçant l'agent déshydratant, le toluène rend le tissu transparent d'où le nom d'éclaircissement. Cette opération se déroule dans 3 bains de Toluène (1h, 1h30 et 2h).
- **Enrobage dans la paraffine** : c'est l'étape terminale de la circulation, réalisée par passage du tissu dans 2 bains de paraffine liquide (2h et 3h).



Figure 8: Automate permettant l'inclusion des échantillons fixés dans la paraffine après déshydratation [64].

L'étape finale de l'inclusion est manuelle et consiste à réorienter convenablement le fragment tissulaire dans le sens de la coupe dans un moule de paraffine (Figure 9).



Figure 9: Inclusion dans la paraffine [65].

3. Réalisation des coupes ou microtomie

Le bloc solide de paraffine contenant le tissu, est coupé grâce à un microtome, les coupes de 3 à 5 μm d'épaisseur sont immergées dans des bains d'alcool, puis étalées en les dépliant sur la lame par flottation à la surface d'un bain chaud (figure 10).



Figure 10: Technique histologique [66].

A : Coupe par microtome. **B :** Etalement sur des lames.

4. La coloration

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

- **Le déparaffinage :**

Cette étape consiste à enlever la paraffine du tissu afin de permettre la pénétration des colorants. Les lames sont incubées à 60°C pendant une nuit pour faire fondre la paraffine.

- **L'hydratation :**

Elle a pour objet 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 assurant la réhydratation finale. Après réhydratation, la coupe est colorée.

La coloration histologique permet de différencier finement tous les éléments d'un tissu. Elle consiste à accentuer les contrastes pour mieux reconnaître les différents éléments de la préparation.

La coloration utilisée est de type H.E.S (hématoxyline-éosine safran). L'hématoxyline colore le noyau en violet, l'éosine colore le cytoplasme en rose, et le safran colore les fibres de collagène en jaune.

5. Montage des lames

Le montage permet une protection mécanique des coupes, ainsi qu'une protection chimique des colorants. Des lamelles de verres sont fixées à l'aide d'un milieu de montage sur la coupe tissulaire. La lame colorée est ensuite transmise au médecin anatomopathologiste pour identifier une zone contenant plus de 50% de cellules tumorales (figure 11).



Figure 11: Coupe du tissu étalé sur lame et coloré en hématoxyline-éosine-safran [67].

II. ETUDE IMMUNOHISTOCHIMIQUE

La technique immunohistochimique mesure la surexpression de la protéine HER2 soit par automate qui se charge d'effectuer toutes les étapes nécessaires à la réalisation de l'IHC, et permet ainsi de gagner du temps et de commettre moins d'erreurs lors de la technique (figure12), soit par technique manuelle.



Figure12 : Appareil d'immunohistochimie [68].

- **Protocole expérimental de l'immunohistochimie manuelle**

La première étape pour la préparation des lames commence par le déparaffinage. Cette étape consiste à incuber les lames à l'étuve pendant une nuit à 60°C. Les lames sont ensuite déparaffinées complètement grâce à leurs immersions d'abord dans deux bains de toluène (5 à 10 mn pour chaque bain), ensuite dans deux bains d'alcool absolu (5 à 10 mn pour chaque bain). Les lames sont par la suite rincées à l'eau courante pendant 10 minutes.

Les lames sont égouttées, puis passées dans du peroxyde d'Hydrogène (H₂O₂) à 3% pendant 10 minutes afin de bloquer les peroxydases endogènes qui peuvent provoquer des réactions non spécifiques. Les lames sont rincées à l'eau courante pendant 10 minutes. Après cette étape, un démasquage antigénique qui consiste à immerger les lames dans du tampon citrate bouillant (95°C, pH=6) pendant 45 minutes est réalisé. Les lames sont cette fois-ci rincées avec du PBS (solution de lavage) pendant 5 minutes. Elles sont par la suite égouttées puis entourées par le PAP-PEN. Une à deux gouttes du bloquant est ensuite déposé sur le fragment et les lames sont disposées dans une chambre humide pendant 15 minutes. Le surplus du bloquant est enlevé en secouant la lame. Une à deux gouttes de l'anticorps primaire monoclonal (PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5)) dilué 1/600 sont appliquées pendant 45 min au cours de laquelle les lames sont disposées dans une chambre humide.

Les lames sont ensuite égouttées et mises dans un panier, puis ils sont rincées dans deux bains de PBS de 5 minutes chacun.

L'anticorps secondaire est ensuite appliqué (1 à 2 gouttes/fragment) puis les lames seront disposées dans une chambre humide pendant une heure. Ensuite elles sont rincées dans deux bains de PBS de 5 minutes chacun.

La peroxydase est appliquée pendant 15 minutes, puis les lames sont rincées dans deux bains de PBS de 5 minutes chacun soit 10 minutes.

Après 2 gouttes du substrat chromogène fraîchement préparé sont appliquées sur chaque lame pendant 15 minutes. Cette fois-ci un rinçage à l'eau courante suivi par un égouttage des lames est réalisé.

L'hématoxyline est appliqué pendant 2 minutes pour la coloration des noyaux. Les lames sont ensuite rincées à l'eau courante puis sont passées rapidement dans du carbonate de lithium saturé pendant quelques secondes avant d'être rincées à l'eau de robinet pour arriver finalement au montage des lames qui se fait à l'aide d'un milieu de montage.

RESULTATS ET **DISCUSSION**

I. RESULTATS

1. Etude descriptive

L'étude a porté sur 35 patients présentant un cancer gastrique de type adénocarcinome.

1.1 Répartition selon le sexe

L'étude de la répartition des tumeurs gastriques selon le sexe, montre que l'incidence la plus élevée a été observée chez les hommes avec un sexe ratio de 2.1 (figure13).

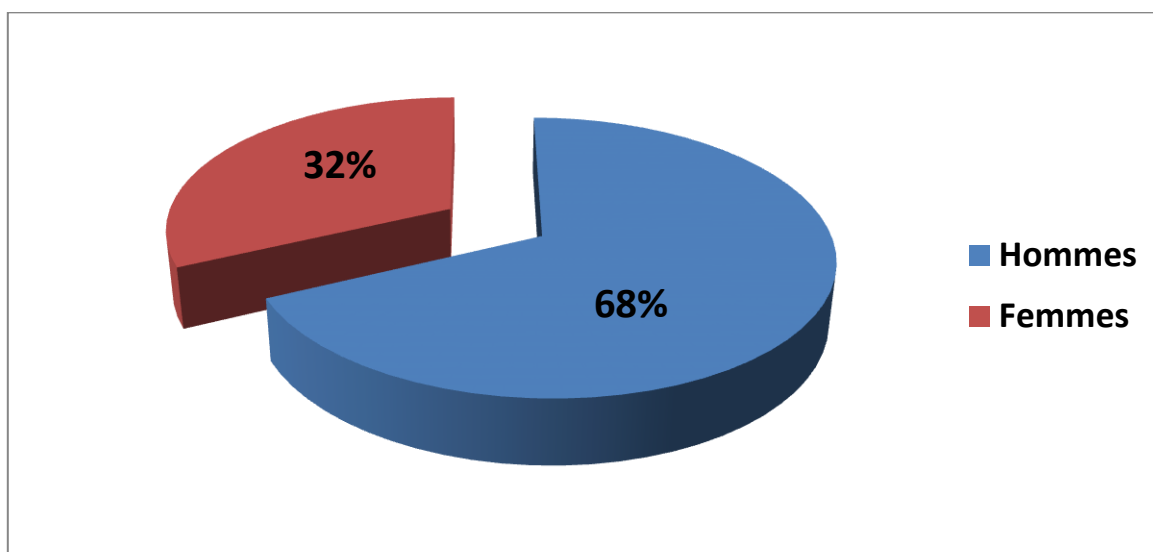


Figure 13 : Répartition des sujets inclus dans l'étude en fonction du sexe.

1.2 Répartition selon l'âge

L'âge moyen des malades présentant un cancer gastrique est de 55 ans. Les extrêmes d'âge sont de 39 ans et 82 ans. La figure 14 illustre le nombre de cas de cancer en fonction de la tranche d'âge des patients. C'est entre 40 et 60 ans que cette pathologie est la plus dominante avec 47%.

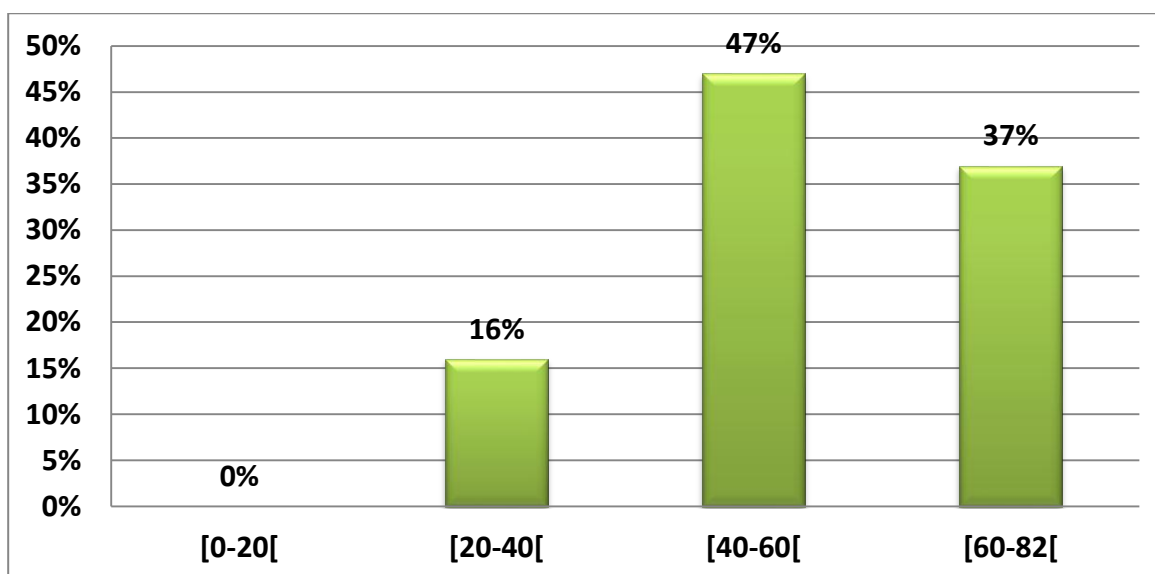


Figure 14: Répartition des sujets inclus dans l'étude en fonction de l'âge.

1.3 Répartition géographique

La plupart des patients proviennent du milieu rural soit 79% (figure 15).

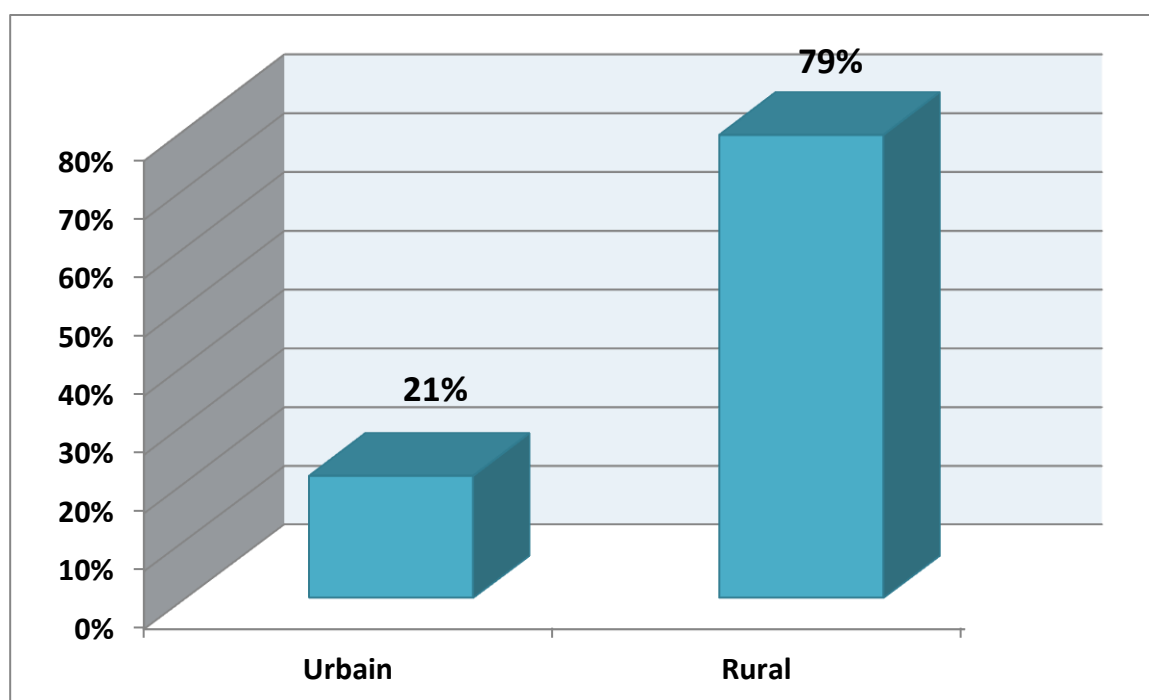


Figure 15 : Répartition des sujets inclus dans l'étude selon le milieu d'origine.

2. Résultats immunohistochimiques

L'expression du récepteur HER2 a été recherchée chez tous les patients par immunohistochimie.

2.1 Répartition selon le score de HER2

La figure 16 représente le pourcentage de l'expression du récepteur HER2 en fonction du score, cette figure montre que 14% de nos patients avaient un score positif (score 3+), et 86% des cas ayant un test négatif répartis entre 1+ et 0+ soit (29% pour le score 1+ et 57% pour le score 0).

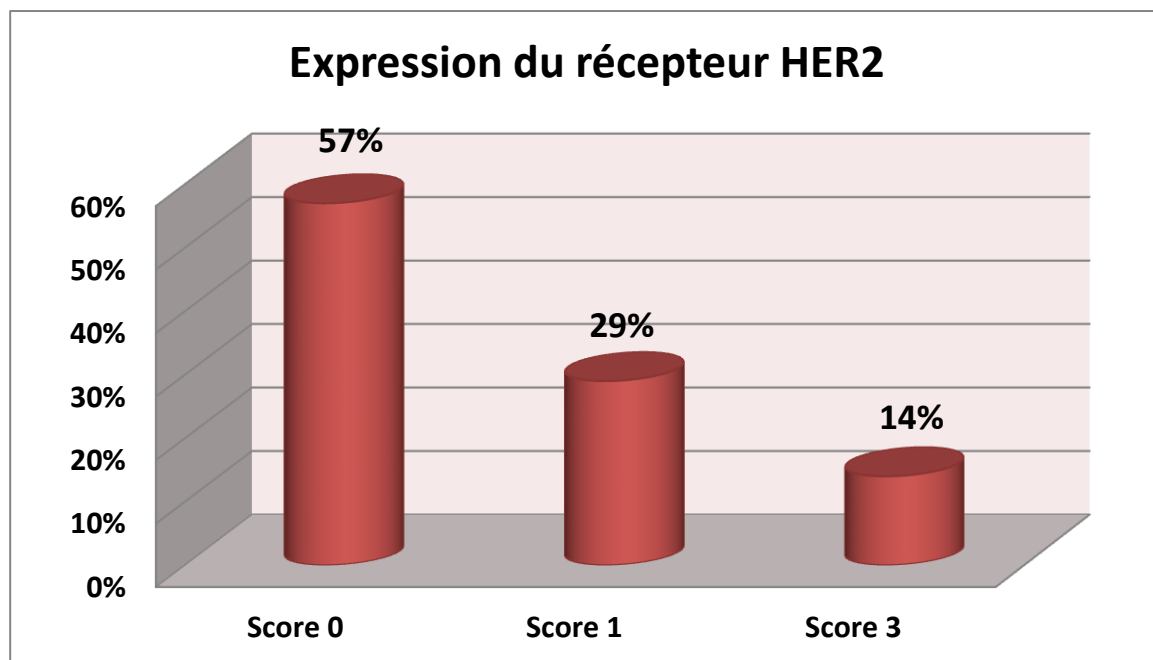


Figure 16: Pourcentage de l'expression du récepteur HER2 pour chaque score.

Dans notre étude 5 patients sont classés comme des cas positifs (score 3) et 30 patients sont classés comme des cas négatifs (score 0 et 1) (figure17).

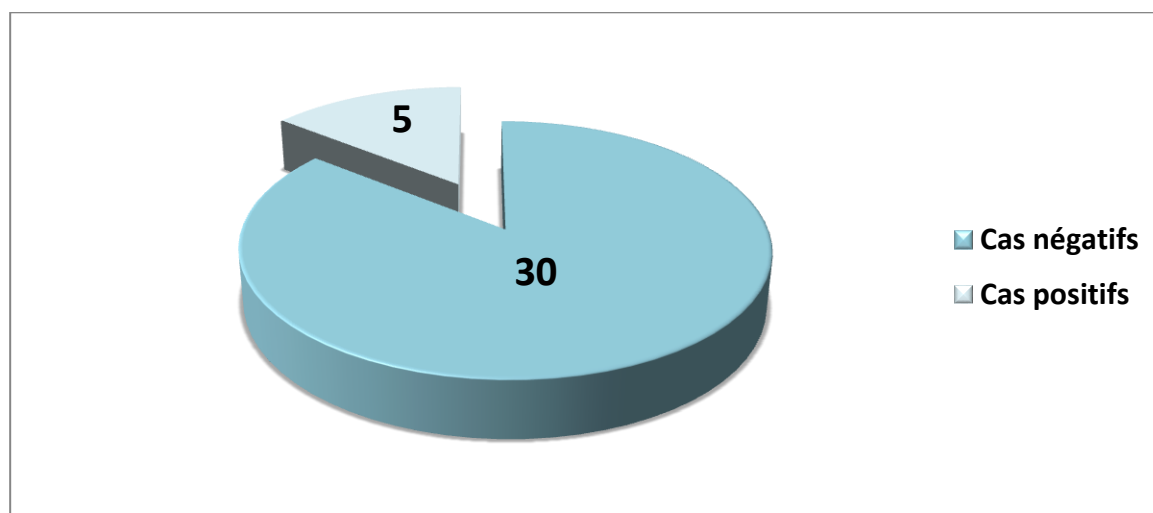


Figure17: Répartition des sujets inclus dans l'étude selon le score de HER2.

Les 5 cas présentant une surexpression du récepteur HER2 détectée par l'immunohistochimie, correspondent à 4 hommes soit 80% et une femme soit 20% (figure18).

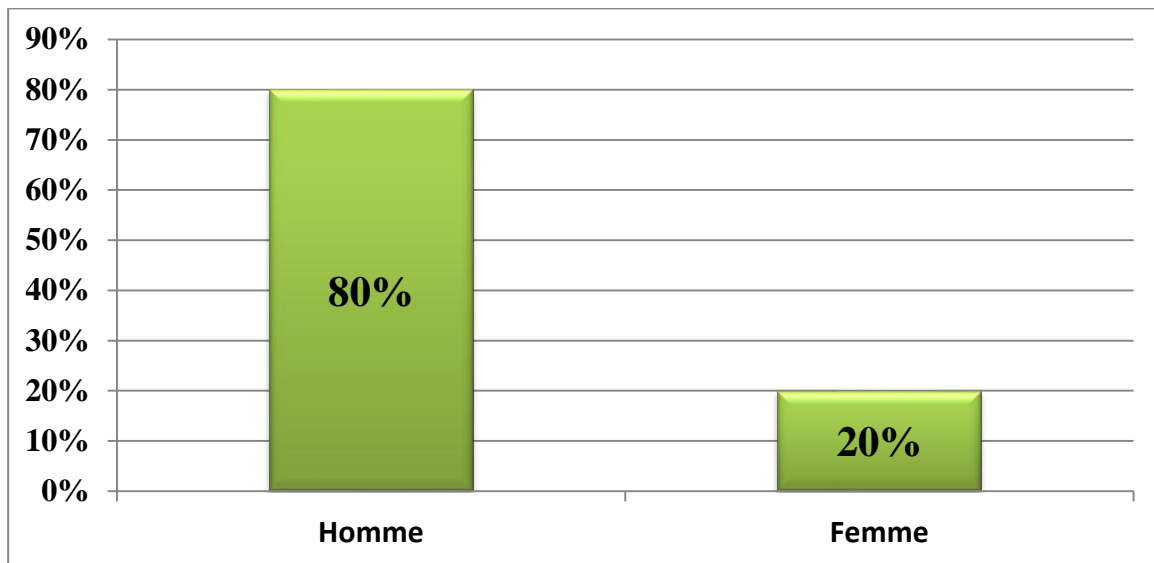


Figure 18 : Répartition des cas surexprimés selon le sexe.

2.2 Observation microscopique des différents scores HER2

Les figures 19,20 et 21 montrent des exemples de résultat microscopique des cancers de l'estomac sur des biopsies.

L'échantillon de la figure 19, montre la présence de Her2 au score 3, avec des groupes de cellules cohésives ayant un marquage membranaire intense, complet ou baso-latéral quel que soit le pourcentage de cellules tumorales marquées.

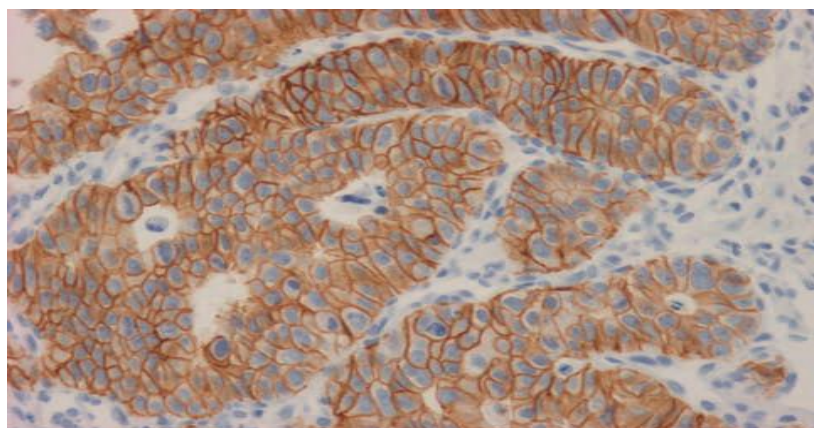


Figure 19: Immunomarquage HER2 3+ dans un cancer gastrique.

La figure 20 représente un cas HER2 négatif (score1), avec un marquage à peine visible dans un amas de cellules tumorales cohésives adjacentes.

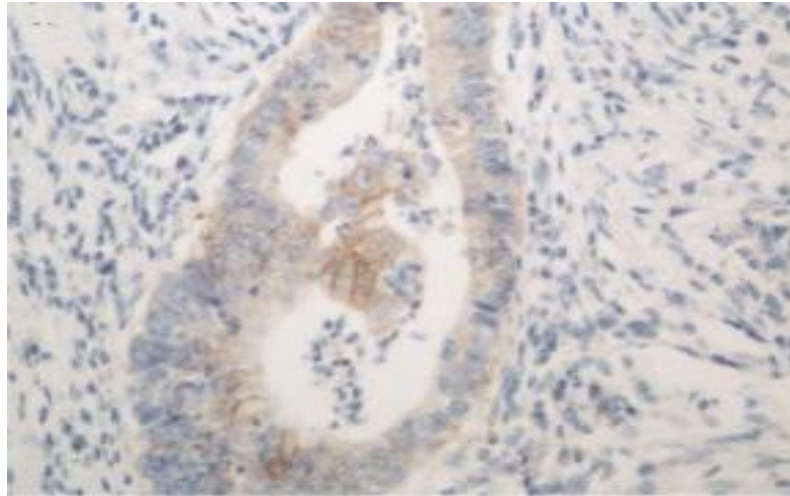


Figure 20 : Marquage membranaire faible et incomplet ($\times 400$).

La figure 21 montre l'absence de réactivité dans l'ensemble des cellules tumorales, il s'agit d'un cas négatif (score 0)

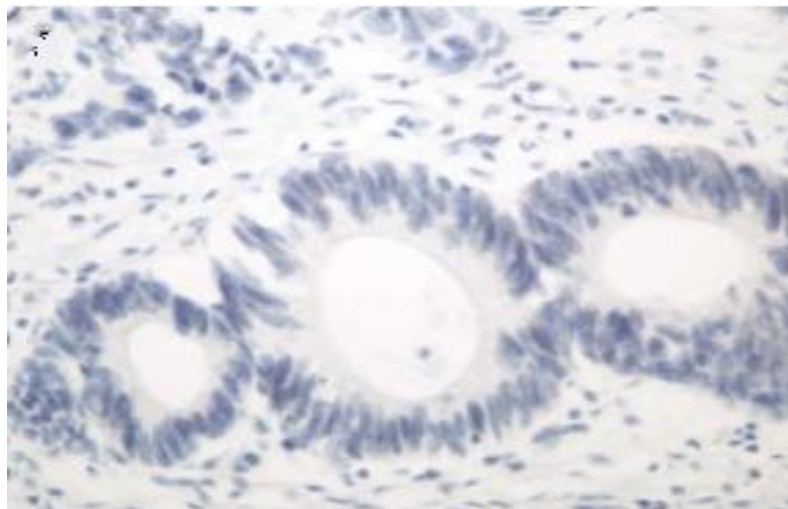


Figure 21 : Absence de coloration ou coloration membranaire dans les cellules tumorales ($\times 400$).

II. DISCUSSION

Les résultats épidémiologiques 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.

Dans notre série, la prédominance du sexe masculin a été mise en évidence avec 24 hommes (68,4%) et 11 femmes (31,6%) soit un sexe ratio de 2,1. L'âge moyen des patients est de 55 ans avec des extrêmes allant de 39 ans à 82 ans, ce qui est en concordance avec les résultats de plusieurs séries telle que l'étude réalisée au CHU Hassan II de Fès qui a noté un âge moyen de 52 ans avec un sex ratio de 3,2 [52].

Dans notre travail, la recherche du profil HER2 est faite seulement par IHC, cette technique était suffisante dans tous les cas (35 cas). Aucun cas ambigu (score2) n'a été trouvé, vue le nombre insuffisant des patients constituant notre échantillon. Ce taux de reproductivité de la technique d'IHC (100%) est supérieur à celui de l'étude de Hind El fatemi et al, réalisée en 2012 au laboratoire d'anatomopathologie de CHU de Fès où l'IHC était concluante pour 83% des cas [52].

Concernant le taux de positivité du test immunohistochimique pour la détection du récepteur HER2, notre étude a montré une surexpression de 14% de ce récepteur. Ce taux reste dans la limite recommandée dans la littérature qui est de 4% à 28% [53]. Il est bien inférieur à celui noté dans l'étude faite au laboratoire d'anatomopathologie au CHU de Fès où le taux d'expression mis en évidence est de 32,3% à IHC seul [52], et supérieur à celui détecté dans d'autres séries telle que l'étude réalisée au laboratoire d'anatomopathologie, CHU Habib Bourguiba en Tunisie, qui est aboutit à un taux d'expression de 10% [54, 55].

La variabilité de ces résultats peut être liée à des variations techniques dépendant de la manipulation et du traitement de tissu et à des difficultés d'interprétation.

CONCLUSION

Le cancer de l'estomac représente la 3ème cause de décès par cancer dans le monde, il est grevé d'un mauvais pronostic avec une moyenne de survie ne dépassant pas un an avec les traitements actuellement disponibles. La recherche des facteurs pronostiques comme le récepteur HER2 est devenue indispensable pour sélectionner les patients candidats à une thérapie ciblée.

L'identification de l'expression du marqueur HER2 au niveau des tumeurs gastriques se fait par l'immunohistochimie qui est une méthode fiable et rapide de détermination du statut de HER2. Sa fiabilité est maximale pour les cas négatifs (score 0 et 1) ou fortement positifs (score3). Par contre, pour les cas dont l'expression est d'intensité intermédiaire (score2), une vérification par FISH du statut de HER2 est justifiée.

Dans notre étude, une surexpression protéique du marqueur HER2 a été détectée chez 14% des patients atteints de cancer gastrique, une valeur qui reste dans la limite (4 à 28%) rapportée par la littérature [53]. Plusieurs études ont montré que les tumeurs gastriques surexprimant le marqueur HER2 étaient de mauvais pronostic [56], ce statut positif de HER2 est ainsi un facteur prédictif de la réponse au trastuzumab (HerceptinMC), ce qui permet de sélectionner les patients éligibles à ce traitement.

La poursuite de cette étude par un échantillon plus large est nécessaire afin de mieux comprendre les particularités de ce cancer.

REFERENCES

- [1]. **Guimbaud R, Bonnet D, Valentin T, Couteau C, Rivera P, Deslandres M.** Prise en charge de l'adénocarcinome métastatique de l'estomac. 2011; Post'U. 175-184.
- [2]. **Tai W, Mahato R, Cheng K.** The role of HER2 in cancer therapy and targeted drug delivery. 2010; J control Release 146:264-275 [PMID: 20385184 DOI: 10.1016/j.jconrel.2010.04.009]
- [3]. **Gravalos C, Jimeno A.** HER2 in gastric cancer: a new prognostic factor and a novel therapeutic target. Ann Oncol 2008; 19 (9):1523-9.
- [4]. **Hudis CA.** Trastuzumab-mechanism of action and use in clinical practice. N Engl J Med 2007; 357: 39-51.
- [5] **Haute Autorité de Santé;** Guide patient n°30 «cancer de l'estomac » septembre 2011.
- [6] **Tonkic A, Tonkic M, Lehours P, Mégraud F.** Epidemiology and diagnosis of Helicobacter pylori infection. Helicobacter 2012;17 Suppl 1:1-8.
- [7] **Aparicio T, Yacoub M, Karila-Kohen P, René E.** Adénocarcinome gastrique: notions fondamentales, diagnostic et traitement. EMC. 2004; 1(1):1-84.
- [8] **Matthieu Bailly,** Statistiques Cancer de l'Estomac en 2012 CIRC, Globocan 2012
- [9]. **Asombang AW, Kelly P.** Gastric cancer in Africa: what do we know about incidence and risk factors. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2012 Feb; 106 (2):69-74.
- [10]. **Chbani L., Hafid I., Berraho M., Mesbahi O., Nejjari C. et Amarti A.** Aspects épidémiologiques et anatomopathologiques des cancers dans la région de Fès-Boulemane (Maroc). Eastern Mediterranean Health Journal. 2013 EMHJ. Vol 19 No. 3
- [11]. **Parkin DM, Bray F., Ferlay J., Pisani P.** Global cancer statistics, 2002. CA Cancer J Clin., 2005; 55 : 74-108.
- [12]. **Rajesh P. Dikshit, Garima Mathur, Sharayu Mhatre.** Epidemiological review of gastric cancer in India. Indian J Med Paediatr Oncol. 2011 Jan-Mar; 32 (1):3-11.

- [13]. **Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM.** Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 200. *Int J Cancer.* 2010 Dec 15;127(12):2893–917.
- [14]. **Dussaulx-Garin L, Blayau M, Pagenault M, et al.** A new mutation of E-cadherin gene in familial gastric linitis plastica cancer with extra-digestive dissemination. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2001; 13: 711-5
- [15]. **Solcia E, Fiocca R, Luinetti O, et al.** Intestinal and diffuse gastric cancers arise in a different background of *Helicobacter pylori* gastritis through different gene involvement. *Am J Surg Pathol* 1996 ; 20 : S8-22.
- [16]. **Tsugane S, Gey F, Ichinowatari Y, Miyajima Y, Ishibashi T, Matsushima S, Hirota Y, Inami T, Yamaguchi M, Karita K.** Étude épidémiologique transversale pour évaluer les risques de cancer au niveau de la population. I. Étude de la conception et du taux de participation. *J Epidemiol.* 1992; 2 : 75-81.
- [17]. **Tsugane S, Gey F, Ichinowatari Y, Miyajima Y, Ishibashi T, Matsushima S, Hirota Y, Inami T, Yamaguchi M, Karita K.** Étude épidémiologique transversale pour évaluer les risques de cancer au niveau de la population. II. Données de base et analyse de corrélation. *J Epidemiol.* 1992; 2: 83-89.
- [18]. **Leung WK, Sung J.J.** Review article: intestinal metaplasia and gastric carcinogenesis. *Aliment Pharmacol Ther* 2002; 16: 1209-1216.
- [19]. **Rogers AB, Taylor NS, Whary MT, et al.** *Helicobacter pylori* but not high salt induces gastric intraepithelial neoplasia in B6129 mice. *Cancer Res* 2005; 65: 10709-10715.
- [20]. **Yun YH, Jung KW, Bae JM, Lee JS, Shin SA, Park SM, et al.** Cigarette smoking and cancer incidence risk in adult men: National Health Insurance Corporation Study. *Cancer Detect Prev.* 2005; 29 (1):15–24.

- [21]. **Kim Y, Shin A, Gwack J, Jun JK, Park SK, Kang D, et al.** Cigarette smoking and gastric cancer risk in a community-based cohort study in Korea. *J Prev Med Public Health*. 2007; 40(6):467–474.
- [22]. **Jee SH, Samet JM, Ohrr H, Kim JH, Kim IS.** Smoking and cancer risk in Korean men and women. *Cancer Causes Control*. 2004; 15 (4):341–348.
- [23]. **C. Fenoglio-Preiser N. Munoz F. Carneiro S.M. Powell P. Correa M. Rugge P. Guilford et al.** CIRC: Pathology and Genetics of Tumours of the Digestive System – Tumors of the Stomach 2000 (chapitre 3)
- [24]. **JH MAILLOCHAUD, A CORTES** Cancer de l'estomac, France-cancer 2001.page:2
- [25]. **Vasen HF, Wijnen JT, Menko FH, Kleibeuker JH, Taal BG, Griffioen G, et al.** Cancer risk in families with hereditary nonpolyposis colorectal cancer diagnosed by mutation analysis. *Gastroenterology* 1996; 110: 1020–1027.
- [26]. **Aarnio M, Salovaara R, Aaltonen LA, Mecklin JP, Jarvinen HJ.** Features of gastric cancer in hereditary non-polyposis colorectal cancer syndrome. *Int J Cancer* 1997; 74: 551-5.
- [27] **Guilford P, Hopkins J, Harraway J, McLeod M, McLeod N, Harawira P, et al.** E-cadherin germline mutations in familial gastric cancer. *Nature* 1998; 392: 402-5.
- [28]. **Fitzgerald RC, Caldas C.** E-cadherin mutations and hereditary gastric cancer: prevention by resection ? *Dig Dis* 2002 ; 20 : 23-31.
- [29]. **N.Mourra,JF.Fléjou** Cancer de l'Estomac Anatomie Pathologique. Uploaded by 128551986 on Feb 15, 2010.
- [30]. **T. Aparicio, M. Yacoub, P. Karila-Cohen, E. René** EMC-Chirurgie 1, 2004; 47–66.
- [31]. **Jean Charles Delchier.** Manifestations digestives de l'infection à *Helicobacter Pylori* chez l'adulte : de la gastrite au cancer. *Presse Med* 2008 ; 37 : 519-524.

- [32]. **Dekker W, Tytgat GN.** Diagnostic accuracy of fiberoendoscopy in the detection of upper intestinal malignancy. A follow-up analysis. *Gastroenterology* 1977; **73**: 710–714.
- [33]. **Watanabe H, Jass JR, Sobin LH.** Histological typing of oesophageal and gastric tumors. In: World Health Organization international histological classification of tumors. Berlin: Springer-Verlag, 1990.
- [34]. **Owen DA, Antonioli D, Carter D, Mills SE, Oberman HA, eds.** The Stomach. In: Stenberg SS. Diagnostic Surgical Pathology. 3rd ed. New York: Lippincott Williams and Wilkins, 1999; 1311-49.
- [35]. **Watanabe H, Jass JR, Sobin LH.** Histological typing of esophageal and gastric tumours. WHO International Histological Classification of Tumours. 2nd ed. Berlin-New York: Springer-Verlag; 1991.
- [36]. **Nancy E., Hynes N., Heidi A., Lane.** ERBB Receptors and Cancer: The Complexity of targeted Inhibitors. 2005 Nat Rev Cancer. 5(5): 341-354.
- [37]. **Sergina NV, Moasser MM.** The HER family and cancer: emerging molecular mechanisms and therapeutic targets. Trends Mol Med. 2007 Dec; 13 (12):527-34.
- [38]. **Bulgess A.W., Cho H.S., Elginbrot C., Ferguson K.M., Carett J., Leahy D.J.** An open and shut case. Recent insights into the activation of EGF/ERBB receptors. Mol Cell, 2003; 12: 541-52.
- [39]. **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.
- [40]. **Graus-Porta D., Beerli RR. Et Hynes NE.** Single-chain antibody-mediated intracellular retention of ErbB-2 impairs Neu differentiation factor and epidermal growth factor signaling. Molecular and Cellular Biology, 1995; 15 1182–1191.
- [41]. **Grant S., Qiao L., Dent P.** Roles of ERBB family receptor tyrosine kinases and downstream signaling pathways, in the control of cell growth and survival. *Front Biosci.* 2002; 7: 376-89.

- [42]. **Marmor MD., Skaria KB., Yarden Y.** Signal transduction and oncogenesis by ErbB/HER receptors. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2004; 58: 903-13.
- [43]. **Pines G., Kostler WJ. et Yarden Y.** Oncogenic mutant forms of EGFR: lessons in signal transduction and targets for cancer therapy. *FEBS Lett*, 2010; 584: 2699-2706.
- [44]. **Blume-Jensen P, Hunter T.** Oncogenic kinase signalling. *Nature*. 2001 May 17; 411 (6835):355-65.
- [45]. **Marx AH, Tharun L, Muth J, Dancau AM et al.** HER2 amplification is highly homogenous in gastric cancer. *Hum Pathol*. 2009 Jun; 40 (6):769-77.
- [46]. **Garcia I et al.** Clinical significance of the epidermal growth factor receptor in resectable gastric cancer. *Ann Surg Oncol*. 2003; 10: 234-41.
- [47]. **Sergina NV, Moasser MM.** The HER family and cancer: emerging molecular mechanisms and therapeutic targets. *Trends Mol Med*. 2007 Dec; 13(12):527-34.
- [48]. **GENTON C.Y.** L'IMMUNOHISTOCHIMIE : Son principe, ses applications et ses limites. article 1 April 2006.
- [49]. **M. Pluot, V. Cahn, A. Ducasse** L'immunohistochimie en anatomie pathologique ophtalmologique : intérêt et limites ; article 2006
- [50]. **Lauren Hammock MD et al.** Strong HER-2/neu protein overexpression by immunohistochemistry often does not predict oncogene amplification by fluorescence in situ hybridization. *Human pathology*, October 2003 ; Vol 34, Issue 10, pp. 1043-1047
- [51]. **F. Penault-Llorca, G. Monge** Score HER2 pour les carcinomes gastriques 2012 ; Vol. I - n° 2
- [52]. **Hinde El Fatemi and all,** la recherche de la surexpression de la protéine et l'amplification du gène HER2 dans le cancer de l'estomac par immunohistochimie et Hybridation in Situ: expérience du CHU HASSAN II de Fès ,2012, the Pan African Medical Journal - ISSN 1937-8688.
- [53]. **Bouche O, Penault-Llorca F.** HER2 and gastric cancer: a novel therapeutic target for trastuzumab. *Bull Cancer* 2010; 97:1429-1440.

[54]. **Tateishi M, Toda T, Minamisono Y, Nagasaki S.** Clinicopathological significance of c-erbB-2 protein expression in human gastric carcinoma. J Surg Oncol 1992; 49: 209-12.

[55]. **N. Abid a, A. Khabir a, A. Khanfirb, M. Frikha b, I. Beyrouti c,T. Boudawaraa.** Intérêt de l'étude de la sur-expression de Her-2 dans les adénocarcinomes gastrique : à propos de 100 cas. novembre 2012 ;vol 32 - N° 5S

[56]. **Garcia I et al.** Clinical significance of the epidermal growth factor receptor in resectable gastric cancer. Ann Surg Oncol. 2003; 10:234-41.

WEBOGRAPHIE:

[57].http://www.mdpi.com/ijms/ijms-12-05672/article_deploy/html/images/ijms-12-05672f1-1024.png

[58].<http://www.facbio.com/content/images/stories/bio/Recepteurs/EGF/FIG1%20STRUCT%20RECEPT.gif>

[59]. http://www.fmcgastro.org/wp-content/uploads/2014/03/23_Guimbaud_2-560x557.png

[60]. http://www.advancedpractitioner.com/narratives/her2/images/her2receptor_fig.png

[61].<http://www.lepointveterinaire.fr/images/20a/e1d851f4a04c239e96a5e759a2502/PV32600604F001.jpg>

[62]. <http://www.jle.com/e-docs/00/04/9C/A7/jlehpg1054gr1.jpg>

[63].[http://campus.cerimes.fr/anatomiepathologique/enseignement/anapath_1/site/html/images/figure8\(1\).jpg](http://campus.cerimes.fr/anatomiepathologique/enseignement/anapath_1/site/html/images/figure8(1).jpg)

[64].https://encryptedtbn0.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9GcT0PPH8E2BZzmPaUFayahxHZ3G4IgKMOC0CvXabssIKNju1eZ_i

[65].https://encryptedtbn0.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9GcR6ZxkumXub7vHRh99QBJtto1zPkh7nqb_ucQ9ACNjyr0SsHMGJ

[66].http://campus.cerimes.fr/anatomiepathologique/enseignement/anapath_1/site/html/images/figure11.jpg

[67].http://campus.cerimes.fr/anatomiepathologique/enseignement/anapath_1/site/html/images/placmed19.jpg

[68]. <http://www.biovitrum.ru/images/cms/menu/123e.jpg>

ANNEXE

Solution pour HES

Réactifs

- ✓ Toluène
- ✓ Alcool (éthanol)
- ✓ Hématoxyline
- ✓ Acide chlorhydrique
- ✓ Solution ammoniac
- ✓ Eosine
- ✓ Safran
- ✓ Méthanol
- ✓ Eau distillée
- ✓ Milieu de montage
- ✓ Lames + lamelles

Solutions

➤ **Eau chlorhydrique 0,5% :**

0,5ml d'acide chlorhydrique + 100ml d'eau distillée.

➤ **Eau ammoniacale :**

10 gouttes de solution d'ammoniac + 100ml d'eau distillée.

NB : Après passage des lames dans l'eau ammoniacale, le tissu devient Bleu. Si ce n'est pas le cas, on ajoute quelques gouttes de plus.

➤ **Bain d'éosine 2% :**

Dissoudre 2g d'éosine poudre dans 100ml d'eau distillée.

➤ **Bain de safran :**

Dissoudre 2g de safran dans 200ml d'éthanol.

NB : La solution est préparée la veille de la technique dans l'étuve à 50°C pendant une nuit. (Le safran doit être complètement dissout).

Coloration standard HES

1. Déparaffinage

- ✓ Incubation à l'étuve 60°C 1 nuit
- ✓ 2 Bain de toluène 5 min
- ✓ 1 Bain d'alcool à 70% 5 min
- ✓ 1 Bain d'alcool à 80% 5 min
- ✓ 1 Bain d'alcool absolu 5 min
- ✓ Rinçage à l'eau courant 1 min

2. Coloration

- 1 Bain de l'Hématoxyline 7 min
- Rinçage à l'eau courante 1 min
- Passage dans l'eau chlorhydrique 0,5%
- Rinçage à l'eau courante
- Passage à l'eau ammoniacale
- Rinçage à l'eau courante 1 min
- 1 Bain d'éosine 2% 7 min
- Rinçage à l'eau courante 1 min
- 1 Bain d'alcool à 70% 1 min
- 1 Bain d'alcool à 80% 1 min
- 1 Bain d'alcool absolu 1 min
- 1 Bain de safran 15 min
- Ethanol-Méthanol 1 min
- Toluène

NB :

- L'hématoxyline colore les noyaux en violet foncé
- L'Éosine colore les cytoplasmes en rose
- Le safran colore les fibres de collagène en jaune

Produits chimiques nécessaires pour l'IHC

- ✓ Toluène
 - ✓ Alcool absolu (éthanol)
 - ✓ Eau oxygénée (H₂O₂)
 - ✓ Acide citrique
 - ✓ Citrate de sodium
- } Tampon citrate
- ✓ PBS (Phosphate Buffer Saline)
 - ✓ Le bloquant (protéine bloquante)
 - ✓ L'anticorps primaire
 - ✓ L'anticorps secondaire
 - ✓ Peroxydase
 - ✓ Chromogène + AEC (substrat)
- AEC : 3-amino-9-éthylcarbazole
- ✓ Hématoxyline
 - ✓ Carbonate de lithium
 - ✓ Acide chlorhydrique (HCl)
 - ✓ Hydroxyde de sodium (NaOH)
- } Ajuster le pH
- ✓ Eau distillée
 - ✓ Milieu de montage
 - ✓ Lames + lamelles

Solutions pour l'immunohistochimie

➤ Tampon citrate (démasquage antigénique)

Pour préparer 1L du tampon citrate, il faut mélanger 18ml d'acide citrique avec 82ml de citrate de sodium et compléter jusqu' à 1L avec de l'eau distillée.

Vérifier le pH de la solution avec un pH mètre et l'ajuster à 6 si nécessaire avec de l'acide chlorhydrique (HCl) ou avec NaOH.

• Préparation de l'acide citrique :

Dissoudre 21g d'acide citrique poudre dans 1L d'eau distillée, agiter la solution jusqu'à l'homogénéisation complète. Conserver la solution à 4°C.

• Préparation de citrate de sodium :

Dissoudre 29,41g de citrate de sodium poudre dans 1L d'eau distillée, agiter la solution jusqu'à homogénéisation complète. Conserver la solution à 4°C.

➤ Eau oxygénée (H₂O₂)

Remplir le bac de l'eau distillée et ajouter quelques gouttes d'H₂O₂ à 30% (dilution de 1/75).

➤ Tampon Phosphate Salin (PBS)

Pour préparer 1L du PBS, mélanger 25,81g du Phosphate di-sodique et 3,8g du Phosphate mono-potassique et compléter jusqu' à 1L avec l'eau distillée.

➤ Carbonate de lithium saturé

Mettre 4g de carbonate de lithium poudre dans 250ml d'eau distillée (jusqu' à la saturation de la solution).