

**REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE**

**Université BLIDA I
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie et de Physiologie Cellulaire**



**Mémoire de fin d'études
En vue de l'obtention du diplôme de Master**

Option : Bio signalisation cellulaire et moléculaire Génétique du cancer

Thème

La recherche de la surexpression de la protéine et
l'amplification du gène Her2 dans le cancer de l'estomac par
immuno - histochimie et Hybridation *in Situ* (FISH)

Présenté par

Cherbi Fatima Zohra

Aimeur Sabrina

Devant le jury composé de :

M ^{me} KANANE. A	Maitre assistante	Université de Blida	Présidente
M ^{me} HANNACHI.L	MCA	Faculté de Médecine Université Alger	Examinatrice
M ^{me} TOUISI.W	Maitre assistante	Faculté de Médecine Université Alger	promotrice
M ^{me} NADJI. S	Maitre de stage	Université de Blida	Co-Promotrice

2016/2017

Remerciement

Avant toute chose ; nous remercions DIEU .le tous puissant ; le clément ; le miséricordieux ; qui nous a permis de réaliser ce modeste travail ; qui nous a ouvert les portes du savoir et qui nous a donné la force et la volonté de pour suivre nos études.

*Nous souhaitons tout d'abord adresser notre gratitude et nos remerciements les plus s'insères à notre promotrice **Dr TOUISI W.** et notre Co-promotrice **NADJI S.** pour avoir assuré notre encadrement ainsi que pour leur soutien inestimable dans toutes les phases de la réalisation de ce travail.*

Nous tenons à remercier les membres du jury qui nous ont honoré en acceptant de juger ce modeste travail

M^{me} KANANE. A Maitre assistante Présidente

P HANNACHI.L Maitre de conférences A Examineur

Sans oublier de remercier tout le personnel du service d'anatomie pathologique de l'hôpital Mustapha bacha.

Enfin, nous tenons à exprimer nos remerciements à toutes les personnes qui ont contribués à la réalisation de ce travaille.

Dédicace

*A cœur vaillant rien d'impossible
A conscience tranquille et accessible
Quand il y 'a la soif d'apprendre
Tout vient à point à qui sait attendre
Quand il y a le souci de réaliser un dessin
Tout devient facile pour arriver à nos fins*

Je dédie ce modeste travail :

*A mes chers parents, pour leurs amours, leur soutien et tous leurs
sacrifices.*

A mes sœur Khalida et Amina

A mes frères Fouad et Ndjibe

A toute ma famille

*A mes très chers amis : Fatima, Khaoula , Loubna, Abire ,
Lamiya*

*A toute personne qui m'a aidé d'un mot, d'une idée ou d'un
encouragement*

Je dis « merci ».

SABRINA

Dédicace

*Je dédie cet humble travail avec grand amour ; s'sincérité et
fierté :*

*A mes chers parents qui m'ont encouragé à aller de l'avant et à
reprendre mes études*

A mes sœur Sara et Kheira

A mes cousines

Meriem et Soumia qui m'ont encouragé

A toute ma famille

A mon binôme et mon amie Sabrina

A mes proches amis :

Djamila, Wassila , Fula et Leila

*A toutes les personnes que j'aime ; je dédie le fruit de mon projet
de fin d'étude*

Fatima Zohra

Résumé

Les mécanismes moléculaires impliqués dans le développement du cancer gastrique restent imparfaitement élucidés. Le récepteur de facteur de croissance épidermique humain (HER2) fait partie des molécules dont la mutation permet le développement et la progression des tumeurs gastriques. Dans ce cadre, nous avons réalisé une étude rétrospective sur 30 cas ayant un cancer gastrique localement avancé. L'étude qui a duré 5 mois a été réalisée au niveau de laboratoire d'anatomie pathologique du CHU de Mustapha Bacha à Alger. Le but de notre travail est d'évaluer le statut Her2 par l'immunohistochimie et le confirmer les scores 2 par une FISH ainsi que, d'évaluer la prévalence de la surexpression de Her2 dans la population algérienne. Nous avons trouvé que le cancer gastrique affecte plus fréquemment les hommes (67 % des cas) que les femmes (33%) avec une moyenne d'âge de 59.07 ans et un âge médian de 60 ans. Le siège anatomique le plus touché est l'antro-fundique, alors que les différents types histologiques prédominants sont les adénocarcinomes à cellules indépendantes (40%), tubuleux et adénocarcinome à cellule en bague à chaton de (20%). 76% des cas possèdent un statut Her2 négative, 17% des cas possèdent un statut Her2 positif avec un score 2+ dont le type histologique est adénocarcinome papillaire et à cellule indépendante et 7% présentent un score 3+ avec un type histologique d'adénocarcinome papillaire et tubuleux. Le cancer gastrique est asymptomatique et son pronostic nécessite un diagnostic rapide et fiable. Cependant, le pronostic clinique et l'efficacité des traitements proposés dépendent en grande partie des caractéristiques histo-chimiques et géniques de la tumeur maligne ainsi que de la sensibilité et la spécificité des tests de diagnostics. L'hybridation *in situ* (FISH) donne l'avantage de précision dans l'évaluation de statut Her2.

Mots clés : Anti-HER2 ; cancer gastrique ; cible thérapeutique ; immunohistochimie ; FISH ; statut HER2

Abstract

The molecular mechanisms involved in the development of gastric cancer still imperfectly understood. The human epidermal growth factor receptor (HER2) is part of the molecules whose mutation allows the development and the progression of gastric tumours. In this context, we conducted a retrospective study on 30 cases with locally advanced gastric cancer. The study, which lasted five months, was conducted at the pathologic anatomy laboratory in the university hospital of Mustapha Bacha in Algiers. The aim of our study is to evaluate the HER2 status by immunohistochemistry and confirm the result by a FISH as well as assess the prevalence of Her2 overexpression in the Algerian population. We found that gastric cancer most commonly affects men (67% of cases) than women (33%) with an average age of 59.07 years and a median age of 60 years. Anatomically, the most affected parte was the antro-fundique. The predominantly histological types was adenocarcinomas with independent cells (40%), tubular adenocarcinomas and adenocarcinomas with signet ring cells (20%). 76% of cases had a negative Her2 status, 17% was scored 2+ with a histological type of papillary adenocarcinoma and adenocarcinoma with independent cells, and 7% was scored 3+ with a histological type of papillary and tubular adenocarcinoma. Gastric cancer is asymptomatic and its prognosis requires a fast and reliable diagnosis. However, clinical outcomes and the effectiveness of proposed treatments depend on the histochemical and genetic characteristics of the tumor and the sensitivity and specificity of diagnostic tests. In situ hybridization (FISH) gives the advantage of accuracy in evaluating Her2 status.

Keywords: Anti-HER2; gastric cancer; therapeutic target; immunohistochemistry; FISH; HER2 status

ملخص

لا تزال الآليات الجزيئية المشاركة في تطور سرطان المعدة غير مفهومة تماما. تعد مستقبلات عامل نمو البشرة البشري من الجزيئات التي يؤدي حدوث طفرات فيها إلى تطور وتقدم أورام المعدة. في هذا السياق، أجرينا دراسة استيعادية على 30 حالة مصابة بسرطان المعدة المتقدم محليا. أجريت الدراسة التي استمرت خمسة أشهر على مستوى مختبر علم التشريح المرضي المتواجد في المركز الاستشفائي الجامعي مصطفى باشا بالجزائر العاصمة. الهدف من دراستنا كان تقييم وضع مستقبلات عامل نمو البشرة البشري بتقنية المناعة النسيجية الكيميائية وتأكيد النتائج بتقنية التهجين الموضعي المتألق، كذلك، تقييم مدى انتشار فرط تعبير المورثة الموافقة لهذه المستقبلات لدى الشعب الجزائري. وجدنا أن سرطان المعدة يصيب الرجال (67% من الحالات) من الأكثر ن النساء (33%) بمعدل عمر يقارب 59 سنة، ومتوسط عمر 60 سنة. الموقع التشريحي الأكثر تضررا كان الموقع الأمامي-القاعدي، بينما الأنواع النسيجية السائدة هي: السرطان الغدي ذو الخلايا المستقلة بنسبة 40%، السرطان الغدي الأنوبي ذو الخلايا الختمية بنسبة 20%. 76% من الحالات وُجد لديها وضع سلبي لمستقبل عامل النمو، 17% من الحالات والتي وُجد لديها وضع الإيجابي بدرجتين (+2) كانت سرطانات غدية ذات الخلايا المستقلة وسرطانات غدية حلبيّة. الحالات الإيجابية بثلاث درجات (+3) كانت نسبتها 7% وكانت من نوع السرطانات الغدية الحلبيّة والأنوبيّة. سرطان المعدة عديم الأعراض وتشخيصه يتطلب وسائل سريعة وموثوق بها. ومع ذلك، النتائج السريرية وفعالية العلاجات المقترحة تعتمد إلى حد كبير على الخصائص النسيجية والوراثية للورم الخبيث وكذلك حساسية وخصوصية الاختبارات التشخيصية. تقنية التهجين الموضعي المتألق تعطي تقييما أدق لوضع مستقبلات عامل نمو البشرة البشري.

الكلمات المفتاحية: ضد مستقبل عامل نمو البشرة البشري؛ سرطان المعدة؛ المستهدف العلاجي؛ تقنية المناعة النسيجية الكيميائية؛ تقنية التهجين الموضعي المتألق، الوضع الإيجابي لمستقبلات عامل نمو البشرة البشري.

SOMMAIRE

INTRODUCTION

CHAPITRE I : GENERALITE

I/CANCER DE L'ESTOMAC

I-1/ Définition	2
I-2/ l'anatomie et structure de l'estomac	2
I-3/ Rôle de l'estomac dans la digestion	3
I-4/ Epidémiologie	4
I-5/Classification selon l'OMS 2010.....	7
I.6 /Mécanisme de la carcinogénèse du cancer gastrique	8

II / LA PROTEINE HER2

II-1/Biologie moléculaire, cellulaire et structurale du récepteur HER2.....	10
II-2/Mécanisme d'activation.....	11
II. 3. Rôles physiologiques des récepteurs ErbB	14
II-4/Amplifications et mutations d'HER2.....	15
II-5/ Détermination du statut de HER2 dans le cancer gastrique.....	16

CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODE

II-1 MATERIEL

II 1-1 Echantillonnage	14
<i>II 1-2 Appareillages et réactifs</i>	15

II -2. METHODE

II-2.1 Etude épidémiologique.....	22
II-2.2 Identification des types histologiques	23
II-2.2.1 Histopathologie	23
<i>II-2.2.2 Immun histochimique</i>	26
<i>II-2.2.3 Hybridation in situ par fluorescences (FISH)</i>	28

CHAPITRE III : RESULTATS

III-1 Paramètres épidémiologiques.....	31
III-2 Paramètres cliniques.....	33
III-3 L'expression du récepteur HER2.....	38
III-4 Résultats de la FISH.....	43

CHAPITRE IV : DISCUSSION44

CONCLUSION47

REFERENCE BIBLIOGRAPHIQUE

ANNEXES

.

LISTE DES ABREVIATIONS

Ac : Anticorps
ADK: Adénocarcinome
Ag : Antigène
AkT : protéine kinase B
AP-1 : Activator protein 1
CG : cancer gastrique
E2F1 : Facteur-1 liant le promoteur E2
EGFR : récepteur du facteur de croissance épidermique
ERK1/2 : extracellulaire –kinase régulée par un signal 1 ou 2
FISH : Hybridation in situ par fluorescence
GAP : protéine activatrice de GTPase
GDP : guanosine diphosphate
GEF : facteur d'échange de nucléotide guanylique
Grb2: Growth Factor Receptor binding Homology 2
GTP : guanosine triphosphate
H.Pylori : Hélicobacter pylori
HE: hématoxyline –eosine
HER2 : récepteur humain du facteur de croissance épidermique de type 2
HIS: Hybridation in situ
IHC : Immunohistochimie
MAPK: Mitogen-Activated Protein Kinase
MEK: MAPK/ERK Kinase
MEK1/2 : mitogène activées par la kinase 1 ou 2
mTOR: Mammalian target of rapamycin
OMS : organisation mondiale de la santé
PDK: Phosphatidylinositol-dependent kinase
PI3K: Phosphatidyl-inositol 3-kinase
PIP2 : phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate
PIP3 : phosphatidylinositol 3, 4,5-trisphosphate
PKA, PKB, PKC: Protein Kinase A, B, C
PTEN: Phosphatase and TENsin homologue ; c'est une phosphatase antagoniste de PI3K
RAF : MAPkinase kinase kinase
RAS : famille de GTPase
RTK : récepteur à activité tyrosine kinase
SH2: Src Homology 2
SH3: Src Homology 3
Sos: fils d'un homologue de sevenless
V-erbB : Virus de l'érythroblastose aviaire

LISTE DES FIGURES

Figures	Titres	Pages
1	L'anatomie et la structure de l'estomac chez l'homme	3
2	cascade d'anomalie gastrique conduisant au cancer	9
3	Structure schématique des récepteurs ErbB	10
4	localisation du récepteur her2 sur le chromosome 17	11
5	Voies de signalisation en aval des récepteurs de la famille EGFR et en particulier HER2 et HER3	12
6	indicateur d'une surproduction de HER2	15
7	principe de l'immuno-histochimie	17
8	principe de FISH	18
9	Algorithme des tests HER2 dans les cancers gastriques	19
10	répartition des patients selon le sexe	31
11	Répartition des patients selon l'âge	32
12	Répartition des patients selon le siège anatomique du cancer	33
13	Répartition des patients selon l'aspect histologique du cancer	34
14	structure d'une muqueuse gastrique normale	35
15	Structure d'un adénocarcinome à cellules indépendantes.	35
16	Structure d'un adénocarcinome tubuleux	36
17	Structure d'un adénocarcinome à cellules en bague à chaton	36
18	Structure d'un adénocarcinome papillaire	37
19	Structure d'un adénocarcinome mucineux	37
20	répartition des cas selon le statut HER2	38
21	Immuno-marquage membranaire (HER2 SCORE 0) d'adénocarcinome gastrique	39
22	Immuno-marquage membranaire (HER2 1+) d'adénocarcinome gastrique	39
23	Immuno- marquage membranaire (HER2 3+) d'adénocarcinome gastrique	40
24	Immuno-marquage membranaire (HER2 2+) d'adénocarcinome gastrique	40
25	présentation la relation entre le score Her2 et l'aspect histologique	41
26	Fish DAPI (noyau)	42
27	3 spots rouge (gène Her2) ; 3 spots verts (centromères du chromosome 17 avec ratio Her2/CEN17 =1<2 ; Non amplifié	42

LISTE DES TABLEAUX

Tableaux	Titres	Pages
Tableau I	Matériel histologie	21
Tableau II	Matériel immuno-histochimie	21
Tableau III	Matériel de FISH	22
Tableau IV	Classification du marquage HER2 en IHC dans le cancer de l'estomac	28
Tableau V	Répartition des patients selon le sexe	Annexe V
Tableau VI	Répartition des patients selon l'âge	Annexe V
Tableau VII	Répartition des patients selon le siège anatomique	Annexe V
Tableau VIII	Répartition des patients selon l'aspect histologique	Annexe V
Tableau IX	Répartition des patients selon le score	Annexe V
Tableau X	Répartition des types histologiques du cancer en fonction de différents scores	Annexe V

GLOSSAIRE

Biopsie : Prélèvement des cellules ou de tissus pour examen par un anatomopathologiste. Celui-ci peut étudier le tissu au microscope ou réaliser d'autres tests sur les cellules ou tissus. Il existe de nombreux types de procédures de biopsie. Les types les plus courants sont : (1) la biopsie par incision; (2) la biopsie-exérèse : (3) la ponction-biopsie.

Maladie de Ménétrier : Maladie de l'estomac se caractérisant par le développement de plis de très grande taille de la muqueuse de l'estomac. Ce tissu peut devenir enflammé et contenir des ulcères. La maladie provoque aussi un dépérissement des glandes de l'estomac et peut entraîner une perte de liquides contenant des protéines, ce qui provoque des douleurs abdominales, des vomissements et un œdème généralisé. La maladie de Ménétrier est une maladie rare qui touche le plus souvent des personnes de plus de 50 ans.

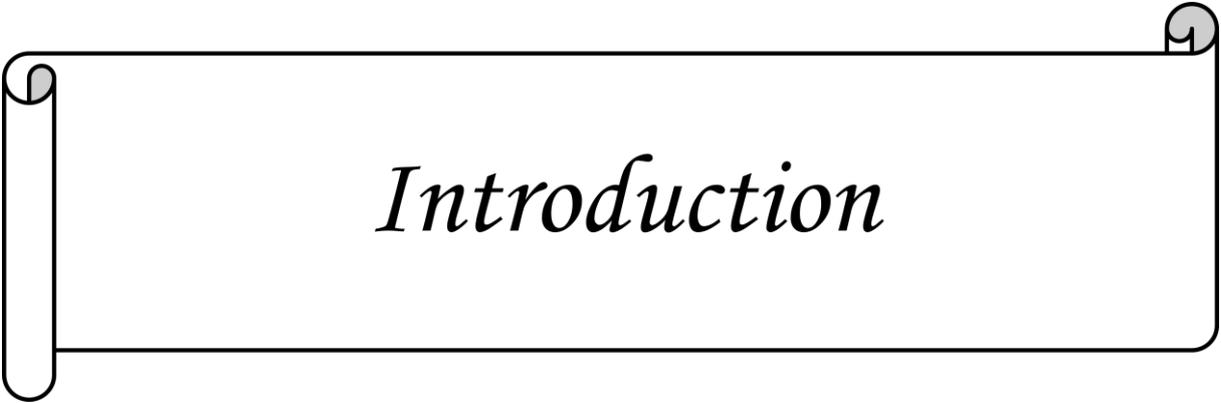
Muqueuse : La couche de délimitation interne, humide de certains organes et cavités de l'organisme (telles que Lenz, la bouche, les poumons et l'estomac). Les glandes présentes dans la muqueuse produisent du mucus (un fluide épais et visqueux). Également appelée membrane muqueuse.

Nitrates : Les nitrates sont naturellement présents dans le sol, l'eau et la nourriture. Il s'agit de composés contenant de l'azote pouvant être présents dans l'atmosphère ou sous forme de gaz dissous dans l'eau, et qui peuvent avoir des effets nocifs sur les humains et les animaux. Une fois absorbés dans l'organisme, les nitrates sont transformés en nitrites.

Nitrites : Les nitrites sont fabriqués principalement pour être utilisés comme conservateurs alimentaires. Les nitrates comme les nitrites sont couramment utilisés dans l'industrie agroalimentaire pour préserver.

***Helicobacter pylori* :** bactérie très répandue qui infecte la muqueuse de l'estomac. L'infection à *Helicobacter pylori* peut être à l'origine de différentes maladies digestives si elle n'est pas éliminée.

Syndrome de Lynch: affection génétique prédisposant à certains cancers en particulier digestifs, aussi appelée syndrome HNPCC (Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer ou Cancer colorectal héréditaire sans polyposie). L'anomalie touche les gènes qui contrôlent la réparation des erreurs survenant lors de la duplication de l'ADN, au moment de la division cellulaire.



Introduction

INTRODUCTION

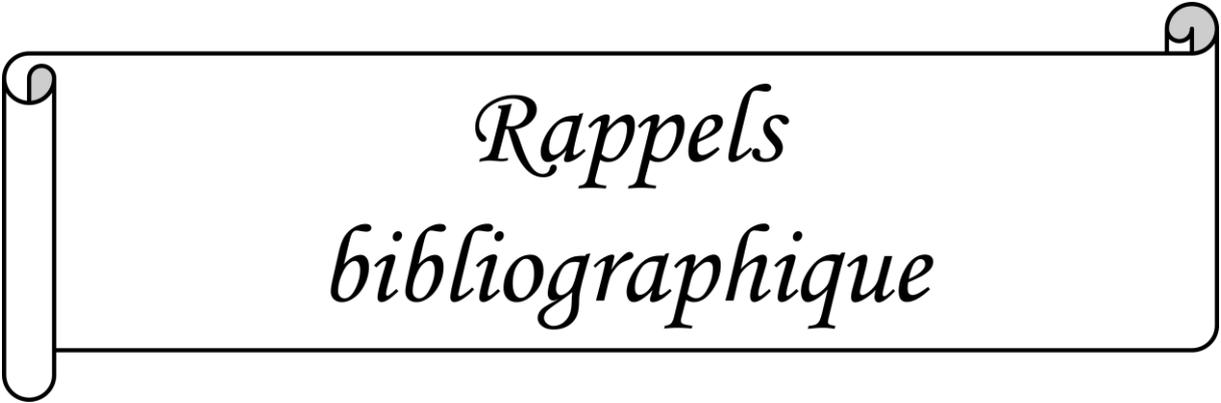
Le récepteur du facteur de croissance épidermique humain ou Human Epidermal growth factor Receptors 2 (HER2) est une glycoprotéine transmembranaire produite par l'oncogène c-erbB2-neu (SOULARUE. ; 2014) ; constituée de 185 kDa appartenant à la famille des récepteurs à activité tyrosine-kinase. C'est un récepteur orphelin puisque à ce jour, aucun ligand spécifique n'a été identifié. L'amplification et la surexpression de l'Her2 (human epidermal growth factor receptor 2) ont été détectées dans plusieurs cancers et ont été particulièrement étudiées dans le cancer du sein. Elles sont décrites dans 7 à 34% des cancers de l'estomac (EL FATEMI et *al.* ; 2012).

Le cancer de l'estomac est le 4^{ème} cancer le plus fréquemment diagnostiqué dans le monde Son pronostic est mauvais, il représente à l'échelle mondiale la 2^{ème} cause de mortalité par cancer avec près de 7000 décès / an. (LAHZAOUI. ; 2013). Constitue une affection préoccupante par sa fréquence et sa gravité. (TOUNKARA. ; 2012).

La détermination de la surexpression et l'amplification de Her2 dans le cancer gastrique en laboratoire est devenue réalisable grâce à plusieurs méthodes telle que l'immunohistochimie (IHC) et la méthode d'hybridation *in situ* (HIS) par fluorescence (FISH)

Un statut HER2 positif serait un facteur de mauvais pronostic et est associé à une maladie plus agressive, mais aussi un facteur de réponse à une thérapie ciblée par le trastuzumab (herceptin) (EL FATEMI et *al.* ; 2012) Est un anticorps monoclonal qui cible directement le domaine extracellulaire de la protéine de surface HER2/neu. IL s'agit d'une immunoglobuline G1 (Ig G1) qui se lie de façon sélective au domaine extracellulaire de la protéine causant une homodimérisation du récepteur, ce dernier est alors dans l'impossibilité d'interagir avec d'autres récepteurs, ce qui entraîne une inhibition de la prolifération des cellules qui surexpriment HER2/neu. (BRITEL. ; 2009). Le mode d'action d'Herceptin est unique en ce sens qu'il active le système immunitaire de l'organisme et supprime HER2 pour cibler et détruire la tumeur.

L'objectif de notre travail est d'évaluer le statut Her2 par la méthode immunohistochimique et confirmée le score 2+ par la méthode hybridation *in situ* par fluorescence (FISH) et ainsi qu'évaluer la prévalence de la surexpression de Her2 dans la population algérienne.



*Rappels
bibliographique*

GENERALITES SUR L'ESTOMAC

I-1/ Le cancer gastrique :

Le cancer de l'estomac est un cancer qui se forme dans les tissus qui tapissent l'estomac. La plupart des cancers de l'estomac se développent à partir des cellules de la couche interne de l'estomac (la muqueuse) qui sécrètent et libèrent du mucus et d'autres liquides. Ces cancers sont appelés adénocarcinomes et représentent environ 90 % des cancers de l'estomac. (ANNEMIE et *al.* ; 2012)

I-2/ l'anatomie et structure de l'estomac :

L'estomac fait partie de l'appareil digestif. Il est situé dans la partie Supérieure et médiane de l'abdomen, appelée région épigastrique, en Dessous du foie, devant le pancréas et à côté de la rate. C'est un Organe creux en forme de poche (INCa ; 2014) de 25cm de longueur, 10 -12cm de largeur, 8cm d'épaisseur et 30ml de capacité à la naissance et chez l'adulte 1,5 à 2 litres de capacité (BELGHARBI ; 2014)

L'estomac est divisé en trois parties :

- ✓ le fundus, partie supérieure en forme de dôme;
- ✓ le corps de l'estomac, zone de réception du bol alimentaire (aliments mastiqués et imprégnés de salive).
- ✓ l'antrum (aussi appelé antrum), partie inférieure dans laquelle a lieu le brassage du bol alimentaire.
- ✓ L'estomac fait suite à l'œsophage avec lequel il communique par l'intermédiaire De la jonction œsogastrique (ou cardia). Il se poursuit par le duodénum (la première partie de l'intestin grêle), auquel il est lié par le pylore (INCa ; 2014)



Figure 1 : L'anatomie et la structure de l'estomac chez l'homme (INCa ; 2014)

Sa paroi est constituée de plusieurs couches:

- ✓ la muqueuse ou couche superficielle interne de l'estomac : Elle contient des glandes qui sécrètent du mucus, substance qui la protège contre l'acidité gastrique. Elle comporte également d'autres glandes qui produisent des acides et enzymes qui vont désagréger les aliments.
- ✓ la sous-muqueuse, qui soutient la muqueuse. Elle contient des nerfs et des vaisseaux sanguins.
- ✓ la couche musculaire dite musculuse, elle-même constituée de plusieurs couches de muscles (longitudinaux, circulaires et obliques), qui se contractent et contribuent au processus de brassage et de progression du bol alimentaire.
- ✓ la séreuse : ou couche externe de l'estomac. (INCa ; 2014)

I-3 Rôle de l'estomac dans la digestion :

L'estomac participe à la digestion. Il s'agit d'un processus permettant la transformation mécanique et chimique des aliments en nutriments qui pourront être ensuite absorbés dans le sang et la lymphe et être utilisés comme source d'énergie pour les cellules du corps.

- ✚ L'estomac constitue le réservoir ou s'achève la trituration des aliments commencée dans la cavité buccale ou débute la digestion.
- ✚ L'estomac répond à une double fonction de conduite et de réservoir.
- ✚ La conduit est réalisée par l'adossement, parallèlement à la petite courbure, des faces antérieures et postérieures de la muqueuse, c'est le canal gastrique que suivent les liquides arrivant par le cardia. Les aliments ingérés vont s'accumuler dans le fond de l'estomac ; le réservoir gastrique dont la capacité peut atteindre un à deux litres.
- ✚ L'antra de l'estomac est la partie horizontale faites de glandes à mucus et des glandes endocrines qui secrètent la gastrine. Cette hormone est responsable de la sécrétion acide de la partie verticale de l'estomac, et des différentes enzymes nécessaires a la digestion.
Celle-ci se termine par la production d'un bol alimentaire semi liquide, Semi solide, Le chyme qui sera expulsé vers le pylore dont l'occlusion Et l'ouverture est obtenue surtout par le glissement de la muqueuse.
(TOUNKARA ; 2012)
- ✚ L'estomac sécrète également une molécule appelée « facteur intrinsèque » qui permet l'absorption de la vitamine B12 au niveau de l'iléon (troisième et dernière partie de l'intestin grêle). La vitamine B12 contribue notamment à la fabrication des globules rouges (INCa ; 2014)

I-4 Epidémiologie :

I-4- 1 Descriptif

Les cancers de l'estomac sont la deuxième cause de mortalité (BENDAHHOU et al ; 2012) se situe au 2^{ème} rang des cancers dans le monde, avec environ 755000 nouveaux cas par an. Les deux pays où l'incidence est la plus élevée sont le Japon et le Chili (80 pour 100000 habitants) ; viennent ensuite l'Islande, la Chine et l'Autriche. Aux Etats-Unis le taux de mortalité est de 7,5 hommes et de 3,7 femmes pour 100000habitants. L'Europe de l'ouest et les pays d'Amérique du nord se situent dans les pays à risque majeur ; l'Europe orientale et l'Amérique du sud ont une incidence plus élevée. En Afrique, l'incidence est de 4 pour 100000 habitants. Dans la plupart des pays, le sexe ratio est proche de 2,5 en faveur de

l'homme L'âge moyen est plus élevé chez les hommes (61,8ans) que chez les femmes (51,4 ans) ($p=0,055$). (TAZI et al ; 2009)

Selon les données du registre des cancers en Algérie, ils occupent le 2^{ème} rang des cancers chez l'homme après le cancer du foie, et le 3^{ème} rang de cancer chez la femme après ceux du col utérin et du sein. (BELGHARBI ; 2014) avec une moyenne annuelle de 3.000 cas chez les hommes et 2.000 chez les femmes (BOUKRAA ; 2014).

Ces variations sont dues à des facteurs carcinogènes liés à l'environnement notamment alimentaires.

I-4-2 Analytique :

Le facteur étiologique principal des adénocarcinomes gastriques distaux reste l'infection par *H. pylori*.

Cependant, il a été montré que l'environnement ainsi que la susceptibilité de l'hôte peuvent rentrer en jeu. (JONTHAN ; 2009)

Les Principaux facteurs de risque du cancer de l'estomac :

Les lésions précancéreuses :

- Infection à *Helicobacter pylori* +++
- Dysplasie
- Gastrite chronique atrophique et métaplasie intestinale
- Maladie de Biermer
- Gastrectomie partielle pour pathologie bénigne
- Maladie de Ménétrier
- Polype gastrique adénomateux
- Ulcère gastrique bénin (JONTHAN ; 2009)

Les facteurs environnementaux et alimentaires :

Dans la carcinogenèse gastrique, l'alimentation se situe au 1^{er} plan des facteurs prédisposant au cancer de l'estomac, ce dernier est l'aboutissement de plusieurs mécanismes aussi bien exogènes qu'endogènes.

Le sel a un effet caustique sur la muqueuse gastrique et serait responsable de la gastrite atrophique ; il ralentit la vidange gastrique et prolonge le temps de contact entre les

nitrosamines et la muqueuse gastrique ; et favorise l'infection chronique à *Helicobacter pylori*.

Le nitrite est utilisé dans certains aliments telles les nourritures salées, fumées, marinées ou en conserve. On a dénombré une très haute incidence du cancer gastrique dans les pays où ces modes de conservation sont utilisés à haut échelon, ex : Japon, Islande. (OUKDIM ; 2013)

PH gastrique élevé stimule la pullulation bactérienne qui convertit les nitrites en nitrosamines (EL KAADOUS ; 2009)

L'hydrocarbure polycyclique est présent dans les aliments fumés et il a un fort potentiel carcinogène.

Certaines études ont démontré que les légumes et fruits riches en vitamine C et bêta-carotène ont un rôle protecteur sur la muqueuse gastrique, en limitant la transformation des nitrates en nitrosamines (OUKDIM ; 2013).

Les aliments fort en gras, en protéines, (MIHOUBI ; 2009), peut augmenter le risque de développer un cancer de l'estomac.

Le tabac et l'alcool ne sont pas des facteurs étiologiques essentiels, mais plusieurs études cas-témoins, ou de cohortes, suggèrent qu'une forte consommation augmente le risque de cancer gastrique. (BEN NEZHA ; 2008)

L'environnement professionnel

- Concentration élevée de plomb et de Zinc dans l'eau de table
- Ouvriers travaillant dans l'industrie de métal, de l'argile et de teinture (EL KAADOUS ; 2009)

Certaines études ont montré que pratiquer une activité physique très fréquente peut réduire presque de moitié le risque de cancer de l'estomac. (BERKAN ; 2009)

Les facteurs génétiques :

On estime que 1 à 3 % des cancers gastriques sont d'origine héréditaire. Parmi eux, il faut distinguer Les cancers gastriques survenant dans le cadre de maladies héréditaires : syndromes familiaux dominés par le risque de cancer de type intestinal. Dans ces cas, le cancer de l'estomac n'est qu'une des localisations possibles de la maladie néoplasique.

Il peut rentrer dans le cadre : du syndrome HNPCC (Hereditary Non Polyposis Colorectal Cancer) où le risque de développer un cancer de l'estomac avant 70 ans est estimé à 20 %, du syndrome de Li-Fraumeni qui est lié à des anomalies du gène TP53, du syndrome de Peutz-Jeghers et de la polypose adénomateuse familiale (PAF) (OUKDIM ; 2013)

Des mutations somatique du gène de la E-cadherine (CDH1) ou hyperméthylation du promoteur de ce gène sont caractéristique des adénocarcinomes de type diffus. (SALMI ; 2014)

Polymorphisme génétique de cytokines (EL KAADOUS ; 2009) ; Un antécédent de cancer de l'estomac chez un parent du premier degré (parents, frères, sœurs ou enfants) augmente le propre risque de développer la maladie. Pour des raisons inconnues, les personnes du groupe sanguin A ont plus de développer un cancer de l'estomac.

Le sexe : le cancer de l'estomac est plus fréquent chez les hommes que chez les femmes. Les raisons de cette différence sont incertaines, mais les œstrogènes, des hormones sexuelles femelles, pourraient avoir un effet protecteur (ANNEMIE et *al* ; 2014).

I-5 Classification :

Les tumeurs de l'estomac sont classées en fonction de leur siège anatomique et de leur type histologique.

On distingue trois types anatomiques :

- Tumeur du cardia (située à moins de 2 cm de la jonction oéso-gastrique)
- Tumeur du corps (fundus) ou de la grosse tubérosité ;
- Tumeur de l'antra (distale).). (COURILLON-MALLET ; 2008)

Selon la classification histologique d'OMS (2010) on distingue :

Dans cette classification ; les cancers sont gradés en cancers bien, moyennement et peu différenciés et classés en 5 sous types histologique principaux :

Adénocarcinome à cellules indépendantes : >50% des cellules indépendantes

Adénocarcinome tubulaire : est constitué de tubes plus ou moins dilatés et agglomérés en massifs cribriformes. Le type tubulaire peu différencier est aussi appelé Carcinome solide.

Adénocarcinome papillaire : est-on général une tumeur bien différencié xérophytique constituée de papille centrée par un axe fibrovasculaire

Adénocarcinome mucineux : appelé carcinome colloïde, est défini par la présence de plus de 50% de mucine extracellulaire.

Adénocarcinome à cellule en bague à chaton : est un cancer dans lequel plus de 50% de la masse tumorale est formée de cellules en bague à chaton ; c'est-à-dire une cellule avec un cytoplasme contenant de la mucine refoulant le noyau à la périphérie de la cellule. (CHRISTINE ; 2009).

À côté des ces 5 types principaux d'autres sous types plus rares sont décrits :

- ✓ Carcinome adénoquameux
- ✓ Carcinome épidermoïde
- ✓ Carcinome à petites cellules
- ✓ Carcinome indifférencié

I.6 Mécanisme de la carcinogénèse du cancer gastrique :

Plusieurs facteurs favorisant la cancérogenèse gastrique ont été identifiés. Les facteurs génétiques, la consommation de sel, de tabac, l'infection par le virus Epstein-Barr pèsent pour 20 % alors que l'infection à *HP* représente 80 % des facteurs de risque. L'infection à *HP* est la première étape du processus conduisant à l'adénocarcinome gastrique. Après plusieurs décennies, l'infection à *HP* provoque une gastrite atrophique antrale et fundique. L'étape clé et irréversible est représentée par l'apparition de foyers de métaplasie intestinale au sein de la gastrique chronique fundique. L'objectif principal du gastroentérologue est d'identifier puis de surveiller les patients à risque élevé de cancer. (PIERRE et al ; 2011).

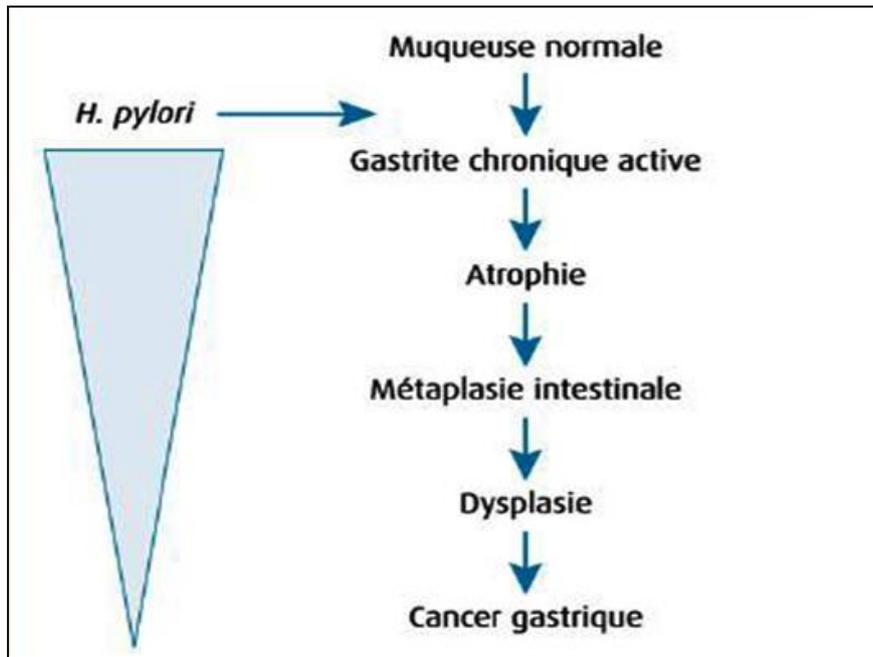


Figure 2 : Cascade d'anomalie gastrique conduisant au cancer

(LAHZAOUÏ. ; 2013)

Toutefois, moins de 1 % des patients infectés par *H. pylori* développeront un cancer gastrique. L'infection à *H. pylori* n'est donc pas suffisante à elle seule pour induire un cancer, mais elle intervient à un stade précoce de la cancérogenèse, associée à d'autres facteurs de risque.

Ainsi des altérations génétiques d'oncogène et de gènes suppresseurs ont été bien identifiées. Les principales modifications décrites sont les amplifications et les mutations ponctuelles. Les altérations des gènes codant pour différents facteurs de croissances (HGF, FGF, EGF) et pour leurs récepteurs (TGF β -RII, HER). Ce dernier a fait l'objet de plusieurs études de recherche pour comprendre le mécanisme de son action et aussi pour s'en servir comme cible thérapeutique.

II. LA PROTEINE HER2

1) Biologie moléculaire, cellulaire et structurale du récepteur HER2

Le mécanisme de transduction du signal permet à une cellule de réguler la transcription de certains gènes suite à la fixation extracellulaire d'un messenger sur un récepteur spécifique. Les récepteurs du facteur de croissance épidermique humain ou Human Epidermal growth factor Receptors (HER) sont parmi les premiers oncogènes identifiés. Ils font partie de la superfamille des récepteurs à tyrosine kinase, répartis en 20 familles différentes. Plusieurs récepteurs à tyrosine kinase sont des proto-oncogènes et sont de ce fait des cibles potentielles pour des thérapies anticancéreuses (ANNE-SOPHIE CHRETIEN. ; 2011)

La famille des récepteurs HER comprend quatre récepteurs homologues : HER1 (Erb-B1, EGFR, Epidermal Growth Factor Receptor), HER2 (Erb-B2), HER3 (Erb-B3), et HER4 (Erb-B4) ; Ces récepteurs sont exprimés à l'état physiologique dans de nombreux types de tissus d'origine épithéliale, mésenchymateuse ou encore neurale, dans lesquels ils jouent un rôle majeur dans le développement, la prolifération, la différenciation et le métabolisme cellulaire. Les récepteurs HER sont surexprimés ou présentent des mutations activatrices dans de nombreux types tumoraux. Parmi ces récepteurs ; le HER2 est exprimée de façon constitutionnelle dans plusieurs tissus (sein, estomac, rein, cœur). (SOULARUE. ; 2014)

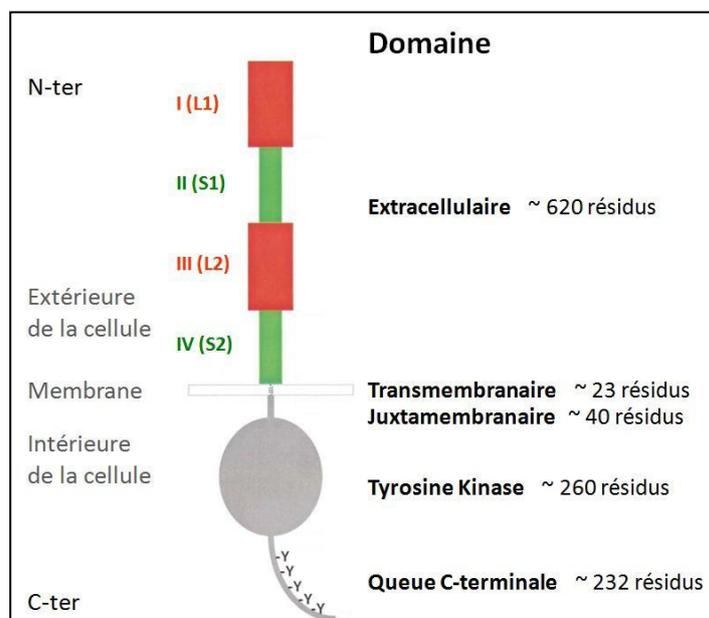


Figure 3 : Structure schématique des récepteurs ErbB (YALI WAN. ; 2012)

Est une glycoprotéine transmembranaire de 185kDa à activité tyrosine kinase ; constituée de 1255 acides aminés; codé par le proto-oncogène neu (autre dénomination possible du récepteur : HER2/neu) situé sur le chromosome 17q21 (TAHARI. ; 2008). Exprimée dans l'épithélium de nombreux organes comme les poumons ; les vessies ; le pancréas ; le sein et l'estomac. Ce récepteur est dit orphelin, car contrairement à EGFR, il n'a aucun ligand spécifique identifié. (WALLERAND et *al* ; 2008)

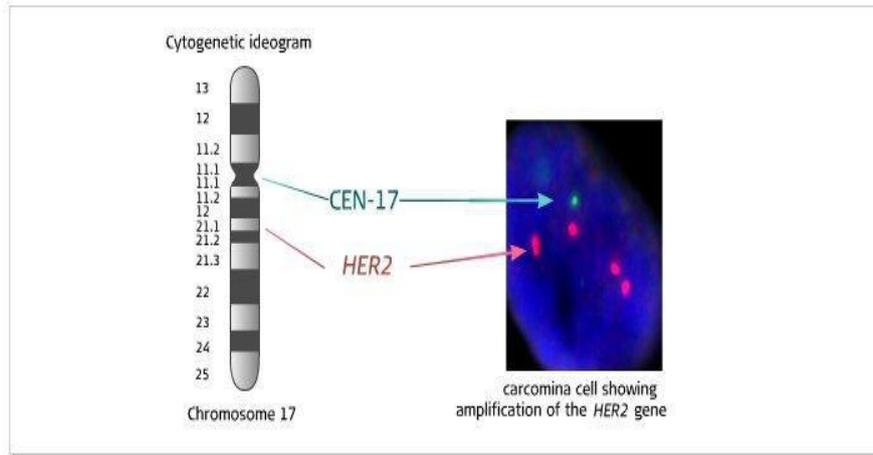


Figure 4 : localisation du récepteur Her2 sur le chromosome17 (LAHZAOUI. ; 2013)

Le récepteur HER2 possède 3 domaines :

- une région intra cytoplasmique à activité tyrosine kinase.
- une région transmembranaire composée d'un segment lipophile qui permet d'ancrage du récepteur aux membranes cellulaires.
- une région extracellulaire composée de quatre sous unités (I-IV) liant le ligand (GOUADFEL et *al* ; 2013)

II .2 Mécanisme d'activation

En l'absence de ligand, ces récepteurs existent majoritairement sous forme de Monomère inactif.

La fixation du ligand sur l'EGFR entraîne la formation d'un homo ou hétéro-dimère, ce qui conduit à l'activation de l'EGFR par autophosphorylation du domaine tyrosine kinase.

L'activation de l'EGFR induit différentes voies de signalisation dont la voie des phosphatidylinositol 3-kinases (PI3-K) et celle des MAP kinases qui contrôlent la prolifération cellulaire,

la migration, l'échappement à l'apoptose, l'angiogénèse, processus impliqués dans la carcinogènes (NGO et *al* ; 2015)

Deux grandes voies de transduction du signal sont activées : la voie des *mitogen activated protein kinase* (MAPK) et des phosphatidylinositol-3 kinases (PI3K)

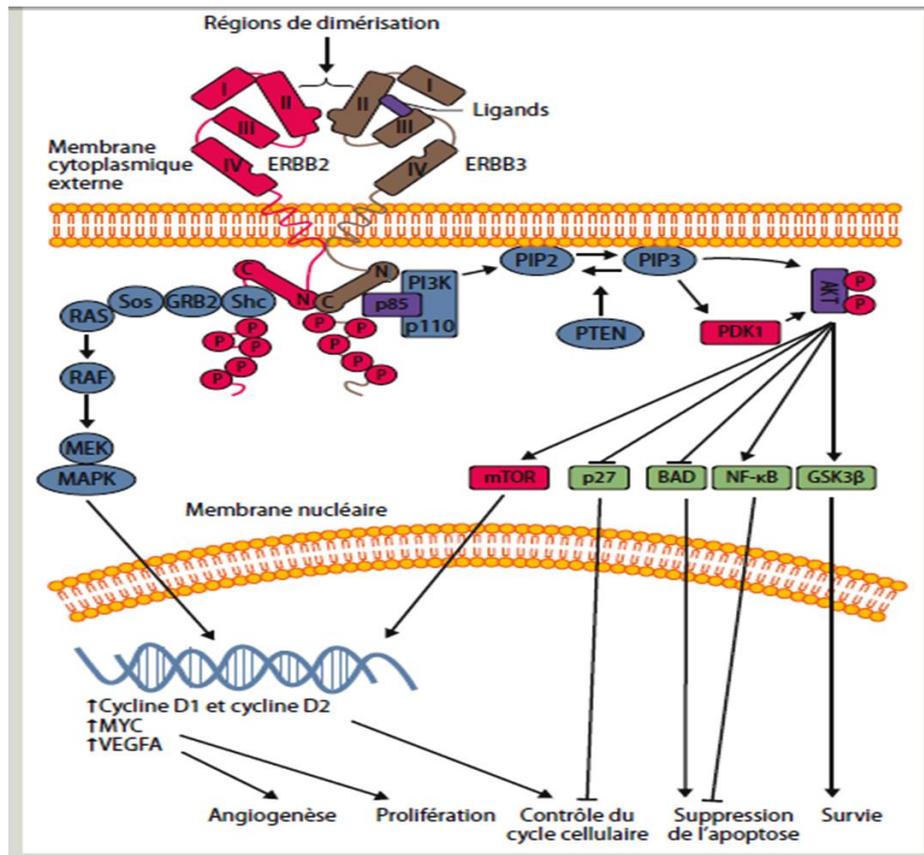


Figure 5 : Voies de signalisation en aval des récepteurs de la famille EGFR et en particulier HER2 et HER3 (VINCENT-SALOMON. ; 2012)

Ces voies consistent en une cascade de phosphorylation de protéines résultant en la transcription de gènes responsables de nombreux processus biologiques

II.2.a Voie des RAS/RAF/MAPK

La voie des RAS/RAF/MAPK présente un rôle central dans la régulation de la croissance et de la survie cellulaire d'un large spectre de tumeurs humaines. (CHRETIEN. ; 2011).

Une fois l'EGFR activé, les résidus tyrosines phosphorylés des domaines cytoplasmiques du récepteur servent de site de liaison pour une série de protéines adaptatrices permettant l'activation de la GTPase Ras. Pour ce faire, la protéine Grb2 se lie aux résidus tyrosines phosphorylés via son domaine SH2. Les domaines SH3 de cette protéine adaptatrice permettent ensuite la liaison aux motifs riches en proline de SOS, un facteur d'échange de nucléotide catalysant l'activation de la GTPase Ras. Une fois la GTPase activée, celle-ci initie une cascade de phosphorylation de protéines constituant les MAP kinases, en débutant par la protéine kinase Raf. Raf activée phosphoryle ensuite les résidus sérines et thréonines des protéines kinases MEK1/2. Ces dernières phosphorylant à leur tour les résidus thréonines et tyrosines de ERK1/2, un groupe de protéines qui, une fois activées, transloquent au noyau afin d'y phosphoryler plusieurs facteurs de transcription. Parmi les protéines activées par ERK1/2, on retrouve Jun, une protéine composant le facteur de transcription AP-1, et des protéines de la famille des facteurs de transcription Ets. Ces facteurs de transcriptions activent la transcription de gènes précoces codant pour la production d'autres facteurs de transcription, incluant Myc, Fos, et Jun, qui activent à leur tour la transcription d'une famille de gènes tardifs. Un de ces gènes code pour le facteur de transcription E2F dont le rôle est de contrôler l'entrée en phase S. Parmi les gènes tardifs, plusieurs gènes codent également pour les cyclines ou les kinases dépendantes des cyclines (Cdk) dont la production conduit à la formation de complexes Cdk-cycline qui phosphoryle Rb et, ainsi, provoque le passage de la phase G1 à S. (SARAVALLI. ; 2012).

II .2.b La voie PI3K/Akt

Les kinases PI3Ks sont activées en aval d'une interaction ligand/récepteur (RTK, GPCR, récepteur des cytokines, intégrines). Il existe trois grandes classes de PI3Ks (I, II et III) composées de différents sous-groupes.

Ce sous-groupe de kinases est composé d'une sous-unité catalytique p110 et d'une sous-unité régulatrice p85. Trois mécanismes menant à l'activation de PI3K ont été décrits :

1. une interaction directe entre la sous-unité régulatrice p85 et un RTK phosphorylé,
2. Une interaction indirecte entre p85 et un RTK via des protéines adaptatrices. Grb2
3. une activation de p110 via Ras. (CHAUVIN. ; 2015)

Une fois activée, la PI3K migre dans la paroi interne de la membrane plasmique et catalyse l'addition d'un groupement phosphate sur le phosphatidyl-inositol 4,5-bisphosphate (PIP2), un des lipides membranaires constituant la bicouche lipidique de la membrane plasmique. Le PIP2 est alors converti en phosphatidyl-inositol 3, 4,5-trisphosphate (PIP3). Le PIP3 recrute ensuite des protéines kinases à la surface interne de la membrane plasmique conduisant à l'activation de la sérine-thréonine kinase Akt. En phosphorylant plusieurs protéines clés, telles que GSK3, mTOR, et des facteurs de transcription de la famille Forkhead, Akt permet la suppression de l'apoptose et inhibe l'arrêt du cycle cellulaire. L'effet net de la voie de signalisation PI3K est donc de promouvoir la survie cellulaire et la prolifération (SARAVALLI., 2012)

Toutes deux impliquées dans la prolifération, la migration, l'adhésion et la Différenciation cellulaire, ainsi que dans la résistance à l'apoptose et l'angiogénèse.

Il existe donc un lien étroit entre la voie de signalisation RAS/MAPK et la voie PI3K/AKT, par l'intermédiaire de RAS. Les connexions qui existent entre ces deux voies sont, en fait, probablement plus complexes encore (LIEVRE ET AL ; 2010).

II. 3. Rôles physiologiques des récepteurs ErbB

Les récepteurs ErbB sont exprimés dans des tissus d'origine épithéliale ; , mésenchymateuse et neuronale où ils jouent des rôles dans le développement, la prolifération et la différenciation. L'EGF et son récepteur sont aussi impliqués dans le développement embryonnaire précoce et dans le renouvellement des cellules souches dans des tissus normaux comme la peau, le foie et l'intestin (SAMPAIO. ; 2008).

Au niveau cellulaire, les voies de signalisation activées par les récepteurs HER2 participent à la prolifération, la migration et la différenciation de plusieurs types Cellulaires. L'angiogénèse .la survie cellulaire. Ils ont aussi un effet anti-apoptotique.

Ils sont présent dans différents organes y compris le cœur (Her2), le système nerveux, les glandes mammaires ainsi que des épithéliums en générale. Cela peut expliquer effets indésirables des thérapies ciblant ces récepteurs (LAHZAOUI. ; 2013).

II.4. Amplifications et mutations d'HER2

La surexpression du récepteur HER-2, engendrée par une amplification génique, est retrouvée dans environ 10 % à 15% des cancers du sein non métastatiques et 20 % à 25 % des cancers gastriques métastatiques ou avancés. (AMELIE. ; 2014).

Le proto-oncogène HER2/neu situé sur le chromosome 17 code la protéine HER2 aussi appelé erbB2 en raison de sa similarité de séquence avec l'oncogène viral v-erbB2 (virus de l'érythroblastose aviaire) cette dernière est un composant normale exprimé par un grande nombre de type des cellules épithéliales. La transformation de ce proto oncogène en un oncogène qui initié la survenue du cancer ; se fait dans 95% des cas par une amplification génique c'est à dire par une surexpression due à la production de plusieurs copies du gène ; d'autres altération génétiques peuvent être à l'origine de cette activation telle que la mutation du gène ; altération au niveau transcriptionnel ; troncation de la protéine (GOUADFEL et al; 2013)

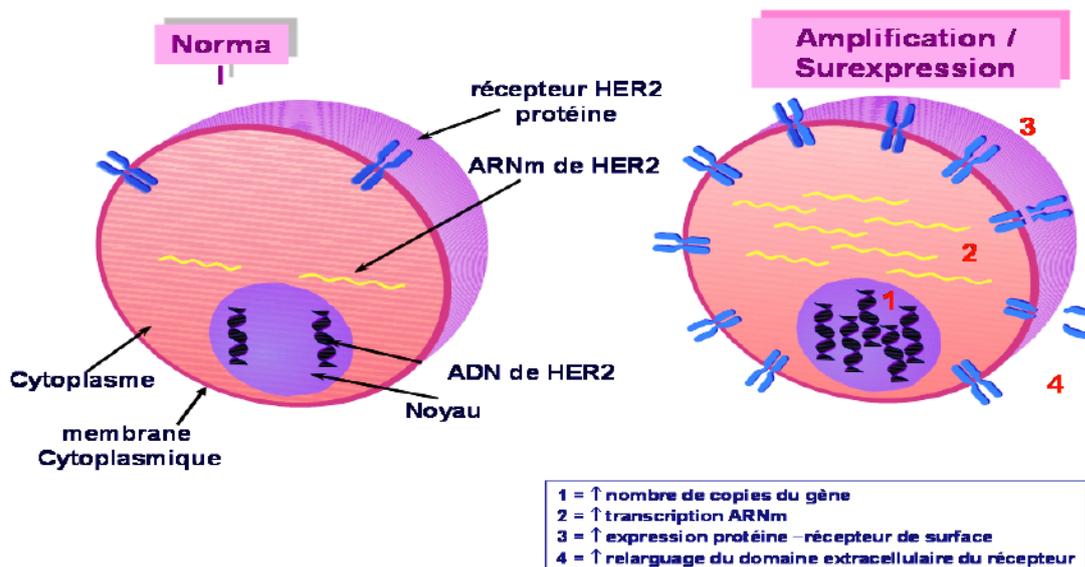


Figure 6 : indicateur d'une surproduction de HER2 (BRITEL. ; 2009)

II. 5. Détermination du statut de HER2 dans le cancer gastrique

Une surexpression protéique ou génique du marqueur HER2 a été détectée chez 4 à 28 % des patients atteints de cancer gastrique et de la jonction gastro-œsophagienne. Plusieurs études ont montré que les tumeurs gastriques sur exprimant le marqueur HER2 étaient de plus mauvais pronostic. Le trastuzumab (Herceptine), un anticorps monoclonal humanisé dirigé contre le marqueur HER2, a été montré efficace chez des patients atteints d'un carcinome gastrique et sur exprimant le marqueur HER2 (étude ToGA). La détermination de l'expression du marqueur HER2 devient donc un pré requis indispensable dès qu'un traitement à base de trastuzumab est envisagé. (JIM BOULANGER et *al*; 2011)

Le diagnostic moléculaire de HER-2 est désormais bien standardisé dans le cancer gastrique. Il repose sur 2 analyses que sont l'immuno-histochimie (IHC) et l'hybridation *in situ* (HIS) par florescence (FISH).

II.5.a) Technique d'immuno-histochimie

L'immuno-histochimie est une technique qui permet la détection, à l'intérieur d'un tissu ou d'une cellule, d'un antigène donné. L'antigène possède plusieurs épitopes qui sont des sites de liaison aux anticorps. (ELISABETH. ; 2011) ; Elles consistent à révéler sur coupe histologique, par Réaction antigène-anticorps, la présence de récepteurs antigéniques cellulaires Intranucléaires, membranaires ou cytoplasmiques. (HAMMAR. ; 2007)

Principe de l'immunohistochimie

Il s'agit d'une technique facilement accessible, peu onéreuse, qui reste une étape essentielle dans la démarche diagnostique. Elle permet la révélation de protéines spécifiques et de leur localisation cellulaire dans une coupe de tissu préalablement fixée en formol et incluse en paraffine.

Nous utilisons une technique d'immuno-histochimie indirecte permettant une amplification de l'intensité du signal obtenu après le marquage d'une réaction antigène-anticorps. La méthode consiste à mettre en évidence un antigène grâce à la fixation d'un anticorps primaire puis celle d'un anticorps secondaire couplé à un polymère inerte qui porte des enzymes.

Ce complexe est ensuite mis en évidence avec un révélateur dont l'hydrolyse produit un précipité de couleur marron. Les structures ayant fixé l'anticorps primaire sont donc facilement repérables avec cette coloration. Une contre-coloration à l'hématoxyline est effectuée, teintant les noyaux et les cytoplasmes en bleu. Toutes les structures apparaissent et le repérage microscopique des zones intéressantes est facilité. (TIAB *et al* ; 2013)

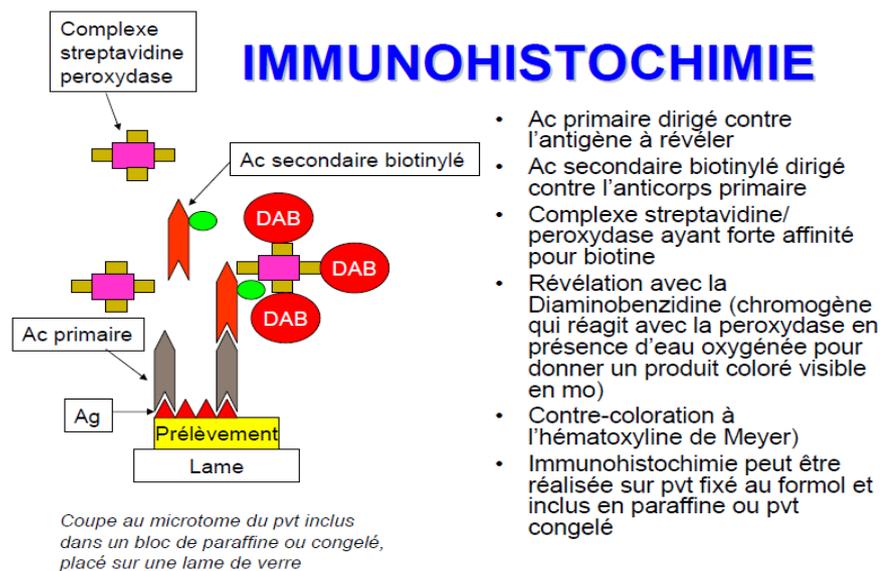


Figure 7 : principe de l'immuno-histochimie

II .5. b) La technique d'hybridation *in situ* par fluorescence FISH

La technique d'hybridation fluorescente (FISH ou fluorescent *in situ* hybridization) permet de repérer la présence d'anomalies chromosomiques par un système couplé anticorps-fluorophore. (LAHZAOUI. ; 2013).

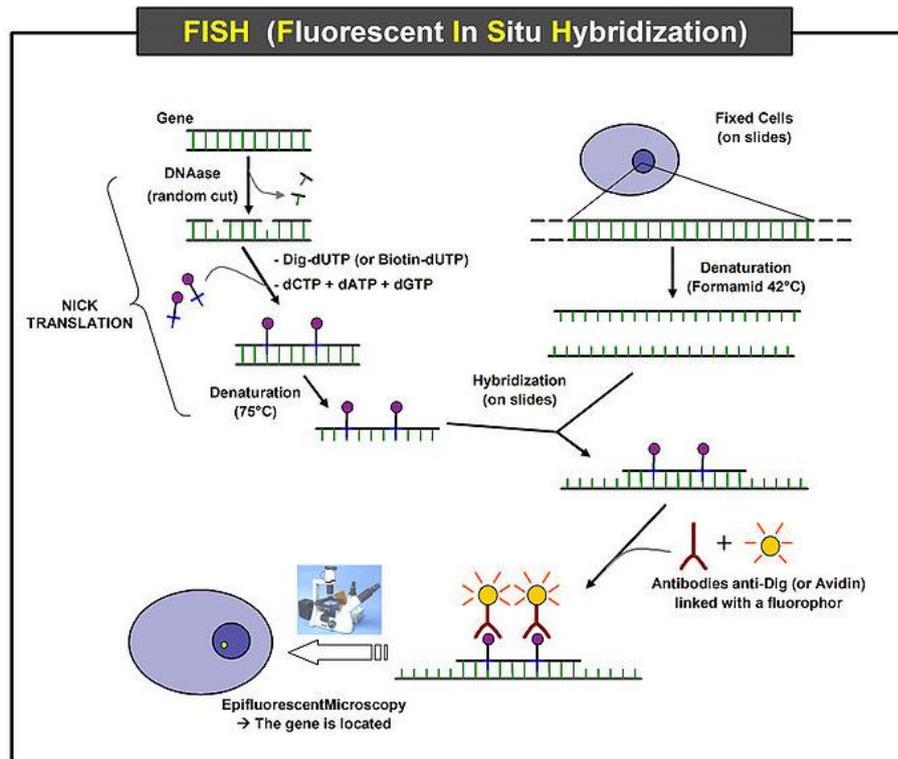


Figure 8 : principe de FISH

Dans le cas d'hybridation *in situ* par fluorescence (technique FISH), une sonde associée à une molécule fluorescente est appariée à une séquence complémentaire. Le marquage de la sonde se fait soit directement par des fluorochromes ou par l'incorporation de nucléotides marqués. La détection et la localisation de la sonde se font par visualisation directe de nucléotides fluorescents ou par immunofluorescence indirecte à l'aide d'anticorps conjugués à des fluorochromes dirigés contre la biotine ou la digoxigénine.

Cette technique est utilisée sur des préparations tissulaires, cellulaires ou chromosomiques. La révélation est effectuée au moyen d'un microscope à fluorescence. Lors de cette procédure, plusieurs sondes avec des fluorophores différents peuvent être utilisées et détectées simultanément. Certains tests utilisent une sonde HER2 seule, alors que d'autres incluent la sonde centromérique du chromosome 17. La technique FISH est considérée comme une méthode sensible et précise (KHODJA *et al* ; 2012).

II. 6. Algorithme de test du HER2 dans le cancer gastrique

L'éligibilité des patients au trastuzumab dépend de la démonstration de la surexpression protéique ou de l'amplification du gène du marqueur HER2.

Le statut du marqueur HER2 en cancer gastrique doit d'abord être évalué par IHC, pour ensuite être confirmé par HIS pour les cas équivoques (2+ obtenus en IHC) (JIM BOULANGER *et al*; 2011)

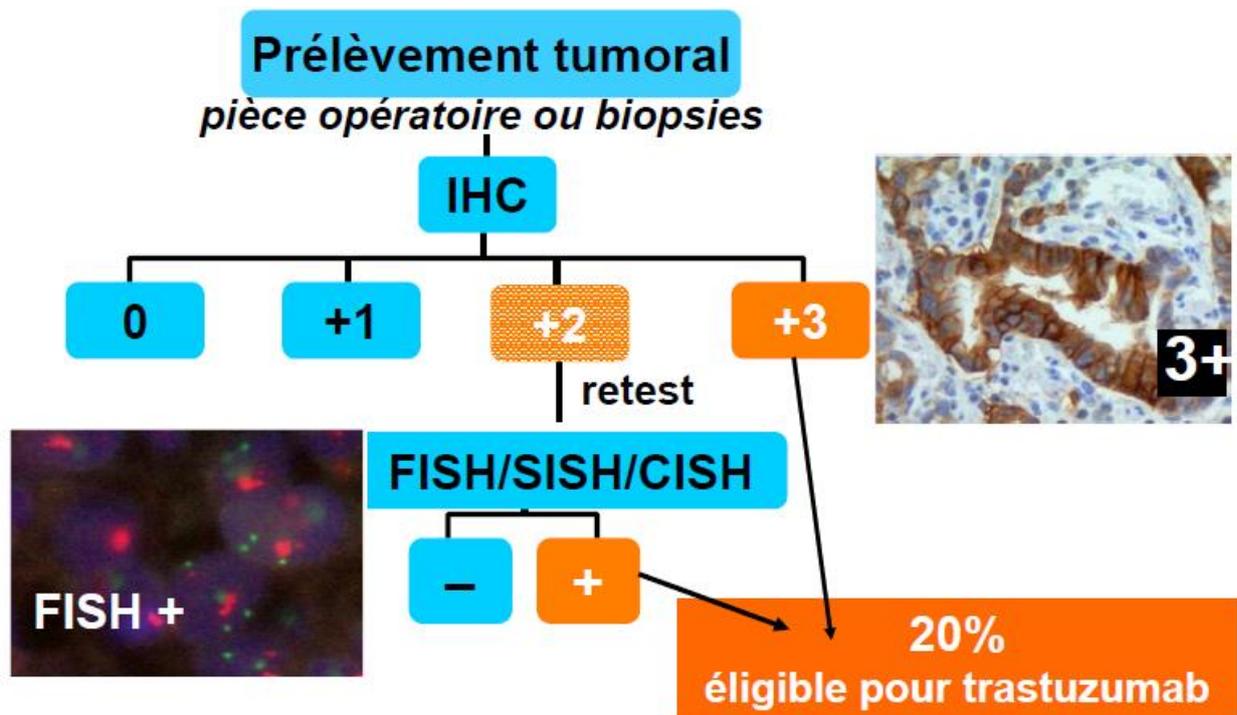


Figure 9 : Algorithme des tests HER2 dans les cancers gastriques (OLIVIER *et al* ; 2011)



Matériels et méthodes

II. MATERIEL ET METHODE

Une surexpression et/ou une amplification de HER2 a été détectée dans 15 à 25 % des carcinomes gastriques localement avancés. Comme dans le cancer du sein, un statut HER2 positif est un facteur pronostique péjoratif du fait de l'agressivité de la maladie et de la diminution de la survie.

Notre étude dont le but est d'évaluer le statut Her2 par la méthode d'immuno-histochimie avec confirmation des score 2+ par la méthode hybridation *in situ* par fluorescence (FISH) ainsi qu'évaluer la prévalence de la surexpression de Her2 au niveau des cellules tumorales à partir d'une série homogène de 30 patients atteints d'adénocarcinomes gastriques colligée au Service d'Anatomie Pathologique du CHU Mustapha bacha à Alger.

Ce travail est développé à partir de 3 volets :

- Etude épidémiologique des patients atteints de cancer gastrique.
- Identification des types histologiques
- Evaluation du statut de la protéine HER2

Notre stage pratique a duré 6 mois à partir du mois de janvier au mois de juin 2016.

II-1 Matériel

II 1-1 Echantillonnage

Notre échantillonnage est représenté par des fragments de lésions tumorales gastrique inclus dans des blocs de paraffine archivés ou à partir des biopsies ou pièces opératoires , suivie d'un examen macroscopie et anatomopathologique en se référant aux fiches des malades.

Les biopsies sont réalisées au cours d'une fibroscopie digestive haute œso-gastrique alors que les pièces opératoires sont obtenues à partir d'une gastrectomie partielle ou totale (annexe I)

II 1-2 Appareillages et réactifs

Plusieurs appareils et réactifs spécifique ont servi lors de la réalisation des techniques histo-pathologique ; immuno-histochimie et hybridation in situ par fluorescence (FISH).

Etude histologique (annexe I)

Réactifs	Appareillage
formol tamponné (formaldéhyde à 10%)- solutions d'alcool à différentes concentrations xylène (solvant organique) paraffine (fondue) Eau courante Eau distillée Hématoxyline Eosine Eukite Lame d'étalement lamelles	Appareil à circulation Appareil à l'inclusion Microtome Bain marie Etuve

Tableaux I : Matériel histologie

Kit d'immuno-histochimie (annexes I)

Réactifs	Appareillage
Lames silanisées Micropipettes Lamelles Solution de PH (9 ,6) Eau oxygéné(H ₂ O ₂) Solution d'anticorps I aire (spécifique) : AC anti-HER2 herceptin AC polyclonale 4B5)	Etuve Microtome Bain marie

<p>Solution PBS (phosphate buffered saline): chlorure de sodium, du phosphate disodique, du phosphate monopotassique et un peu de chlorure de potassium.</p> <p>Solution d’anti corps C secondaire (polymérase d’enzyme couplé avec la peroxydase)</p> <p>Solution DAB chromogène</p>	
---	--

Tableaux II : Matériel immuno-histochimie

FISH HER2 (KIT DAKO K 5731): (annexes II) et (annexes III)

Réactifs	Appareillage
<p>Wash</p> <p>solution pré traitement</p> <p>pepsine</p> <p>sondes HER2</p> <p>ciment colle ; montage fluorescent DAPI</p> <p>Lames silanisées, 2 éponges</p> <p>Micropipettes ; tampon de stringeance</p>	<p>Vortex</p> <p>l’hybridizer (thermobrite)</p> <p>Bain marie (FISH)</p>

Tableaux III : Matériel de FISH

II -2. Méthode

II-2.1 Etude épidémiologique des patients atteint des cancers gastriques :

II-2.1.1 Fiches d’études :

L’analyse épidémiologie est établie à partir des fiches médicales accompagnants les prélèvements dont les numéros de dossier sont puisés des registres d’anatomie pathologique

Cette étude à porté sur 30 cas de cancer gastrique sur un intervalle de 1 an s'étalant de 2015 à 2016.

Les paramètres étudiés sont :

- ✓ L'age de malade
- ✓ Le sexe
- ✓ La localisation anatomique de lésion

II-2.2 Identification des types histologiques :

La détermination des types histologique du cancer gastrique est établie sur les 30 cas à partir des fragments tumoraux archivés et des prélèvements colligés au laboratoire d'anatomopathologie ; ces prélèvements sont traités par trois techniques histopathologie ;immuno-histochimie et FISH

II-2.2.1 Histopathologie

La lecture microscopique des lames nous permet de relever les caractéristiques de la masse tumorale étudiée :

- la qualité du prélèvement.
- le siège du prélèvement.
- la classification de l'organisation mondiale de la santé (OMS).

Les étapes de la technique histo-pathologique sont :

1-La fixation :

Consiste à immerger le tissu dès qu'il est prélevé dans une solution de formole à 10% environ 10 fois plus important que le volume de tissu à fixe :

- 4 à 6 h pour les biopsies
- 24 à48 h pour les pièces opératoire

Le but de la fixation est d'immobilisation des structures des tissus et les composants dans un état semblable à l'état vivant.

En effet, le prélèvement des tissus provoque leur mort : les cellules déversent leurs enzymes, ce qui provoque une autodigestion du tissu. De plus, à l'air ambiant, les prélèvements peuvent être contaminés par des bactéries, ce qui entraîne une putréfaction des tissus.

2-La macroscopie :

- elle est basée sur l'examen à l'œil nu ou à l'aide d'une loupe ; après la fixation les biopsies sont mesurées et mises en cassettes en totalité ; par contre les pièces opératoires sont mesurées ; puis noter l'aspect ; la taille ; la couleur : la distance et la consistance des lésions tumorales ; ensuite chaque prélèvement est placé dans une cassette numérotée.

3- Déshydratation :

- Se fait par passages successifs dans des bains d'alcool de degré croissant 70 % ; 75% ; 80% ; 90% ; 100% pendant 10 h
- Cette étape consiste à chasser l'eau qui existe dans le tissu.

4- Eclaircissement :

- Assure par un produit appelé xylène ; sa consistance a enlevé l'alcool et par conséquent préparé le tissu l'imprégnation.

5-Imprégnation et inclusion :

Après le passage successive dans les bains de paraffine entre 58 à 60°C ; les fragments sont inclus dans des moules en métal et des cassettes en plastique qu'on remplit de paraffine liquide ; ensuite on dépose les moules sur une plaque refroidissement au bout de quelque minute la paraffine se solidifie ; on obtient un bloc ou prélèvement.

6- Coupage par le microtome :

Les blocs de la paraffine sont au réfrigérateur pour les refroidir afin de pouvoir effectuer

Les coupes fines 3 à 4µm.

L'opération consiste d'abord à débiter le bloc c'est dire enlever le surplus de paraffine ; jusqu'à amener à la surface de prélèvement pour effectuer des coupes fines.

7-Etalement :

Les rubans de coupe effectuée en microtome sont ensuite étalés sur des lames qui portent le numéro de prélèvement.

8-Déparaffinage et réhydratation :

Les lames sont placées dans des paniers qu'on met dans une étuve 80°C pendant 30 minutes pour enlever la paraffine ; puis les plonger dans des bacs d'xylènes pendant 10 à 15 minutes ; et ensuite dans des bains d'alcool de degré décroissant.

9- Coloration Hématoxyline Eosine

Déparaffinage après l'coupe et l'étalement 20min dans une étuve (64°C à 80°C)

Passage dans xylène 20min (hydratation des coupes)

Rincer à l'eau courante 10 min

Passage dans l'hématoxyline (10 à 15 min)

Rincer à l'eau courante 30s

Après la passage de la 1^{er} différenciateur (l'acide hydro-chlorhydrique) quelque seconde pour éliminé l'excès d'hématoxyline

Rincer à l'eau courante 30 s

Après le 2^{eme} differenciateur (l'ammoniaque) passage quelque seconde

Rincer à l'eau courante 30 s

Passage dans l'éosine 2 à 3 min

Rincer à l'eau courante 30 s

10- Montage :

- Les lames sont ensuite parsemées de quelques gouttes d'Eukit et recouvertes de lamelles sans y laisser de bulles
- Le but de cette étape de conserve et protéger les pendant plusieurs d'année.

11- L'observation microscopique :

L'observation microscopique réalisée à l'aide d'un microscope, aux différents grossissements (X40;X100;X200 ; X400).

II-2.2.2 L'Immuno-histochimie

La technique d'immuno-histochimie passe par différentes étapes aussi importantes les unes que les autres allant de la préparation de tissu à l'interprétation de la technique

1. la réalisation des coupes :

- Coupes au microtome de 3 à 4 μm d'épaisseur fines et régulières
- Etalement des coupes sur des lames silanisées à l'aide d'un bain marie ou sur une plaque chauffante
- Évite les plis

2. Incubation 1 : les lames sont incubées à 55°C pendant 24 heures dans une étuve

3. Déparaffinage : 4 bains de xylène 5 min

4. Réhydratation : Alcool 100% 2X 5 min

Alcool 95 % 5 min

Alcool 70% 5 min ; Eau plusieurs bains quelques minutes

5. Démasquage des sites antigéniques (pré traitement) : Placer les lames dans une solution de PH préalablement préparée (PH 6.PH9) selon le type d'anti corps spécifique utilisée .

6. Incubation 2 :

- mettre les lames enrobées dans la solution de PH dans un bain marie à 95°C pendant 40 minutes.
- plonger les lames dans l'eau distillée pendant 5 minutes
- Arranger les lames dans un plateau humidifié, et contourner le tissu à l'aide d'un dako pen.

- Ajouter quelque gouttes d'eau oxygénée a la zone sélectionné son rôle consiste à empêcher l'éclatement des cellules, et laisser agir 5 minute.

7. Introduction d'AC I : AC anti-HER2 (herceptine AC polyclonale 4B5)

- Ajouter 100 µl de solution contenant l'AC couvrir le plateau et laisser agir pendant une 30 minutes
- passage des lames dans 2 bains contenant du PBS, et laisser 5minutes dans les deux derniers bains.

8. Introduction d'AC II : polymérase d'enzyme couplé avec la peroxydase

- Ajouter l'AC II commun pour toutes les lames et laisser agir 30 minutes.
- Lavage dans du PBS 5 minutes.

9. Révélation :

- Se fait par le chromogène-substrat DAB et rincer avec l'eau distillé

10. Contre coloration :

- Immerger les lames 2 à 3 minutes dans l'hématoxyline de Mayer
- rincer a l'eau courant (5 minutes)
- plonger les lames dans un bain d'eau ammoniacuée pour donner une coloration bleu au tissu,
- puis déshydrater et éclaircir.

11. Montage :

Les lamelles sont déposées sur les lames à l'aide d'huile d'immersion.

12. Observation à la microscopie optique

Caractéristiques du marquage HER-2 en IHC	Score/classification
- Pas de marquage ou marquage membranaire rare dans moins de 10 % des cellules tumorales si résection / moins de 5 cellules cohésives si biopsie	0/négative
- Marquage membranaire faible dans plus de 10 % des cellules tumorales si résection / plus de 5 cellules cohésives si biopsie - Visible au fort grossissement ($\times 40$)	1+/négative
- Marquage membranaire complet, basolatéral ou latéral faible à modéré dans plus de 10 % des cellules tumorales si résection / plus de 5 cellules cohésives si biopsie - Visible au grossissement intermédiaire ($\times 10-20$)	2+/équivoque > nécessite contrôle par FISH
- Marquage membranaire complet, basolatéral ou latéral modéré à intense dans plus de 10 % des cellules tumorales si résection / plus de 5 cellules cohésives si biopsie - Visible au grossissement faible ($\times 2,5-5$)	3+/positive

Tableaux V : Classification du marquage HER2 en IHC dans le cancer de l'estomac (SOULARUE. ; 2014)

II-2.2.3 Protocol de FISH HER2 (KIT DAKO K 5731): (annexes IV)

Faire des coupes entre 4 à 6 μm

Utilise des lames silanisées pour l'étalement des coupes

Bains de xylène /5min

2Xbains éthanol /2min de 100%

2Xbains éthanol/ 2min de 70%

Wash/2min

Mettre dans la solution pré traitement /10 min à 95°C

COOL (refroidir à Température ambiante 15 min)

2X Wash/3min

Enlevez l'excès de la solution de lavage et bien essuyé autour des coupes.

Ajouter la pepsine 5 à 8 goutte pendant 15 min à température ambiante

Jeter la solution de pepsine

2X Wash /3min

Bain éthanol 70% /2min

Bain éthanol 85%/2min

Bain éthanol 96%/2min

Air dry /15min

Ajouter 10 µl du mix de sondes HER2 /centre après avoir bien mélangé au vortex+++

- Le geste doit être rapide car la solution est sensible à la lumière
- Bien mélangé le contenu de flacon car le volume est très petit.

Immédiatement mettre les lamelles et sellés avec le ciment colle.

Mettre les lames dans l'hybridizer (thermobrite) et choisir le programme 4(déjà enregistré sur l'appareil)

Vérifier que les 2 éponges d'humidification sont bien en place dans le thermobrite

Mettre les lames dans le tampon de stringeance à température ambiante

Enlever les lamelles délicatement

Placer les lames dans le tampon de stringeance dans le bain marie 63C° pendant 10 m

2X Wash /3min

Bain éthanol 70%/2min

Bain éthanol 85%/2min

Bain éthanol 96% /2min

Sécher a température ambiante /15min

Ajouter 15 µl du milieu de montage fluorescent DAPI

Immédiatement mettre les lamelles

Incuber 15 min à l'abri de la lumière

La lecture des lames peut être faite juste après les 15 min

Si les lames ne seront pas immédiatement utilise mettre les lames couverte dans un clinex chacune séparément dans une boîte a l'abri de la lumière et conserver a -20C° jusqu'à lecture des lames.

NB 1 : les solutions de pré traitement ; de lavage (Wash) de stringeance doivent être préparées au préalable.

NB2 : selon les cuves utilisées le volume des solutions à préparé est de 200ml en moyenne à adapter au volume de la cuve utilise

NB3 : les solutions fournis dans le kit sont 20X concentrés et doivent être dilué au 1/20éme.



Résultats

Dans notre travail, nous présentons des résultats préliminaires de l'étude et ce depuis de mois janvier au mois juin 2016. Nous avons inclus durant cette période 30 patients ayant un cancer gastrique.

Les résultats étaient comme suit :

1. Paramètres épidémiologiques.

A. Le sexe :

On note une prédominance masculine avec un sexe ratio M/F de 2. (20 hommes et 10 femmes)

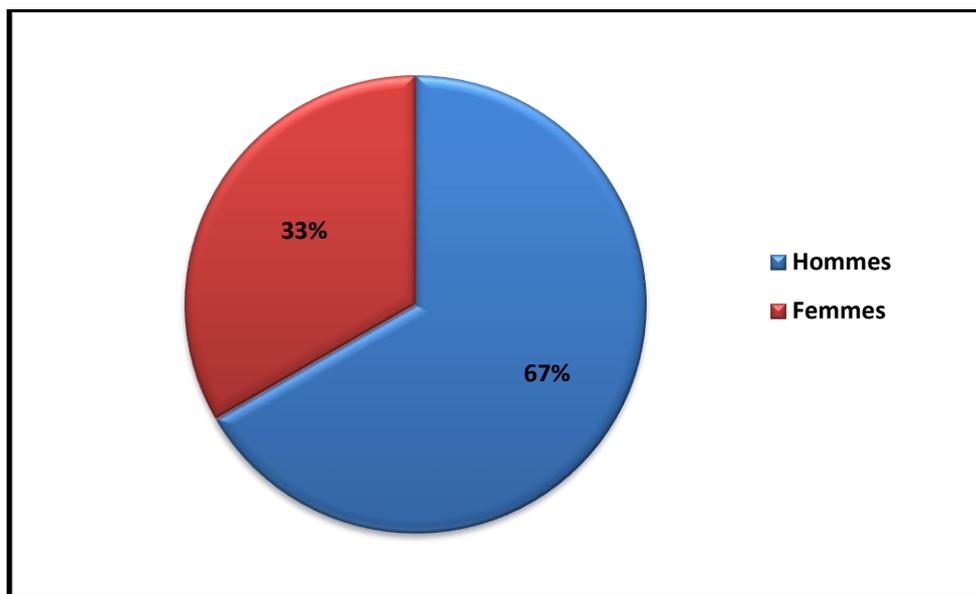


Figure 10 : Répartition des patients selon le sexe

B. L'âge :

L'âge de nos patients varie entre 41 et 79 ans avec une moyenne de 59.07 ans et un âge médian de 60 ans

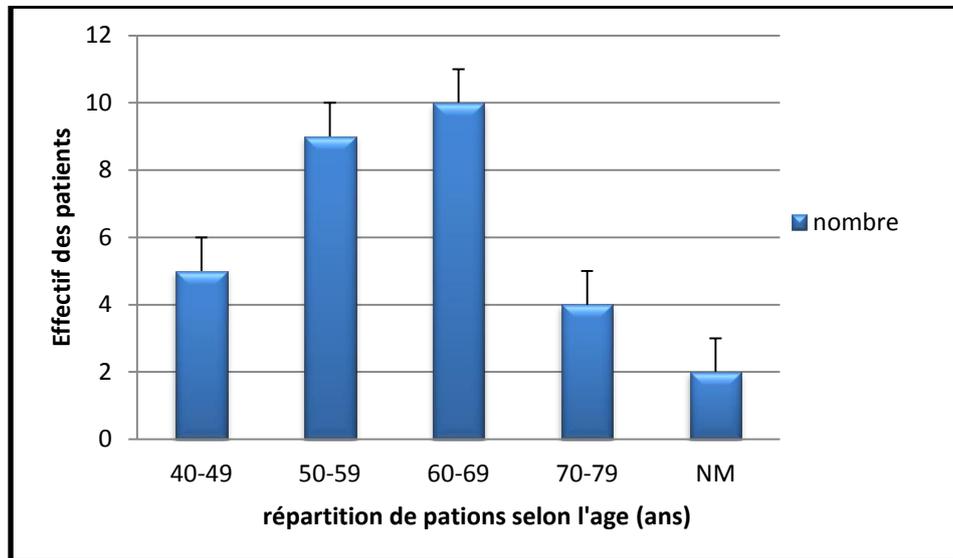


Figure 11 : Répartition des patients selon l'âge

2. Paramètres cliniques

a) Répartition selon le siège anatomique :

Chez nos patients ; le pourcentage d'apparition du cancer gastrique se diffère d'un site à l'autre. L'antro-fundique est le siège anatomique du cancer le plus fréquent des cas avec un pourcentage de 27% suivi par l'antre 17% des cas puis l'antro-pylorique et pylore avec 7% et enfin le fundus avec 6%.

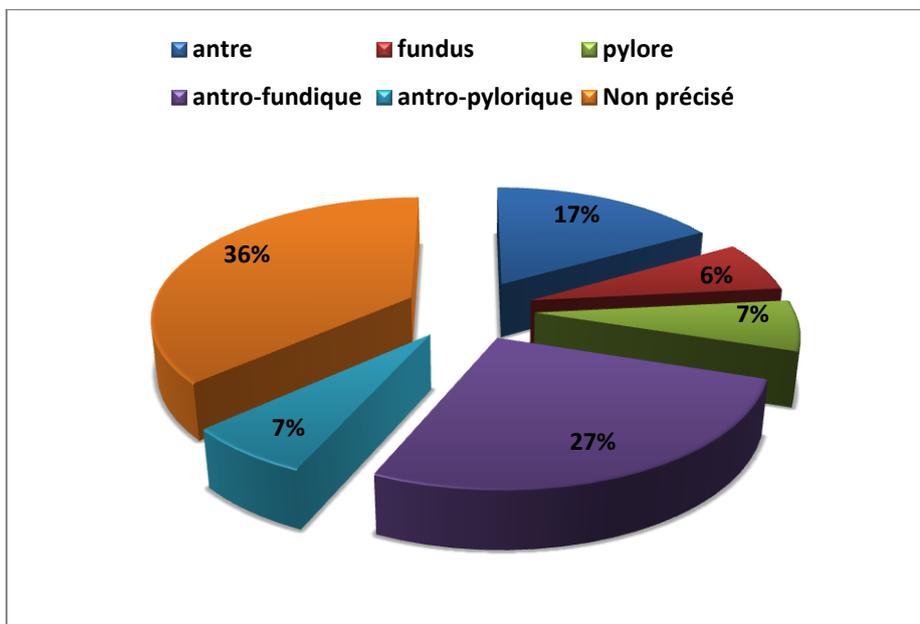


Figure12 : Répartition des patients selon le siège anatomique du cancer

b) Répartition des patients selon l'aspect histologique :

Les cas de notre étude ont été classés selon la classification OMS 2010 qui distinguent 5 types histologiques du cancer gastrique : 40% des cas (n : 12) présentent le type adénocarcinome à cellules indépendantes. Alors que 20% des cas (n : 6) montrent les types adénocarcinome tubuleux et adénocarcinome à cellules en bague à chaton. 17% des cas (n : 5) le type adénocarcinome papillaire .3% des cas (n : 1) présentent le type adénocarcinome mucineux.

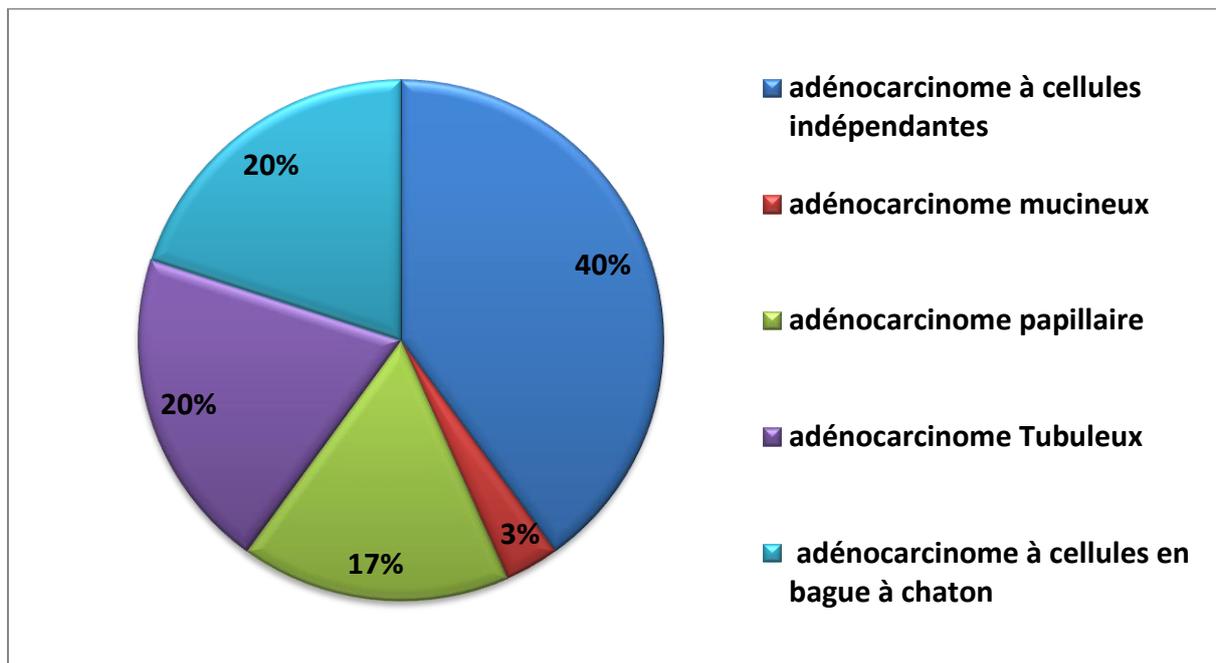


Figure13 : Répartition des patients selon l'aspect histologique du cancer

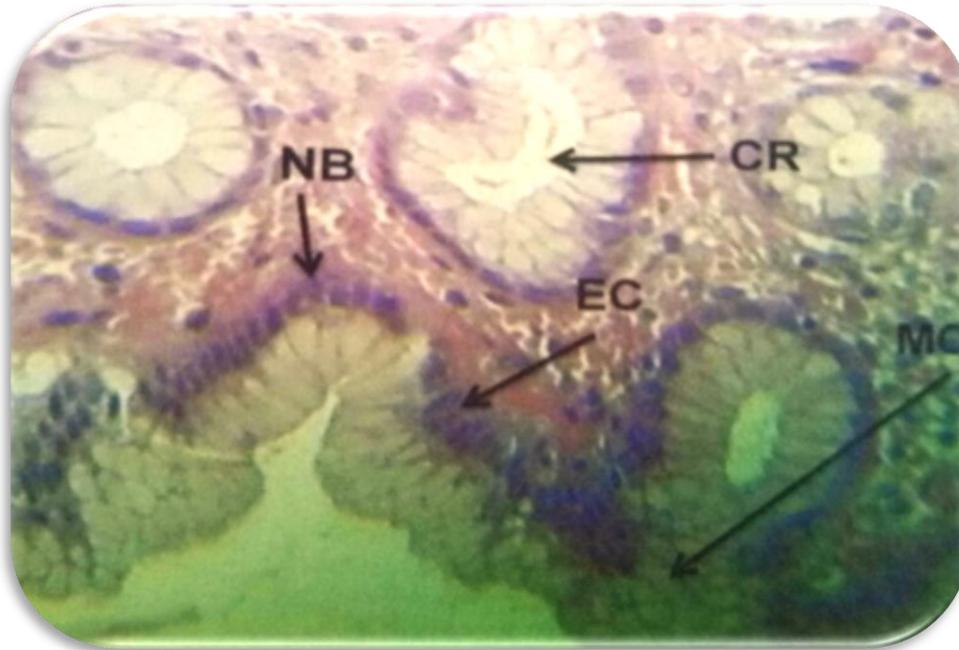


Figure 14: Structure d'une muqueuse gastrique normale

Coloration: HE; Gr x 400. CR: crypte ; EC : Epithélium cylindrique ; NB : noyau basal ; MC : mucine cytoplasmique.

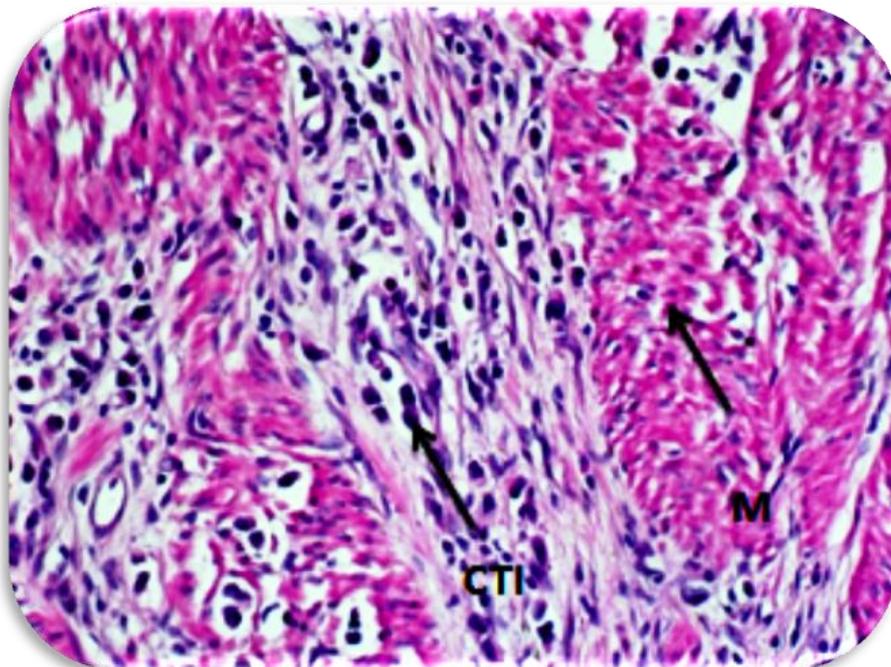


Figure 15: Structure d'un adénocarcinome à cellules indépendantes.

Coloration : HE; G x 40. M:muscle; CTI : Cellules tumorales isolées.

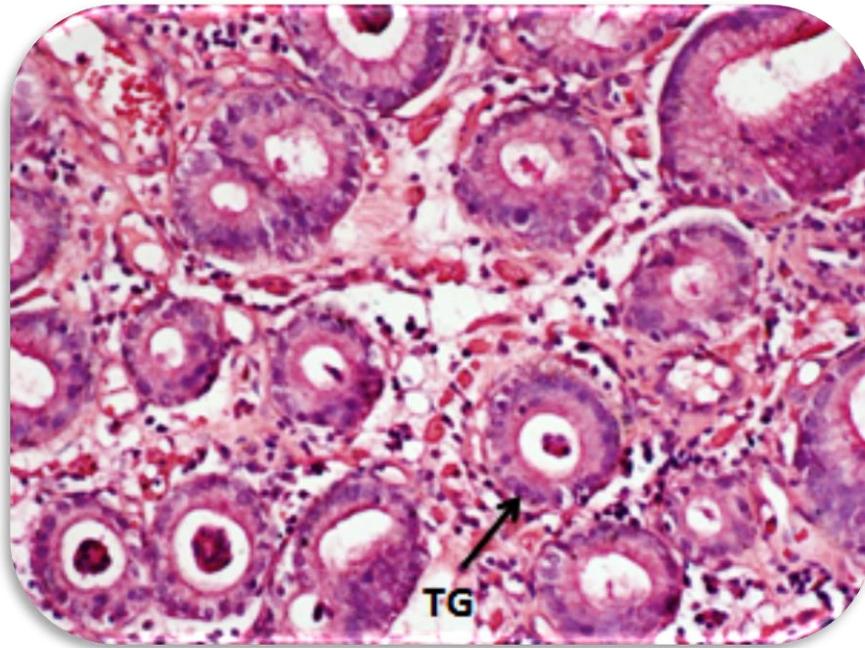


Figure16 : Structure d'un adénocarcinome tubuleux.

Coloration: HE; G x 40. TG: Tube Glandulaire

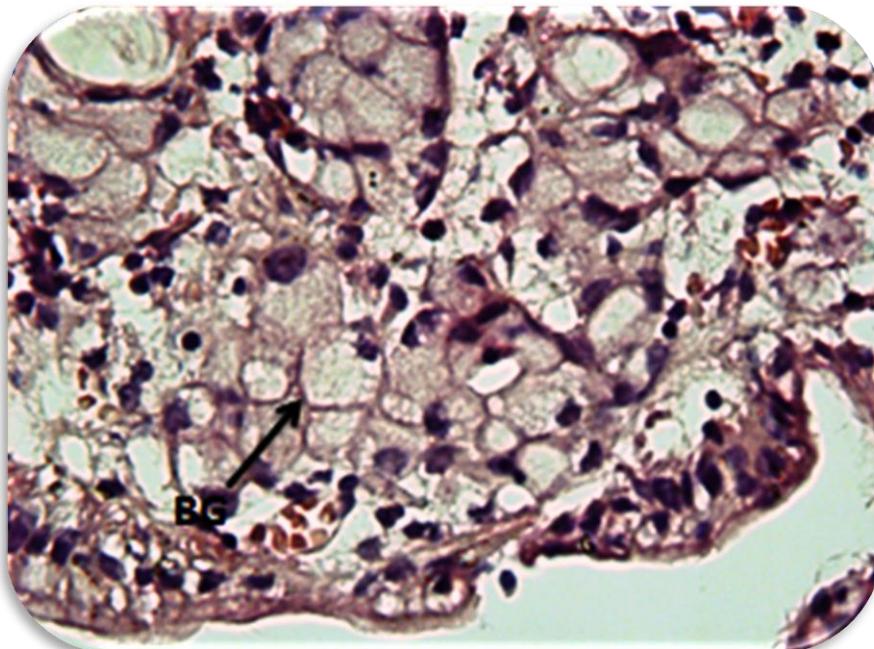


Figure 17: Structure d'un adénocarcinome à cellules en bague à chaton.

Coloration : HE; G x 40. BG: cellules en bague à chaton

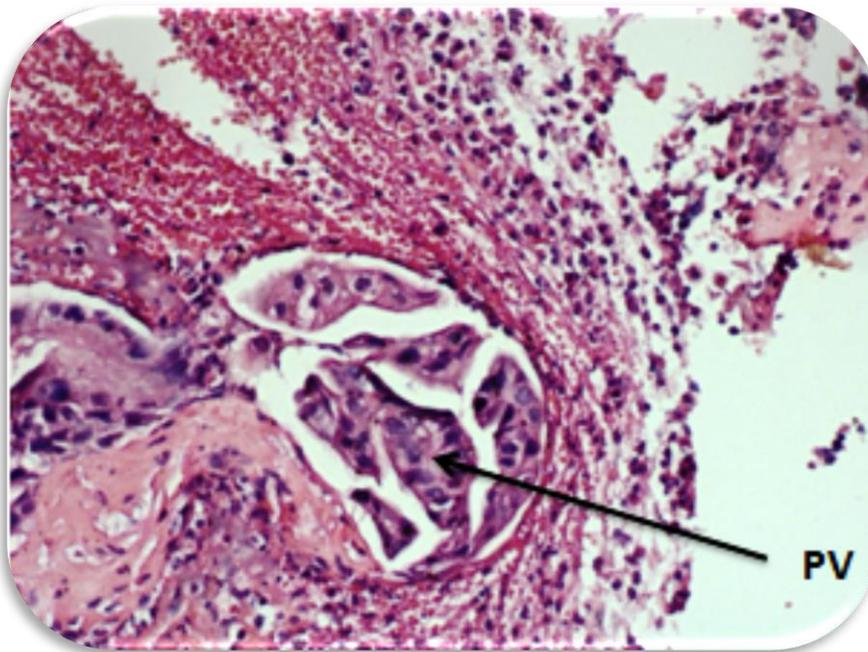


Figure 18 : Structure d'un adénocarcinome papillaire.

Coloration : HE; G x 40. PV: Papille à axe vasculaire.

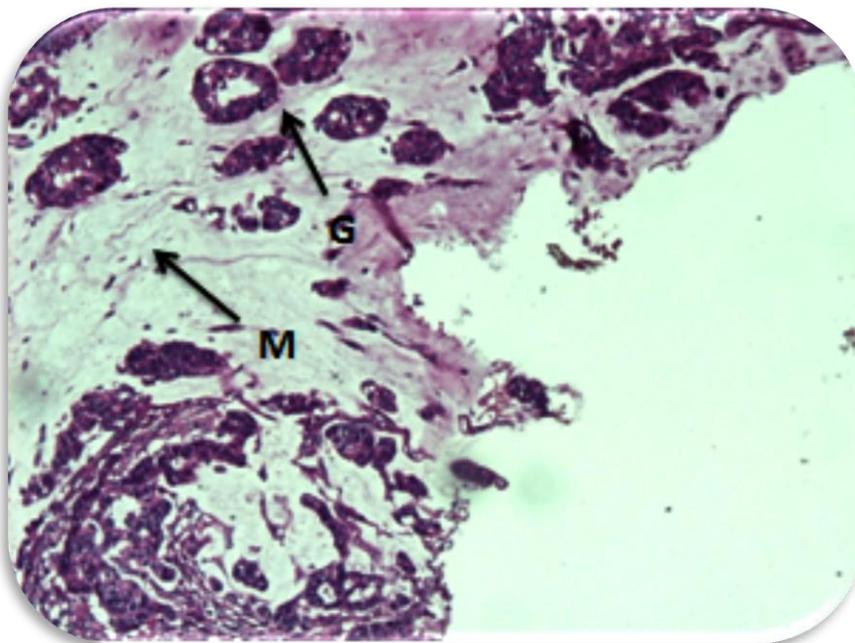


Figure19 : Structure d'un adénocarcinome mucineux.

Coloration: HE; G x 20. M: mucus; G: gland

L'expression du récepteur HER21. détermination du statut de la protéine her2 selon les nombre des cas :

Dans notre série 30 cas de 7% nos patientes sur expriment la protéine HER2 (score 3) contre 76% des patientes présentant un profil HER2 négatif (36% score 0 et 40% score 1) et 17% présentant un score 2 dans ce cas il est recommandé de confirmer le score refaisant la technique biologie moléculaire (FISH).

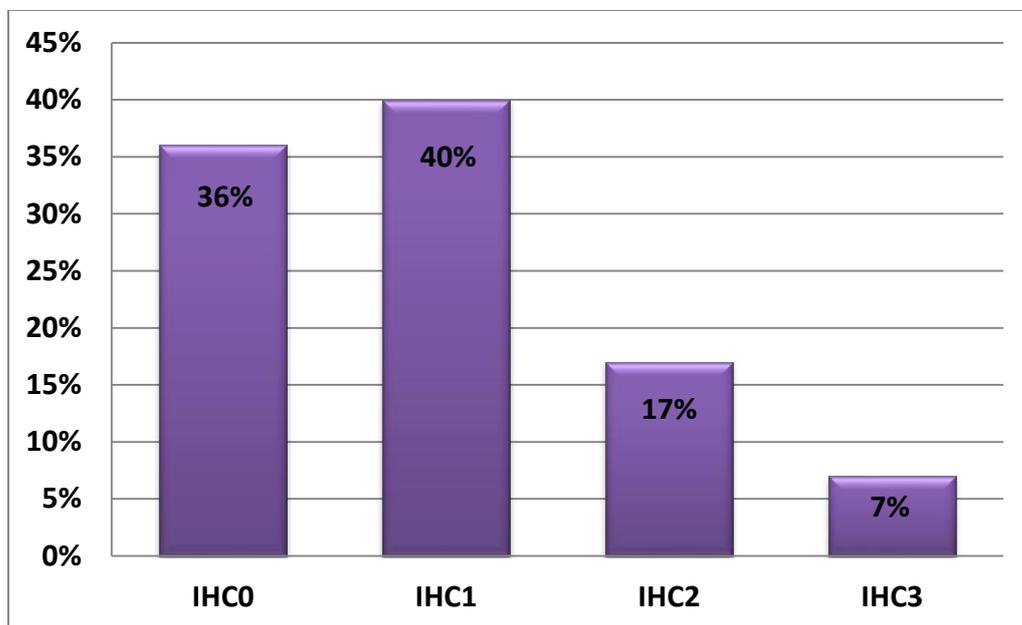


Figure 20 : Répartition des cas selon le statut HER2

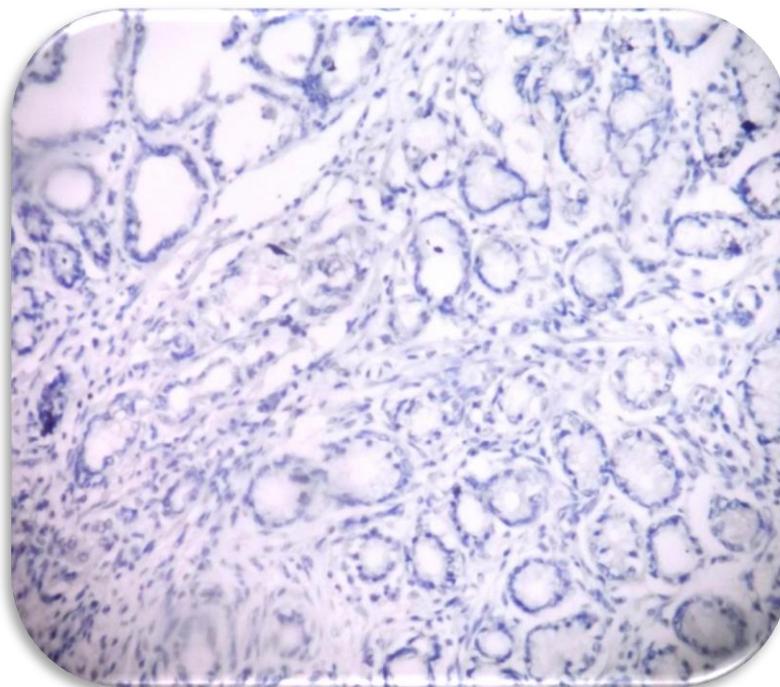


Figure 21 : Immuno-marquage négatif (HER2 score 0) d'adénocarcinome gastrique.

Gr x 200.

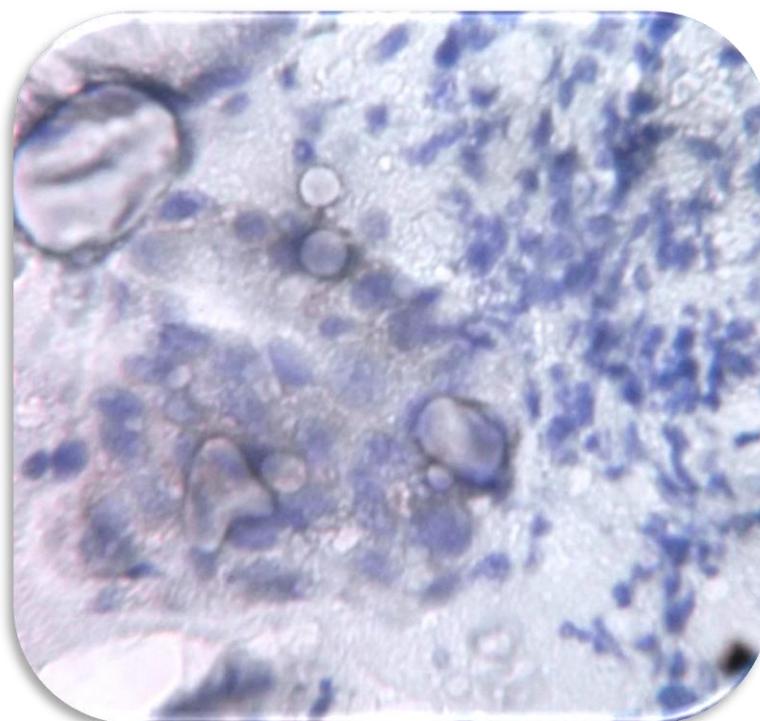


Figure 22 : Immuno-marquage membranaire (HER2 1+) d'adénocarcinome gastrique.

Gr x 200.

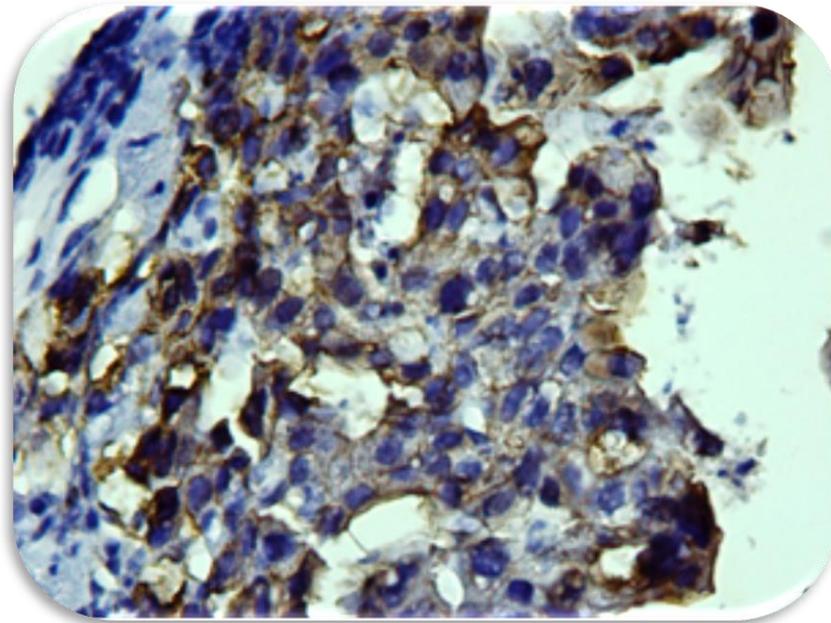


Figure 23 : Immuno- marquage membranaire (HER2 2+) d'adénocarcinome gastrique.

G: x 40.

Nous observons un marquage membranaire complet et intense dans plus de 10% de cellules.

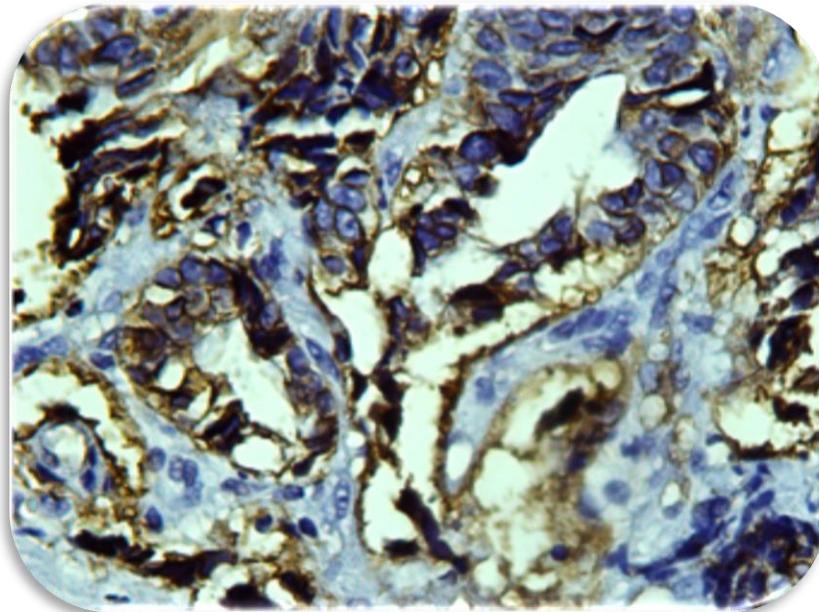


Figure 24 : Immuno-marquage membranaire (HER2 3+) d'adénocarcinome gastrique.

G: x 40.

Le marquage est complet ou basolatéral en (U) ; faible à modéré dans plus de 10% de cellules.

2. Détermination du statut de la protéine Her2 selon les types histologiques du cancer :

Dans notre série on marque 4 scores de l'Her2 selon le type histologique

Le Score 0 est marqué beaucoup plus chez les adénocarcinomes à cellules indépendantes

Le Score 1 chez les adénocarcinomes à cellules indépendantes, adénocarcinome à cellules en bague à chaton et adénocarcinome Tubuleux.

Score 2 chez adénocarcinome à cellules indépendantes et adénocarcinome papillaire

Score 3 très rare on n'a que 2 cas 1 adénocarcinome papillaire et adénocarcinome Tubuleux

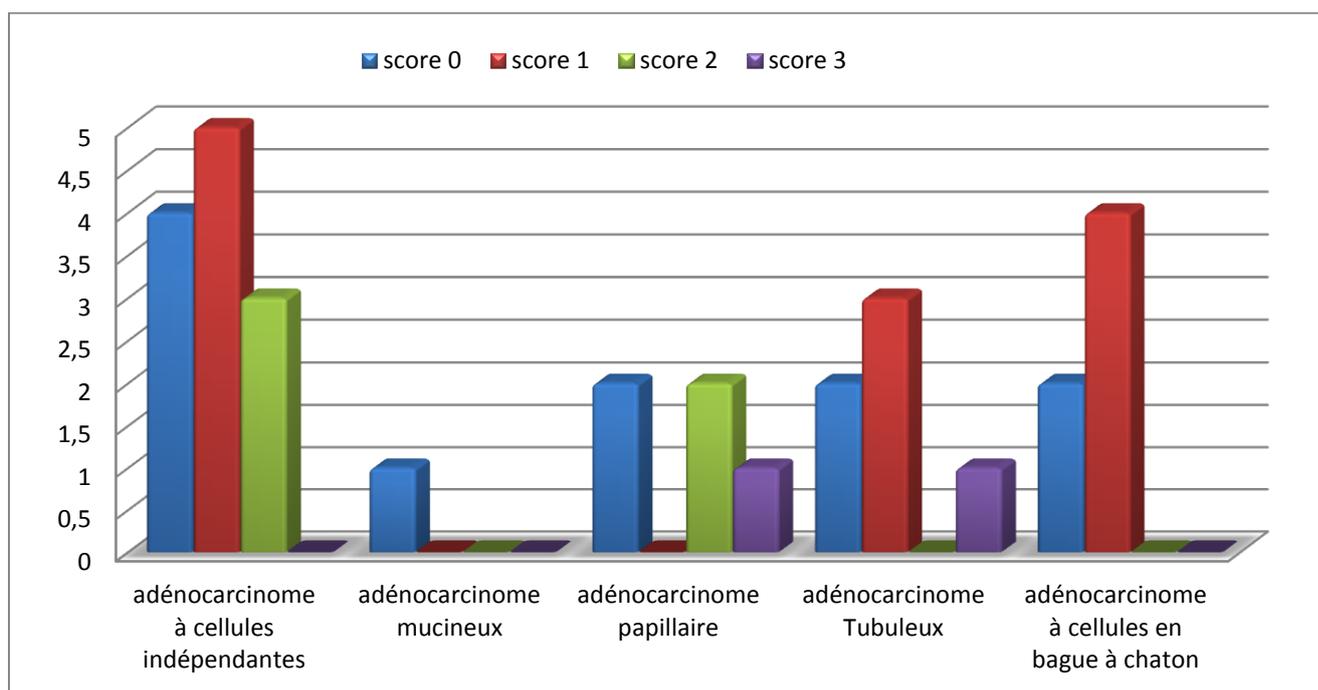
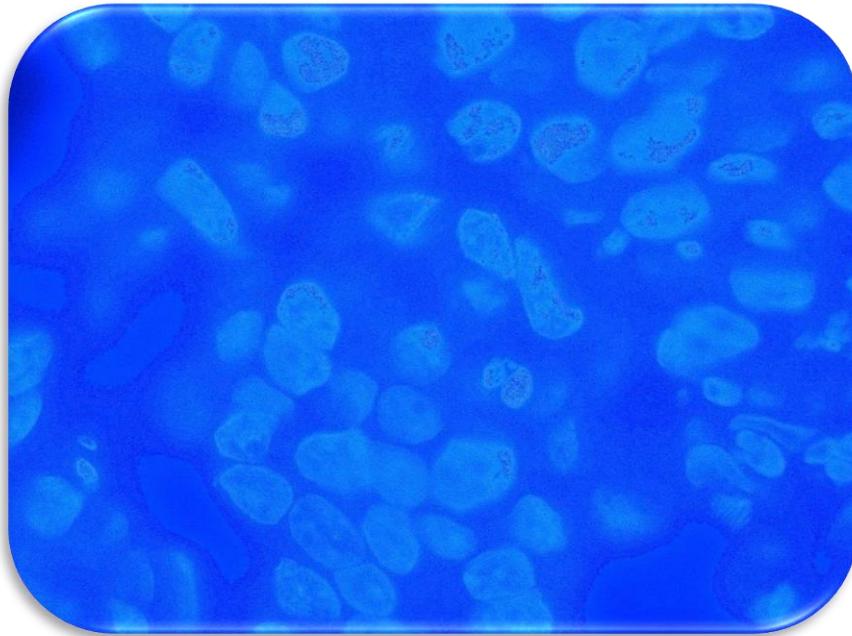


Figure 25 : Présentation la relation entre le score Her2 et l'aspect histologique

Résultats de la FISH

Nous a permis d'obtenir les résultats suivants :



3 spots rouges

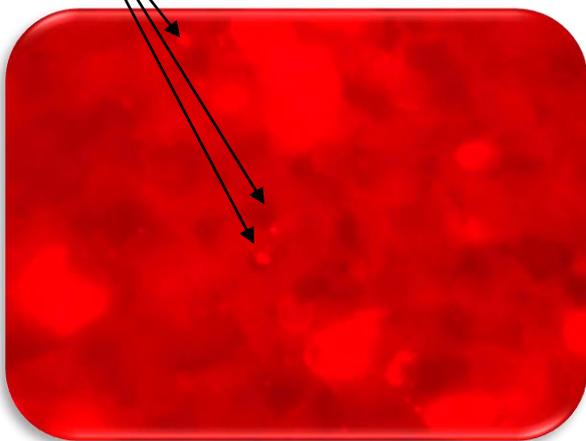


Figure 26 : Fish DAPI (noyau)

3 spots verts

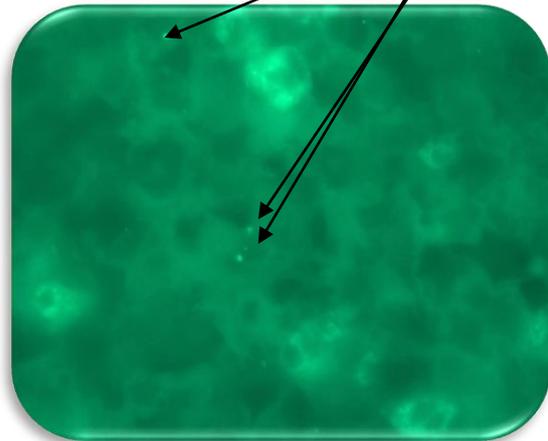


Figure 27 : 3 spots rouge (gène Her2) ; 3 spots verts (centromères du chromosome 17 avec ratio Her2/CEN17 = 1<2 ; Non amplifié



Discussion

Notre travail est basé sur une étude descriptive de 30 patients atteints d'adénocarcinomes gastriques dans la population algérienne. Ces patients sont colligés au Service d'Anatomie Pathologique du CHU Mustapha Bacha à Alger.

L'analyse des données épidémiologique témoigne une nette prédominance masculine avec 67% des cas (20 hommes) et 33% des cas (10 femmes) soit un sex-ratio de 2 M/F, il y a presque l'incidence du cancer gastrique est plus élevée chez l'homme que chez la femme. Ces résultats se rapprochent de ceux retrouvés par (BEN NEZHA.M ; 2008) qui ont montré que le cancer gastrique est plus fréquent chez l'homme. Avec de 71% des patients étaient des hommes et 29% étaient des femmes. Le sex-ratio est évalué à : 2,4 M/F. À travers le monde, dans une étude marocaine de (OUKDIM.I ; 2013) le cancer de l'estomac prédomine majoritairement chez l'homme avec une sex-ratio allant de 1 à 2,5. Presque les mêmes résultats que ceux trouver en France : le cancer gastrique touche plus souvent la population masculine de 66%, et un sex-ratio M/F de 2.5 (KANDEL.C ; 2009).

L'analyse des résultats obtenus indique que l'âge moyen de survenue est de 59.07 ans. Ce cancer est rare avant 41 ans avec des extrêmes de 41 et 79 ans. Leur incidence augmente ensuite jusqu'à l'âge de 60 ans. Des résultats similaires sont rapportés par (OUKDIM.I ; 2013) qui à montré que l'âge moyen du cancer de l'estomac est de 54.8 ans ; par contre en France l'âge moyen est de 75ans (KANDEL.C ; 2009).

D'après nos séries ; l'âge médian de l'apparition du cancer gastrique est de 60 ans des résultats comparable sont décrits par (KHERBANENE.T ; 2013) qui démontre que l'âge médian de la survenue de ce type de cancer est 65 ans ; par contre en France l'âge médiane est de 72 ans pour les hommes et de 77 ans pour les femmes (KANDEL.C ; 2009).

Selon le siège anatomique ; le pourcentage d'apparition du cancer gastrique diffère d'un site à l'autre. L'antro-fundique est le siège anatomique du cancer le plus fréquent des cas avec un pourcentage de 27% suivi par L'antre 17% des cas puis l'antro-pylorique et pylore avec 7% et enfin le fundus avec 6%. Par contre le siège le plus fréquent selon L'OMS 2010 est l'antre de 40% et aussi (EL KAADOUS.S ; 2009) qui montré que l'antre est le siège le plus fréquent (27.3%). (BEN NEZHA.M ; 2008) ont trouvé aussi 56%des cas dont le siège est l'antre. La grande fréquence de la localisation antro-fundique serait liée a la prévalence de l'infection à *HP* Ceci s'explique par la prédominance de cette localisation en Afrique car la prévalence de l'infection par cette bactérie est élevée (TOUNKARA.M ; 2012).

Sur le plan histologique ; Les cas de notre étude ont été classés selon la classification

OMS 2010 qui distinguent 5 types histologiques du cancer gastrique : 40% des cas (12 cas) présentent le type adénocarcinome à cellules indépendantes. Alors que 20% des cas (6 cas) montrent les types adénocarcinome tubuleux et adénocarcinome à cellules en bague à chaton. 17% des cas (5 cas) le type adénocarcinome papillaire .3% des cas (1 cas) présentent le type adénocarcinome mucineux. En effet, l'adénocarcinome à cellules indépendantes représente le type histologique prédominant (40%). rapporté aux résultats enregistrés par (LAHZAOUIT ; 2013) ont signalé aussi la prédominance l'adénocarcinome à cellules indépendantes (43.7%).

D'après les résultats d'analyse IHC effectuée sur 30 cas du cancer gastrique nous avons enregistré un pourcentage faible des cas HER2 (score 3) avec plus de 30 % de cellules marquées comportant un marquage d'intensité forte et complet alors que la majorité des cas 76% sont présentant un profil HER2 négatif (36% score 0 et 40% score 1) avec 10 % de cellules ayant un marquage d'intensité faible et incomplet et 17% présentant un score 2 dans ce cas avec au moins 10 % de cellules marquées ($\geq 10\%$) avec un marquage d'intensité faible ou modérée mais complet il est recommandé de confirmer le score 2+ par la technique biologie moléculaire l'hybridation *in situ* par fluorescences (FISH). Ces résultats concordent avec les résultats de (KHERBANENE.T ; 2013) qui à trouvé 7% des cas Her2 positive dans une population de 53 patients.

L'analyse des résultats d'immuno-marquage d'HER2 indique l'existence d'une variation d'expression De la protéine selon le type histologique ; la surexpression d'Her2 est très rare on n'à que 2 cas l'adénocarcinome tubuleux et l'adénocarcinome papillaire.

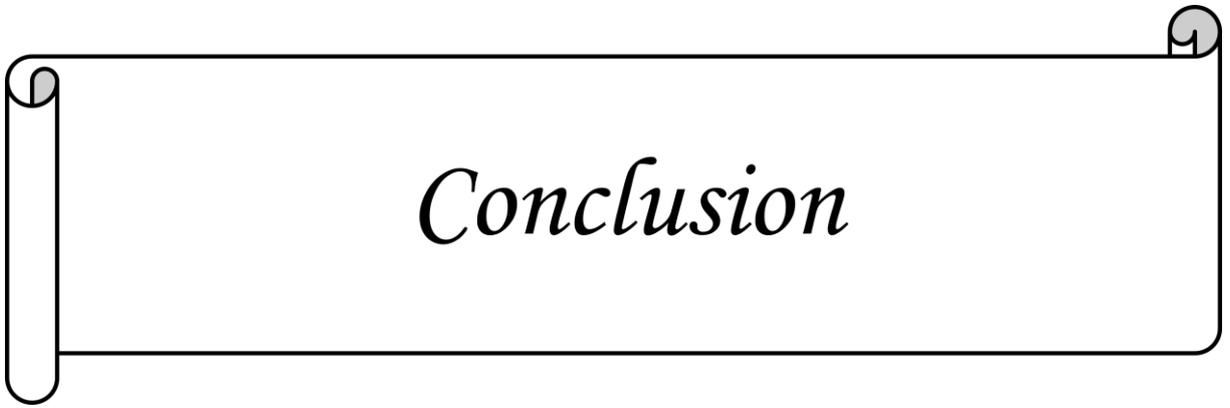
Alors que le score 0 est marqué beaucoup plus chez les adénocarcinomes à cellules indépendantes; le score 1 chez les adénocarcinomes à cellules indépendantes ; adénocarcinome à cellules bague à chaton et l'adénocarcinome tubuleux ; score 2 chez l'adénocarcinome à cellules indépendantes et l'adénocarcinome papillaire. D'après ces résultats nous remarquons que les scores 0 ; 1 ; 2 beaucoup plus exprimé dans l'adénocarcinome à cellules indépendantes. Les mêmes résultats sont décrits par (LAHZAOUIT ; 2013) ont démontré que le score 0 sont exprimé dans l'adénocarcinome à cellules indépendantes (48%).

La méthode de FISH est utilisée dans le domaine de la cancérologie à des fins diagnostiques ou d'indication de traitement spécifique dit cible. Cependant notre participation à un atelier pratique réalisé au laboratoire d'anatomopathologie au niveau du CHU Mustapha Bach sur la FISH appliquée sur 5 cas d'adénocarcinomes gastrique en ciblant le gène HER-2 ; nous a permis d'obtenir des résultats négatives sur les 5 patientes donc gène Her2 non amplifié. Selon (VINCENT-SALOMON.A ; 2012) La survenue de l'amplification de Her2 Était alors associée a une évolution défavorable de la maladie liée entre autres a une augmentation des capacités de prolifération et de croissance des cellules tumorales, conséquences de l'amplification de l'oncogène.

Un score 3+indique la plus forte expression protéique ; ces patients qui seront éligible pour être traités par un anticorps anti-Her2 ; le trastuzumab .l'anticorps trastuzumab se lie a la région extracellulaire de la protéine HER2 ancrée à la membrane. Cette interaction entraine l'internalisation du récepteur Her2 ; ce qui le rend inactif ; bloque leur dimérisation. Ce mécanisme empêche la prolifération des cellules cancéreuses .chez les patients IHC2+ ; leur statut Her2 est douteux ou ambigu (2+) et doit impérativement présenter une amplification ; contrôlée par l'hybridation *in situ* ; Pour être considéré comme positif et qui rendrait le patient éligible au traitement par trastuzumab (PENAULT-ILORCA.F ; 2007).

Les résultats de l'essai ToGA (traitement du cancer avancé) ont démontré que la survie globale dans le cancer gastrique métastatique Her2+ dépasse un an ; et ceci grâce à l'ajout de trastuzumab. La survie médiane passe en effet de 11 ; 1 mois avec la chimiothérapie seule et à 13.8 mois association avec la trastuzumab et le risque de décès est réduit de 26%. Seuls les patients IHC2+/FISH+et IHC3+ qui ont le plus bénéficié de l'ajout de trastuzumab à la chimiothérapie classique avec une survie globale de 16 mois contre 11.8 mois (BANG.YJ ; 2010).

La majorité de nos cas 76% sont IHC0 et IHC1 ces patients présentent un statut d'Her2 négatif à cause du faible marquage membranaire de la protéine. Leur statut doit être analysé par une autre technique qui présente l'amplification du gène Her2 (l'hybridation *in situ* par fluorescence FISH).



Conclusion

CONCLUSION

Notre étude de 30 cas de cancer gastrique est une étude rétrospective dans laboratoire d'anatomie pathologique du CHU de Mustapha bacha à Alger depuis du mois de janvier au mois de juin 2016, nous a permis de constater que les adénocarcinomes gastrique sont caractérisés par un sexe ratio de 2 M/F; Par un âge moyen d'apparition de 59.07 ans et un âge médian de 60 ans ; Le siège anatomique le plus touché est antro-fundique. Le type histologique prédominant est l'adénocarcinome à cellules indépendantes de 40%, la majorité des cas présentent les 2 types histologiques : l'adénocarcinome tubuleux et l'adénocarcinome à cellules en bague à chaton de 20% ; par contre la minorité des cas présentent le type histologique mucineux 3%.

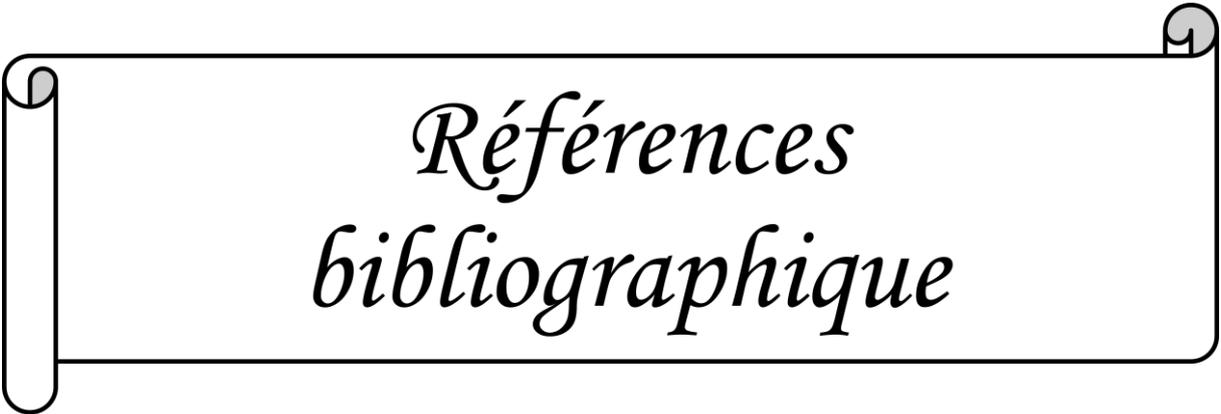
La protéine HER2 est fortement non surexprimée dans 76% : 36% score 0 est marqué beaucoup plus chez les adénocarcinomes à cellules indépendantes ; 40% score 1 est marqué chez les adénocarcinomes à cellules indépendantes , en bague à chaton et tubuleux ; par contre la protéine HER2 positive est faiblement surexprimée dans 7% « score 3+ » qui bénéficieront de la thérapie ciblé , Alors que 17% des cas avec statut Her2 positive « score 2 + » doivent être vérifié dans un seconde temps par la technique d'hybridation *in situ* FISH . Les résultats obtenu après l'examen de FISH : 3 copie Her2 et 3 centromère CEN17 par noyau donc absence totale d'amplification de la protéine HER2 .

A l'issu de ces résultats, nous pouvons conclure que :

La positivité du statut HER2 est en effet associer à un mauvais pronostic. L'immuno-histochimie (IHC) doit être le test initial et semble être une bonne stratégie pour détecter rapidement et à moindre cout les patients non susceptibles de bénéficier d'un traitement anti HER2 et le score 2+ confirmée par la méthode hybridation *in situ* par fluorescence (FISH).

Le test comprend la sonde Her2 seule, ou associer à une sonde centromérique du 17, permet la détermination de nombre de copies de chromosome. Le résultat de l'examen est donc donné en nombre moyen de signaux Her2 par noyau ou en rapport du nombre de signaux Her2 sur signaux centromérique. Si la tumeur montre un nombre moyen de plus de six copies du gène Her2 par noyau ou un rapport signaux Her2 par centromère 17 supérieur à 2.2 c'est dire un résultat positif permettant l'éligibilité des patients au traitement par trastuzumab.

La mise en évidence d'une amplification du gène HER2 par HIS est associée à un taux de survie plus élevé et que cette amplification pourrait être considérée comme une stratégie de sélection optimale pour les candidats à traiter avec des thérapies anti-HER2.



*Références
bibliographique*

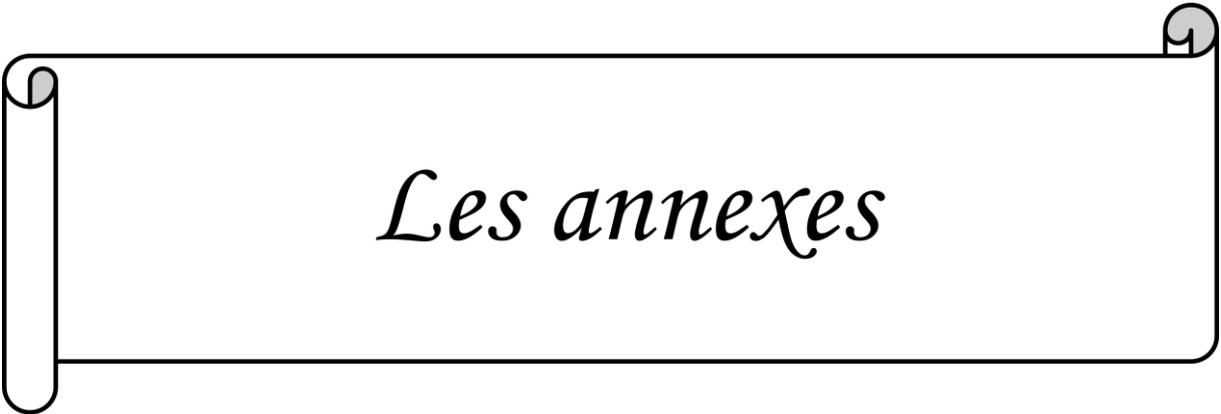
1. **ANNEMIE M. ; BOUCHE G. ; JEZDIC S. ; OKINES A. ; CUNNINGHAM D. ; ALLUM H. ; JOST L. ; 2014**-Qu'est ce que le cancer de l'estomac ? , le Fonds Anti cancer avec la permission de l'ESMO.2012(2) :1-32.
2. **BANG YJ. ; VAN CUTSEM E. ; FEYEREISLOVA A. ; CHUNG HC. ; SHEN L. ; SAWAKI A. ; 2010**- trastuzumab in combination with chemotherapy vs chemotherapy alone for treatment of HER2+ advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ToGA): a phase 3; open –label randomized controlled trial: 97-687.
3. **BELGHARBI S. ; 2014**-cancer de l'estomac. thèse de doctorat en médecine, faculté de médecine ,47p.
4. **BENDAHHOU K. ; BOUCHBIKA Z. ; KOTBI S. ; MEGRINI A. ; 2012**-registre des cancers de la région du grand Casablanca ; Ed: Lalla Salma de lutte contre le cancer : 88p.
5. **BEN NEZHA M. ; 2008**-cancer gastrique localement avance. thèse du doctorat en médecine, Faculté de médecine et de pharmacie –RABAT, 142p.
6. **BOUKRAA J. ; 2014**- Une centaine de cas de cancer de l'estomac enregistrés en six mois. Le quotidien Oran, 24-25.
7. **BRITEL D. ; 2009**- étude du statut de la protéine her22/neu dans le cancer du sein: par méthode immuno-histochimique ; THESE du Doctorat en Médecine ; faculté de médecine et de pharmacie –rabat ; 137 p.
8. **CHAUVIN L. ; 2015**- Voies de signalisation impliquées dans la sensibilisation des tumeurs mammaires au docétaxel par les acides gras polyinsaturés n-3 ; thèse du doctorat ; université François – Rabelais de tours ; 306 p.
9. **CHRETIEN A-S. ; 2011**-fonctionnalité de la signalisation en aval des récepteurs Her. thèse de doctorat en sciences de la vie et de la santé ; université Henri Poincaré ; 165p.
10. **COURILLON-MALLET A. ; 2008**-H.pylori et cancer gastrique : qui prévenir ? Ed : Villeneuve saint Georges Cedex .1- 6.

11. **EL FATEMI H. ; HAMMAS N. , IDRISSE K. , MELLAS N. , BENNANI A. , AMARTI A. , CAYRE A. , E PENNAULT-LLORCA F. , MESBAHI O. ;2012-** La recherche de la surexpression de la protéine et l'amplification du gène HER2 dans le cancer de l'estomac par immuno-histochimie et Hybridation in Situ: expérience du CHU HASSAN II de Fès ; Pan African Medical Journal. 13;79 :1-4.
12. **ELISABETH N. ; 2011-** plasticité tissulaire et cellulaire du filament branchial des lucinidae symbiotiques cotiers *Codakia orbiculata* et *Lucina pensylvanica* ; thèse de doctorat en biologie des organismes ; Université des Antilles et de la Guyane ; 198 p.
13. **EL KAADOUS S. ; 2009-**le cancer gastrique expérience de ucv à propos de 54 cas. thèse de doctorat en médecine, faculté de médecine et de pharmacie –RABAT, 219p.
14. **JIM BOULANGER M. ; BERNARD T. ; 2011-** Détection du marqueur HER2 dans le cadre du traitement du cancer gastrique et de la jonction gastro-œsophagienne ; Comité consultatif en anatomopathologie : 1-18.
15. **Jonathan F. ; 2009-**Helicobacter pylori dans un modèle de carcinogénèse gastrique impliquant les cellules souches mésenchymateuses. thèse du doctorat de sciences, technologies, santé, université Victor Segalen bordeaux2 ,288p.
16. **HAMMAR K. ; 2007-**implication de l'immuno-histochimie au pronostic des tumeurs mammaires et à la prise en charge thérapeutique ; Mémoire magister de biologie cellulaire ; faculté des sciences ; 203p.
17. **INSTITUT NATIONAL DU CANCER. ; 2014-**Les traitements des cancers de l'estomac, collection guide patients cancer inf.7(13) :1-96.
18. **GOUADFEL K. ; BADIS KH. ; 2013** – contribution à l'évaluation des nouveaux facteurs pronostique du cancer du sein et étude rétrospective sur une durée de 3 années ; mémoire de master II en sciences biologiques ; faculté des sciences biologique et des sciences agronomique ; 114p.
19. **KANDEL C. ; 2009-**la signalisation notch dans l'adénocarcinome gastrique de type diffus. thèse du doctorat en médecine, faculté de médecine, 66p.

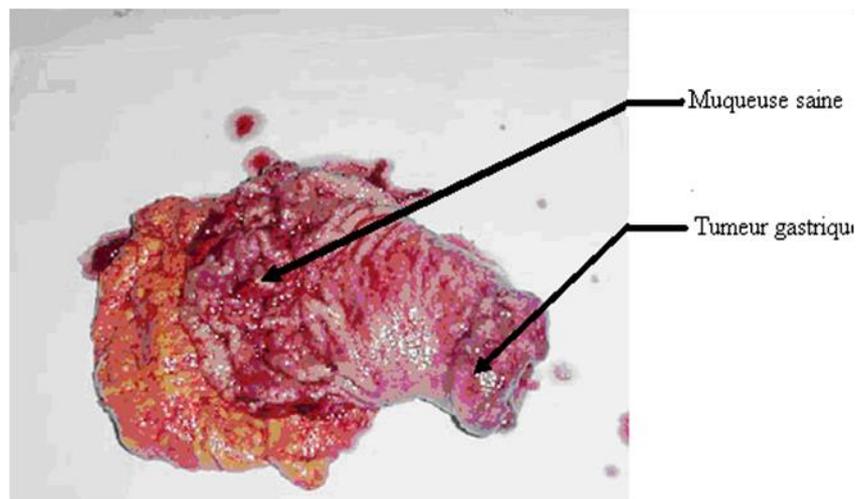
20. **KHERBANENE T. ; 2013**-contribution à la recherche de la surexpression de la protéine HER2 dans le cancer gastrique. ; mémoire de master en science de la nature et de vie ; faculté des sciences agrovétérinaires et biologiques : 40p.
21. **KHODJA R-H. ; LEPANTO L. ; 2012**- hybridation in situ argentique (dual-color sish) dans la détection de l'amplification génique de her2 dans les cancers gastriques à un stade avancé ; Direction de l'évaluation des technologies et des modes d'intervention en santé (DETMIS). Centre hospitalier de l'Université de Montréal ; 44p.
22. **LAHZAOUI T. ; 2013**- l'expression du récepteur her2 dans le cancer gastrique ou de jonction oeso-gastrique métastatique étude prospective à-propos de 30 cas ; thèse du doctorat en médecine ; faculté de médecine et de pharmacie ; 92 p.
23. **LAURENT-PUIG P. ; LIEVRE A. ; 2010**- La voie de signalisation RAS/MAPK ; Cancer dig. Vol. 2 N° 1 : 38-42.
24. **LEROUX A. ; 2014** - Rôle du pharmacien d'officine dans la prévention et la prise en charge des effets indésirables liés aux traitements anticancéreux de la famille des inhibiteurs de tyrosine kinase. ; Thèse en doctorat en Pharmacie ; Faculté de Pharmacie ; 139p.
25. **MICHEL P. ; 2014** - Cancer de l'estomac ; Service d'Hépto-Gastroentérologie, hôpital Charles Nicolle CHU de Rouen, 1 rue de Germont 76031 Rouen cedex : 1-30.
26. **MICHEL P., IWANICKI-CARON I. ; 2011**-Adénocarcinome de l'estomac ; HEPATO-GASTRO et Oncologie digestive vol. 18 n° 3 : 305-312.
27. **MIHOUBI A. ; 2009**- Effet des habitudes alimentaires sur les cancers du tube digestif au niveau de la wilaya de Batna Etude cas-témoins .thèse de magister e Technologie Alimentaire et Nutrition, faculté des sciences département d'agronomie ,170 p.
28. **MONGES G. ; 2011**- HER2 diagnostic dans les cancers gastriques et de la jonction oeso-gastrique ; hépto-gastro et oncologie digestive 407vol. 18 n° 4 :407- 409.

29. **MONGES G. ; PENAULT-LLORCA F. ; 2012-** score her2 pour les carcinomes gastriques principales différences avec le score her2 des carcinomes mammaires – réalisation en pratique ; Correspondances en Onco-Théranostic - Vol. I - n° 2 :1-4.
30. **NGO C. ; DUONG-QUY S. ; 2015 -** Anormalies moléculaires et ciblage thérapeutique des cancers broncho-pulmonaires non à petites cellules ; J Fran Viet Pneu. 17(6): 4-9.
31. **Olivier B. ; Chantal D. ; 2011-** Nouveaux médicaments, nouvelles analyses : mythes et réalités d'une médecine personnalisée : 1- 48.
32. **OUKDIM I. ; 2013-** Cancers gastriques localement avancés : Etude rétrospective sur 5 ans, Aspects épidémiologiques, diagnostiques et thérapeutiques. Thèse du doctorat en médecine, faculté de médecine et pharmacie Marrakech ; 161p.
33. **PENAULT-LLORCA F. ; 2007-** Thérapeutique ciblées : problématique de la détection de la cible .Bull cancer. ; 94 : F8-245
34. **SALMI D. ; 2014 –**Etude du profil protéique chez des patients atteints du cancer de l'estomac, essai de mise en évidence de protéines potentiellement candidates pour le diagnostic .thèse du magister en science biologiques, faculté des sciences biologiques et des sciences agronomique ,114p.
35. **SAMPAIO C. ; 2008-** rôle de gab1 dans l'interconnections entre les voies ras/mapk et pi3k en aval du récepteur de l'EGF ; thèse_doctorat de Physiopathologie moléculaire, cellulaire et intégrée ; université Toulouse iii- Paul Sabatier u.f.r sciences ; 154 p.
36. **SARAVALLI S-L. ; 2012-** ARF1 contrôle la migration des cellules hautement invasives du cancer du sein via Rac1 ; Mémoire en grade de Maîtrise en pharmacologie option moléculaire ; Faculté de Médecine ; 97p.
37. **SOULARUE E. ; 2014-** Efficacité et tolérance du trastuzumab en association à oxaliplatine et fluor pyrimidines dans le traitement des adénocarcinomes gastriques ou de la jonction œsogastrique métastatiques sur exprimant HER-2.thèse du doctorat en médecine, faculté de médecine paris sud, 67p.

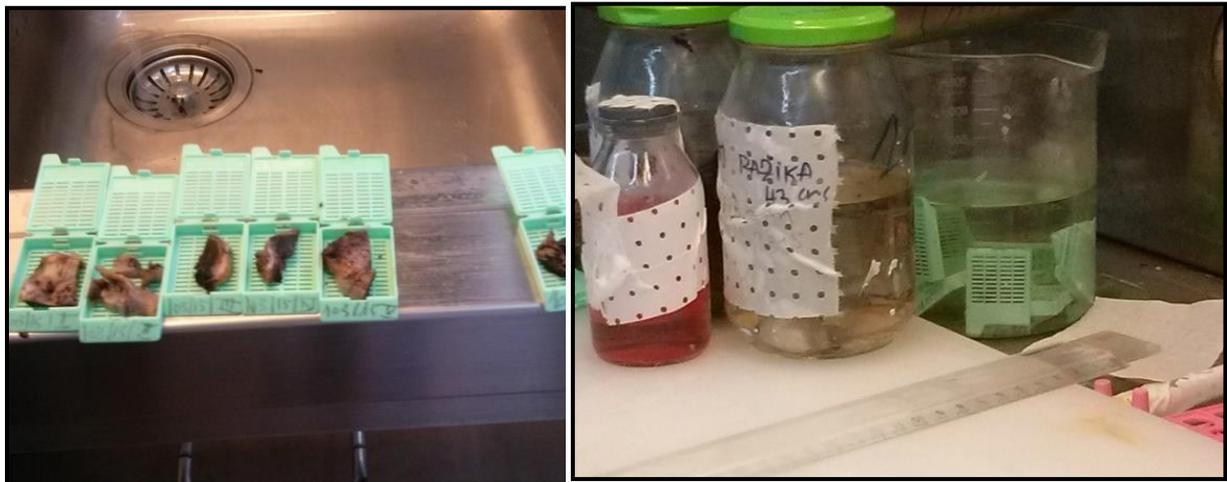
38. **TAHARI Z. ; 2008-** étude histo-pathologique et immuno-histochimique des cancers mammaires à propos d 50 cas; mémoire de magister en sciences ; faculté des sciences ; 205 p.
39. **TAZI M. ; BENJIAAFAR N. ; ER-RAKI A. ; BEKKOUCH I.; IRAQIHOSSAINI M. ; MARZOUKI ZEROUAL A. ; MESBAH L. ; NEJIR I. ; 2009-** registre des cancers de rabat ; Ed : ASINO ET DELM : 84p.
40. **TIAB A. ; ABDOU M., FOURNIER S., 2013-**L'immuno-histochimie : des lunettes pour mieux voir ? Vol. 15, N° 5 : 1.
41. **TOUNKARA I. ; 2012-** cancer avance de l'estomac dans le service de chirurgie générale du chu Gabriel Toure. Thèse en doctorat en Médecine ; Faculté de Médecine et de Pharmacie et d'Odontostomatologie ; 117p.
42. **VINCENT-SALOMON A. ; 2012-HER2** et cancers du sein ; Correspondances en Onco-Therapeutic - Vol. I - n° 2 : 57-61.
43. **WALLERAND H. ; ROBERT G. ; BERNHARD J-C.; RAVAUD A.; FERRIERE J-M. ; 2008-**Les thérapeutiques ciblées du cancer de vessie localement avancé et/ou métastatique ; Progrès en urologie 18 :407-417.
44. **WAN Y. ; 2012-**Développement de nano vecteurs polymériques et lipidiques fonctionnalisés Par des anticorps pour cibler des cellules cancéreuses ; Thèse du doctorat ; Université Bordeaux ; 241 p.



Les annexes

Echantillonnage

Pièce de gastrectomie distale des 4/5èmes



Prélèvements destinés à l'étude anatomopathologique.

Appareillage :



Automate pour la déshydratation



Appareil à l'inclusion



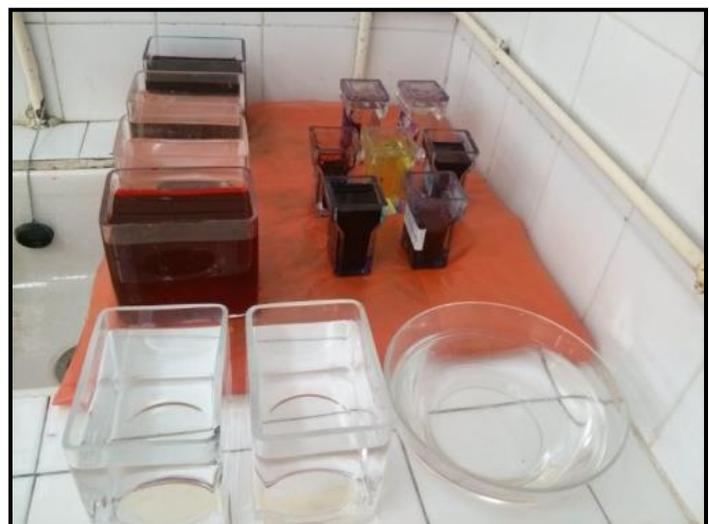
Le microtome



Plaque chauffante



Etuve de type LEICA



Les différents colorants



Les cassettes en plastiques

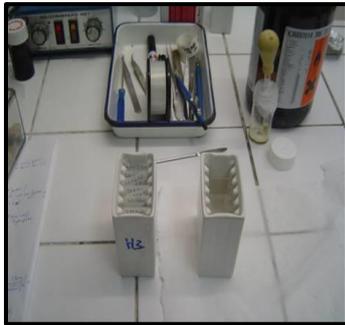
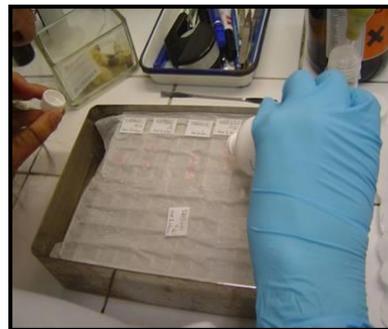


Les moules en métal



L'archivage des blocs de paraffine.

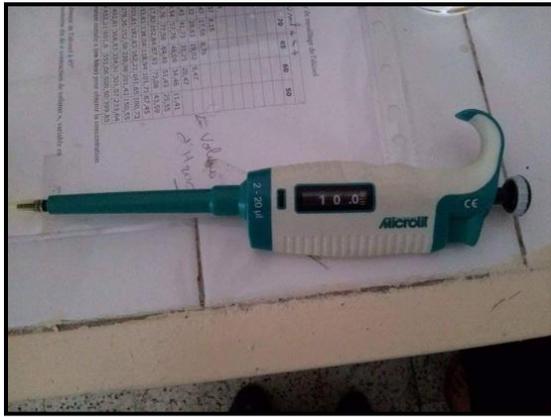
Les étapes de la technique d'anatomopathologique**Les différentes étapes d'inclusion****Coupage et l'étalement des coupes sur les lames****Déparaffinage des lames****Coloration HE et montage**

Les étapes de la technique IHC**Déparaffinage****Démasquage****Crayon hydrophobe****Anticorps primaire puis****AC secondaire biotinylé****Streptavidine-peroxydase****Substrat + DAB**

*

Hématoxyline**Montage des lames**

Les appareils de FISH



La micropipette



Les bandelette



La centrifugeuse



La thermobrite



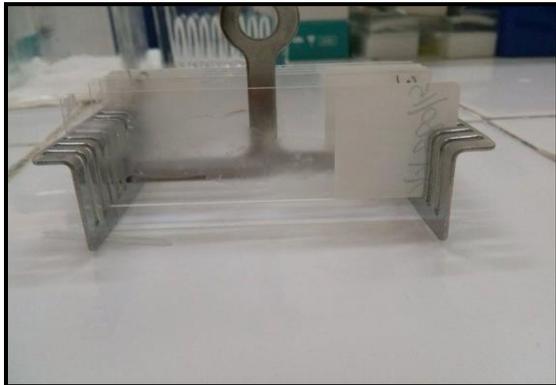
Vortex mixer



Le bain marie

Les réactifs de FISH

**Ciment****solution stringent Wash buffer****fluorescent DAPI****Solution Wash****La pepsine****La sonde HER2**

Protocol de FISH d' HER2 (KIT DAKO K 5731)**Des coupes sur la lame sélaniséé entre 4 à 6 µm****Les lames dans les bains xylènes****Les lames dans les 2 bains éthanol****100% puis 70%****Les lames dans les bains Wash****Préparation la solution prétraitement et mettre les lames dans la solution**



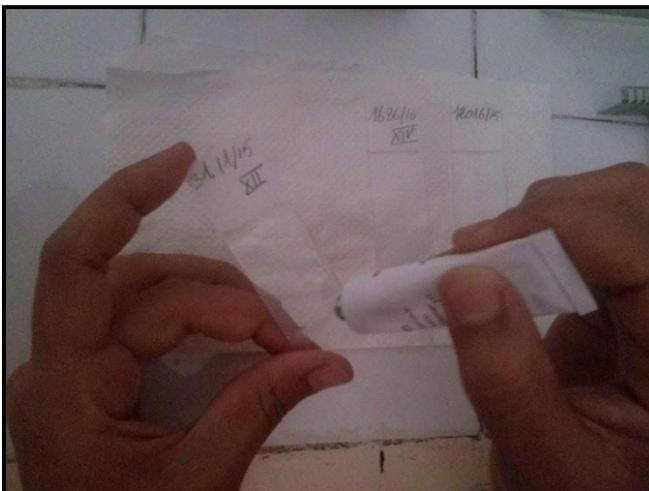
Ajouter la pepsine de 5 à 8 gouttes
éthanol



Mettre les lames dans des bains



Ajouter 10 μ l du mix de sondes HER2 /centre après avoir bien mélangé au vortex+++



Mettre les lamelles et sellés avec le ciment colle.



Mettre les lames l'hybridizer

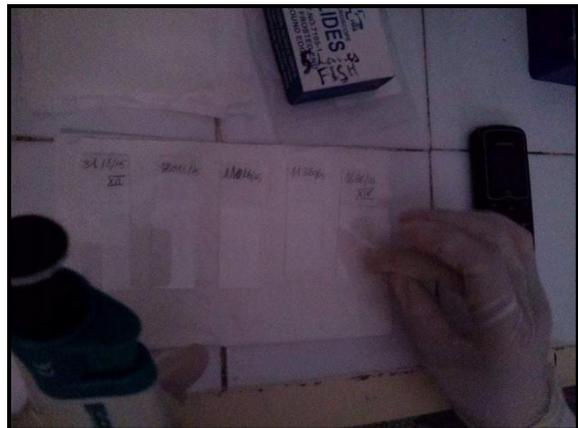
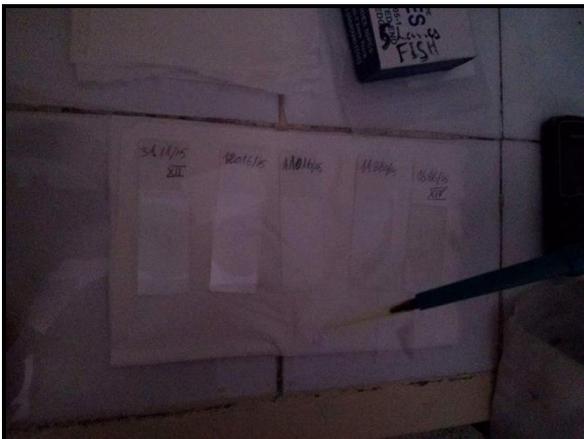


Mettre les lames dans le tampon de stringence à température ambiante puis enlever les lamelles délicatement.



Mettre les lames dans des bains de Wash éthanols

Mettre les lames dans des bains



Ajouter 15 μ l du milieu de montage fluorescent DAPI Immédiatement mettre les lamelles

Tableau V : Répartition des patients selon le sexe

sexe	hommes	femmes	Totale
Nombre	20	10	30
Pourcentage	67%	33%	100%

Tableau VI : Répartition des patients selon l'âge

tranche d'âge (ans)	40-49	50-59	60-69	70-79	NM	Total
Nombre	5	9	10	4	2	30

Tableau VII : Répartition des patients selon le siège anatomique

siège	antre	fundus	pylore	antro- fundique	antro- pylorique	Non précisé	total
les patients (N)	5	2	2	8	2	11	30
pourcentage	17%	6%	7%	27%	7%	36%	100%

Tableau VIII : Répartition des patients selon l'aspect histologique

aspect histologique	les patients (N)
adénocarcinome à cellules indépendantes	12
adénocarcinome mucineux	1
adénocarcinome papillaire	5
adénocarcinome Tubuleux	6
adénocarcinome à cellules en bague à chaton	6
total	30

Tableau IX: Répartition des patients selon le score

scoring	IHC0	IHC1	IHC2	IHC3	TOTAL
les patients	11	12	5	2	30
pourcentage	36%	40%	17%	7%	100%

Tableau X : Répartition des types histologiques du cancer en fonction de différents scores.

Aspect histologique	score 0	score 1	score 2	score 3
adénocarcinome à cellules indépendantes	4	5	3	0
adénocarcinome mucineux	1	0	0	0
adénocarcinome papillaire	2	0	2	1
adénocarcinome Tubuleux	2	3	0	1
adénocarcinome à cellules en bague à chaton	2	4	0	0

N° des cas	Age (ans)	Sexe	Siège	Aspect histologique	IHC her2	FISH her2
1	?	F	?	adénocarcinome Tubuleux	score à 1 HER2 (négative)	/
2	42	M	antro-pylorique	adénocarcinome à cellules en bague à chaton	score à 0 HER2 (négative)	/
3	58	M	antro-fundique	adénocarcinome tubuleux	score à 0 HER2 (négative)	/
4	77	M	?	adénocarcinome à cellules isolés (indépendantes)	score à 1 HER2 (négative)	/
5	62	M	antro-fundique	adénocarcinome à cellules en bague à chaton	score à 0 HER2 (négative)	/
6	62	M	?	adénocarcinome tubuleux (EPN V)	score à 1 HER2 (négative)	/
7	64	F	antro-pylorique	adénocarcinome à cellules indépendantes	score à 0 HER2 (négative)	/
8	55	M	antre	adénocarcinome à cellules en bague à chaton	score à 1 HER2 (négative)	/
9	62	F	?	adénocarcinome mucineux	score à 0 HER2 (négative)	/
10	56	M	antro-fundique	adénocarcinome à cellules indépendantes	score à 1 HER2 (négative)	/
11	57	F	antre	adénocarcinome à cellules indépendantes	score à 2 HER2 (positive)	non amplifié
12	63	M	antro-fundique	adénocarcinome papillaire	score à 0 HER2 (négative)	/
13	79	M	fundus	adénocarcinome tubuleux	score à 3 HER2 (positive)	/
14	66	M	antro-fundique	adénocarcinome à cellules indépendantes	score à 2 HER2 (positive)	non amplifié
15	73	M	antro-fundique	adénocarcinome papillaire	score à 3 HER2 (positive)	/

16	45	F	antre	adénocarcinome tubuleux	score à 0 HER2 (négative)	/
17	59	M	antro-fundique	adénocarcinome à cellules indépendantes	score à 0 HER2 (négative)	/
18	56	M	?	adénocarcinome papillaire	score à 2 HER2 (positive)	non amplifié
19	74	M	?	adénocarcinome papillaire	score à 0 HER2 (négative)	/
20	68	M	?	adénocarcinome tubuleux	score à 1 HER2 (négative)	/
21	67	F	?	adénocarcinome à cellules en bague à chaton	score à 1 HER2 (négative)	/
22	43	F	?	adénocarcinome à cellules indépendantes	score à 0 HER2 (négative)	/
23	?	M	antre	adénocarcinome à cellules indépendantes	score à 1 HER2 (négative)	/
24	52	M	pylore	adénocarcinome papillaire	score à 2 HER2 (positive)	non amplifié
25	51	M	pylore	adénocarcinome à cellules en bague à chaton	score à 1 HER2 (négative)	/
26	41	M	antro-fundique	adénocarcinome à cellules indépendantes	score à 1 HER2 (négative)	/
27	63	F	fundus	adénocarcinome à cellules indépendantes	score à 0 HER2 (négative)	/
27	50	F	épaississement gastrique	adénocarcinome à cellules indépendantes	score à 1 HER2 (négative)	/
29	68	F	?	adénocarcinome à cellules indépendantes	score à 2 HER2 (positive)	non amplifié
30	41	M	antre	adénocarcinome à cellules en bague à chaton	score à 1 HER2 (négative)	/