

UNIVERSITE DE NANTES

FACULTE DE MEDECINE

Année 2009

N° 141

THESE
pour le

DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN MEDECINE

(Anatomo-Cyto-Pathologie)

par

Christine KANDEL

née le 11 février 1978 à Mulhouse

Présentée et soutenue publiquement le 25 septembre 2009

LA SIGNALISATION NOTCH DANS LES ADENOCARCINOMES
GASTRIQUES DE TYPE DIFFUS

Président : Monsieur le Professeur Christian LABOISSE

Directeur de thèse : Monsieur le Professeur Jean-François MOSNIER

INTRODUCTION	5
I. Le cancer gastrique	5
A. Epidémiologie.....	5
1. La classification épidémiologique des cancers de l'estomac : la classification de Laurèn.....	5
2. Incidence	5
3. Age de survenue.....	6
4. Localisations gastriques	6
5. Survie.....	6
6. Mortalité.....	7
B. Facteurs de risque	7
1. Facteurs environnementaux :	7
a. Helicobacter pylori et lésions précancéreuses.....	7
b. Autres facteurs environnementaux.....	8
2. Terrain favorisant	8
a. Antécédents personnels	8
b. Predisposition génétique.....	9
i. Cancer gastrique diffus héréditaire	9
ii. Les autres syndromes héréditaires avec cancer gastrique	9
3. Interaction entre le polymorphisme génétique et l'environnement.....	10
C. Anato-pathologie	11
1. Histologie des lésions précancéreuses.....	11
a. Métaplasie intestinale	11
b. Dysplasie	12
2. Classifications histologiques des cancers.....	12
a. Classification de Laurèn	13
b. Classification de l'OMS	13
c. Classification immunophénotypique japonaise des cancers.....	15
D. La génétique du cancer gastrique	16
1. Données de la cytogénétique.....	16
a. Cytogénétique conventionnelle	16
b. Hybridation in situ	17
c. Hybridation Génomique Comparative	17
2. Données de la biologie moléculaire	18
a. TP53	18
b. hMLH1.....	19
c. E-Cadhérine	19
d. Autres gènes suppresseurs de tumeur.....	19
E. Classification TNM et en stades	20
F. Traitement.....	21
1. Chirurgie	21

2.	Radiothérapie	21
3.	Chimiothérapie.....	22
4.	Radio-chimiothérapie.....	22
II.	Le Tissue Micro-Arrays (TMA)	23
A.	Historique, définition	23
B.	Méthodologie.....	24
C.	Applications.....	25
III.	Biomarqueurs.....	26
A.	E-cadhérine.....	26
B.	β -caténine.....	26
C.	Her2.....	27
D.	Notch-1.....	28
IV.	Problématique.....	31
A.	But du travail	31
B.	Intérêt thérapeutique	31
	MATERIEL ET METHODES	32
I.	Patients.....	32
II.	Construction des « Tissue Micro-arrays » (TMAs)	32
III.	Protocole d'étude immunohistochimique	33
A.	Protocole d'étude immunohistochimique sur les blocs de TMA.....	33
B.	Évaluation du marquage immunohistochimique.....	34
C.	Hybridation in situ avec des sondes chromogènes (CISH).....	34
IV.	Analyses statistiques	35

RESULTATS.....	36
I. Cohorte.....	36
II. Expression des biomarqueurs	37
A. Expression de la E-cadhérine, de la β -caténine, de Her2 et Notch1 dans la muqueuse gastrique normale	37
B. Expression de la E-cadhérine, de la β -caténine, de Her2 et de Notch1 dans les adénocarcinomes gastriques de type intestinal.....	39
C. Expression de la E-cadhérine, de la β -caténine, de Her2 et de Notch1 dans les adénocarcinomes gastriques de type diffus	39
D. Le profil d'expression de la E-cadhérine, de la β -caténine, de Her2 et de Notch1 est différent dans les adénocarcinomes de type intestinal et les adénocarcinomes de type diffus.....	44
E. Association entre les marqueurs.....	47
1. La perte d'expression de la E-cadhérine est associée à la perte d'expression de la β -caténine membranaire et cytoplasmique dans les cancers de type diffus	47
2. La perte d'expression membranaire de la E-cadhérine est associée à l'apparition de l'expression nucléaire de la β -caténine dans les cancers de type intestinal	48
3. L'activation de Notch1 est associée à la perte d'expression membranaire de la E-cadhérine et de la β -caténine dans les cancers de type diffus	48
III. Corrélation de l'expression des marqueurs avec les données clinico-pathologiques.	50
A. Corrélation entre l'expression des biomarqueurs et le stade TNM au moment du diagnostic	52
B. Corrélation entre l'expression des biomarqueurs et la survie globale et la survie sans évènements.....	52
DISCUSSION	54
BIBLIOGRAPHIE.....	59

INTRODUCTION

I. Le cancer gastrique

A. Epidémiologie

1. La classification épidémiologique des cancers de l'estomac : la classification de Laurèn.

La classification de Laurèn distingue deux catégories de cancer de l'estomac : les cancers de type intestinal et les cancers de type diffus (1).

Histologiquement, les cancers de type intestinal sont constitués de glandes bien différenciées. Ils représentent environ 60% des cancers gastriques. Ils sont appelés de type intestinal car ils sont décrits comme étant l'aboutissement d'une séquence de lésions précancéreuses incluant l'« intestinalisation » ou métaplasie intestinale de la muqueuse gastrique (2).

Les cancers de type diffus sont constitués de cellules indépendantes comprises dans un stroma fibreux dense. Ces tumeurs envahissent de manière diffuse la paroi gastrique donnant souvent l'aspect typique de limite plastique.

La classification de Laurèn est largement utilisée dans les études épidémiologiques.

2. Incidence

Bien que son incidence diminue régulièrement depuis 50 ans, le cancer de l'estomac reste fréquent. Il représente la deuxième cause de mortalité par cancer dans le monde, avec une incidence en Asie, en Amérique Centrale et du Sud 10 fois supérieure à celle de l'Europe de l'Ouest. En France le cancer de l'estomac se situe au 6^{ème} rang des cancers (3) et plus précisément au deuxième rang des cancers digestifs après le cancer colorectal.

En 2005 (4), le nombre de nouveaux cas était estimé à 7126 par an avec un sex ratio homme/femmes de 2,5.

Il existe de discrètes disparités entre les différentes régions avec une fréquence légèrement supérieure dans le Finistère, où l'incidence est de 15,7/an/100000 habitants de sexe masculin et de 7,4/an/100000 habitants de sexe féminin. Elle est également plus élevée dans le Haut-Rhin avec une incidence de 14,1 et de 4,9/an/100000 habitants respectivement de sexe masculin et féminin (3). Pour la Loire-Atlantique, le Registre des tumeurs de Loire-Atlantique et de Vendée (EPIC-PL) a enregistré pour la période 2002-2004 une incidence de 8,7 et de 3,2/an/100000 habitants respectivement chez l'homme et la femme (5).

3. Age de survenue

L'âge moyen de survenue est de 75 ans : les cancers débutent progressivement vers 45-49 ans chez l'homme et vers 50-54 ans chez la femme pour arriver à un maximum d'incidence à 80-84 ans chez l'homme et 85-89 ans chez la femme dans la série du Finistère de Fayçal et *al* (3).

4. Localisations gastriques

Les localisations préférentielles du cancer de l'estomac sont l'antrum gastrique (43,6%) et le corps (39,3%) : l'antrum préférentiellement pour les femmes et les patients âgés de plus de 70 ans et le corps pour les hommes et les patients jeunes (3).

5. Survie

Malgré une augmentation du taux de résection à visée curative et une diminution de la mortalité opératoire, le pronostic du cancer de l'estomac reste sévère avec un taux de survie globale variable en fonction des séries allant de 15 % (6) à 18,5 % (3) à 5 ans et de 8 à 11,2% à 10 ans. Pour les patients opérés, le taux de survie relative est pratiquement doublé (7).

6. Mortalité

Le nombre de décès liés au cancer de l'estomac était de 5000 par an en France en 2005 (4).

B. Facteurs de risque

Les facteurs prédisposant aux cancers de l'estomac sont de trois types : facteurs environnementaux, terrain favorisant et facteurs génétiques.

1. Facteurs environnementaux :

a. *Helicobacter pylori* et lésions précancéreuses

Helicobacter pylori, reconnu par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) comme carcinogène gastrique en 1994 (4), est une bactérie à transmission oro-fécale. L'infection en général est acquise dès l'enfance mais les lésions d' *H. pylori* apparaissent à l'âge adulte. Pelayo CORREA (8) a montré que *H. pylori* induit une gastrite superficielle, évoluant progressivement vers la gastrite chronique atrophique, la métaplasie et la dysplasie. Le processus débute en général à la jonction antro-fundique puis s'étend le long de la petite courbure antrale (9). L'infection par *H. pylori* touche 30 % de la population française, pourtant l'incidence du cancer gastrique est faible. En effet, on estime que la cascade d'évènements histologiques de la carcinogenèse initiée par *H. pylori* n'aboutit à un cancer de l'estomac que chez 1% des patients infectés (4). L'infection par *H. pylori* ne serait donc pas suffisante à elle seule pour induire un cancer gastrique. Certaines souches d'*H. pylori* présentent dans leur génome des polymorphismes de certains îlots de pathogénicité, notamment des îlots CagA et VacA. Ces souches d'*H. pylori* sont plus virulentes et entraînent une réaction inflammatoire plus sévère de la muqueuse gastrique.

b. Autres facteurs environnementaux

L'alimentation riche en aliments salés, saumurés ou fumés, frits, et pauvre en végétaux est un facteur de risque (4; 9).

La baisse de l'incidence du cancer de l'estomac s'explique en partie par les modifications des conduites alimentaires et du mode de conservation des aliments. La consommation de fruits frais et de légumes protégerait l'estomac des composants nitrés exogènes et endogènes.

On note également que le niveau socio-économique bas, favorisant un déséquilibre du régime alimentaire, constitue un facteur de risque (4; 9).

Le rôle pathogène de l'alcool et du tabac n'est pas formellement démontré (9).

2. Terrain favorisant

a. Antécédents personnels

La population à risque de cancer comprend tout d'abord les patients ayant un antécédent de gastrectomie partielle pour une pathologie bénigne avec un risque de cancer du moignon multiplié par 2 ou 3 après 15 à 20 ans de recul (4).

La maladie de Biermer, cause de gastrite atrophique auto-immune, augmente de 2 à 3 fois le risque de cancer de l'estomac (4).

Le risque de cancer en cas d'antécédents d'ulcère gastrique a été surévalué. Il s'agirait en fait de cancers de type ulcériforme diagnostiqués tardivement par l'échec des premières manoeuvres d'investigation. Le risque de dégénérescence d'un ulcère bénin est finalement estimé à moins de 1%, ce qui correspond exactement au taux de progression des gastrites associées à l'ulcère vers le cancer (4).

Les adénomes gastriques et la maladie de Ménétrier, une gastropathie à gros plis, sont deux facteurs de risque dont l'incidence est rare (4).

b. Predisposition génétique

i. Cancer gastrique diffus héréditaire

Le cancer gastrique diffus héréditaire est de transmission autosomique dominante. D'après les critères de l'IGCLCC (*International Gastric Cancer Linkage Consortium*), ce syndrome génétique doit être recherché lorsqu'il existe dans une famille 1) au moins 2 cas de cancer de type diffus de l'estomac chez des apparentés du premier ou du deuxième degré, dont un cas diagnostiqué avant 50 ans ou 2) 3 cas chez des apparentés de premier ou deuxième degré quelque soit l'âge de survenue (10). Les cancers sont liés à la mutation constitutionnelle du gène *CDH1* de la E-cadhérine, situé sur le chromosome 16q22.1 (11). Le pronostic de ces cancers est péjoratif en raison de dissémination péritonéale précoce (12). La pénétrance est élevée (70 à 80%) et l'âge d'apparition du cancer gastrique en cas de mutation est en moyenne de 37 ans (13). Chez les femmes, ce syndrome s'accompagne d'un risque accru de carcinome lobulaire du sein (14). Certains auteurs proposent la réalisation d'une gastrectomie prophylactique chez les porteurs sains de la mutation de *CDH1* (4; 13). L'analyse anatomo-pathologique des pièces de gastrectomie de ces porteurs sains retrouve un estomac macroscopiquement normal avec microscopiquement des foyers de petite taille de carcinome de type diffus intramuqueux ou infiltrant la muqueuse (15).

ii. Les autres syndromes héréditaires avec cancer gastrique

Au cours du syndrome de Lynch ou « cancer colorectal héréditaire sans polypose » (HNPCC), l'estomac est la deuxième localisation néoplasique extracolique après l'endomètre (16).

Les cancers gastriques au cours de la polypose adénomateuse familiale (PAF) sont souvent précédés par des lésions de dysplasie qui peuvent se développer sur muqueuse plane ou sur des lésions polypoïdes type adénome, polypes hyperplasiques ou polype fundique (9).

Dans le syndrome de Peutz-Jeghers, affection autosomale dominante, le risque relatif d'avoir un cancer de l'estomac est élevé (17).

Dans la polypose juvénile, affection autosomale dominante, des foyers dysplasiques et adénocarcinomateux sont décrits dans les polypes juvéniles gastriques (9).

Dans le syndrome de Li-Fraumeni, la fréquence du cancer gastrique n'est pas très augmentée comparée aux autres cancers : il a été montré que la délétion germinale d'un allèle de *p53* entraînerait une diminution de la réponse Th1 aux infections liée à *Helicobacter pylori* et donc diminuerait le risque d'évolution vers un cancer (18).

3. Interaction entre le polymorphisme génétique et l'environnement

Le polymorphisme du gène du groupe sanguin A est associé à une augmentation du risque de cancer de l'estomac (9).

D'autres polymorphismes de gènes impliqués dans l'interaction entre l'hôte et l'environnement sont aussi associés à un risque accru de cancers de l'estomac. Les plus connus sont :

1) Le polymorphisme de l'interleukine1 (IL-1B-31T/il-1RN*) provoque une réaction inflammatoire exagérée à *Helicobacter pylori*, notamment à la souche VacAs1. De même, le polymorphisme de TNF α , TNFa-308*, augmente considérablement la production de TNF α en réponse à l'infection à *Helicobacter pylori*. Les sujets possédant ces 2 polymorphismes ont un risque augmenté de développer une gastrite multifocale atrophique et un cancer de l'estomac (9).

2) Le polymorphisme de gènes codant l'enzyme glutathion-S-transférase (GST-1), les enzymes acétylantes comme la N-acetyl-transférase et les enzymes impliquées dans le métabolisme des carcinogènes comme le cytochrome P450 2E1 sont associés à une augmentation du risque de cancers chez les patients fumeurs, ayant des habitudes alimentaires à risque (9).

C. Anato-pathologie

1. Histologie des lésions précancéreuses

Les lésions précancéreuses sont répertoriées dans la classification internationale de Padoue (19)(Tableau 1).

TABLE 1. Gastric dysplasia and related lesions: the Padova classification	
1. Negative for dysplasia	
1.0 Normal	
1.1 Reactive foveolar hyperplasia	
1.2 Intestinal metaplasia (IM)	
1.2.1 IM Complete type	
1.2.2 IM Incomplete type	
2. Indefinite for dysplasia	
2.1 Foveolar hyperproliferation	
2.2 Hyperproliferative IM	
3. Non-invasive neoplasia (flat or elevated [synonym adenoma])	
3.1 Low-grade	
3.2 High-grade	
3.2.1 Including suspicious for carcinoma without invasion (intraglandular)	
3.2.2 Including carcinoma without invasion (intraglandular)	
4. Suspicious for invasive carcinoma	
5. Invasive adenocarcinoma	

Tableau 1 : Classification des lésions précancéreuses de Padoue

a. Métaplasie intestinale

Il s'agit de la trans-différenciation de l'épithélium gastrique en un épithélium de type intestinal. On distingue (Figure 1A):

- La métaplasie intestinale complète (de type I) : avec des cellules absorbantes, des cellules caliciformes (sécrétant des sialomucines colorées par le Bleu Alcian) et des cellules de Paneth.

- La métaplasie intestinale incomplète (de type II) : sans cellules absorbantes, avec des cellules caliciformes et des cellules mucosécrétantes cylindriques, sécrétant des sialomucines.
- La métaplasie incomplète (de type III) : avec des cellules cylindriques mucosécrétantes et des cellules caliciformes, sécrétant des sialo et sulfomucines.

Seules les colorations histochimiques distinguent les métaplasies intestinales de type II et de type III. La métaplasie incomplète III serait associée à un plus fort risque de cancer que la métaplasie complète (20). Mais pour d'autres auteurs, le caractère expansif de la métaplasie intestinale est un facteur péjoratif d'évolution vers un cancer plus important que le sous-type même de la métaplasie (21).

b. Dysplasie

On distingue des lésions de dysplasie de bas et de haut grade :

- La dysplasie de bas grade est caractérisée par une pseudostratification de l'épithélium, une perte ou une diminution de la sécrétion de mucine. Ces modifications débutent à la partie profonde de l'épithélium et s'étendent à la surface (figure 1B)
- La dysplasie de haut grade est caractérisée par une architecture irrégulière avec une perte de la polarité épithéliale et des cellules aux noyaux volumineux et nucléolés. Les mitoses sont fréquentes.

2. Classifications histologiques des cancers

De nombreuses classifications ont été proposées. La première classification morphologique des cancers de l'estomac a été la classification de Boorman (22) qui était une classification purement macroscopique. Actuellement, les classifications les plus utilisées en Occident sont la classification de Laurén (1) qui n'est pas vraiment une classification histologique et la classification de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) (23). D'autres classifications sont utilisées, notamment au Japon, comme la classification japonaise proche de la classification de Laurén, la classification de Nakamura (24) et la classification de Goseki

(25). La multiplicité des classifications macroscopiques, histologiques, endoscopiques et épidémiologiques des cancers de l'estomac entretient une certaine confusion. Leur utilisation, parfois peu rigoureuse, rend difficile la compréhension et la synthèse de la littérature sur le cancer de l'estomac ainsi que la comparaison des études provenant d'Asie et d'Occident.

a. Classification de Laurèn

La classification de Laurèn a été décrite plus haut.

b. Classification de l'OMS

Dans cette classification (23), les cancers sont gradés en cancers bien, moyennement et peu différenciés et classés en 4 sous types histologiques principaux : papillaire, tubulaire, mucineux et à cellules en bague à chaton.

L'adénocarcinome tubulaire est constitué de tubes plus ou moins dilatés et agglomérés en massifs cribriiformes (figure 2A). Le type tubulaire peu différencié est aussi appelé « carcinome solide ».

L'adénocarcinome papillaire est en général une tumeur bien différenciée exophytique constituée de papilles centrées par un axe fibrovasculaire (figure 2C).

L'adénocarcinome mucineux, appelé également carcinome colloïde, est défini par la présence de plus de 50% de mucine extracellulaire (figure 2B).

L'adénocarcinome à cellules 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 (figure 2D). Les cellules en bague à chaton typiques sont en général nombreuses à la partie superficielle de la tumeur. Les cellules en profondeur ont en général moins de mucine et un noyau plus centralisé.

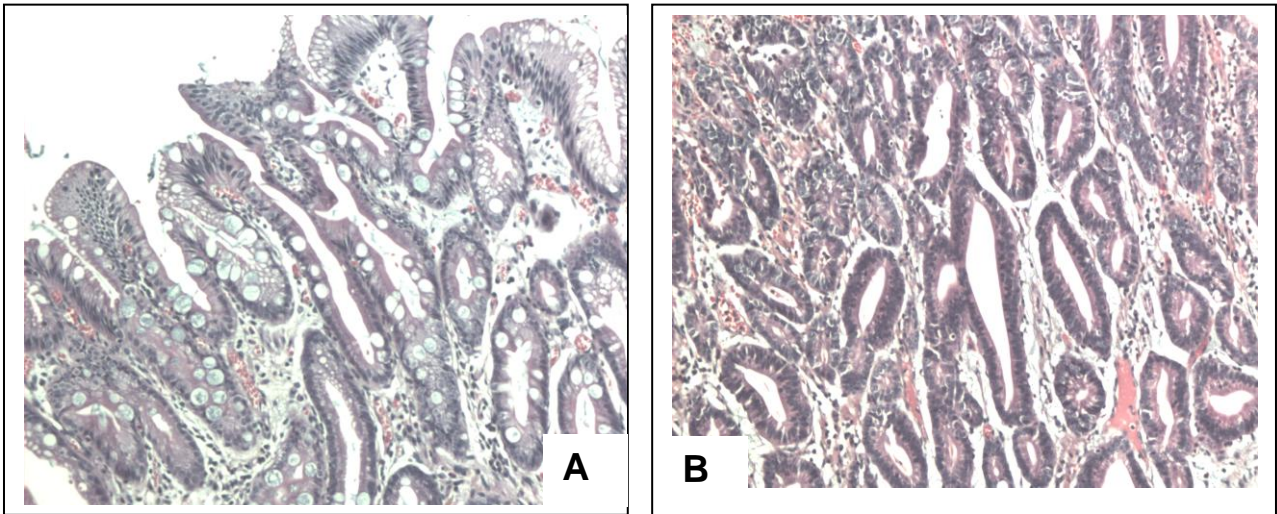


Figure 1 : Lésions préneoplasiques

- A) Lésions de métaplasie intestinale complète
- B) Lésions de dysplasie de bas grade

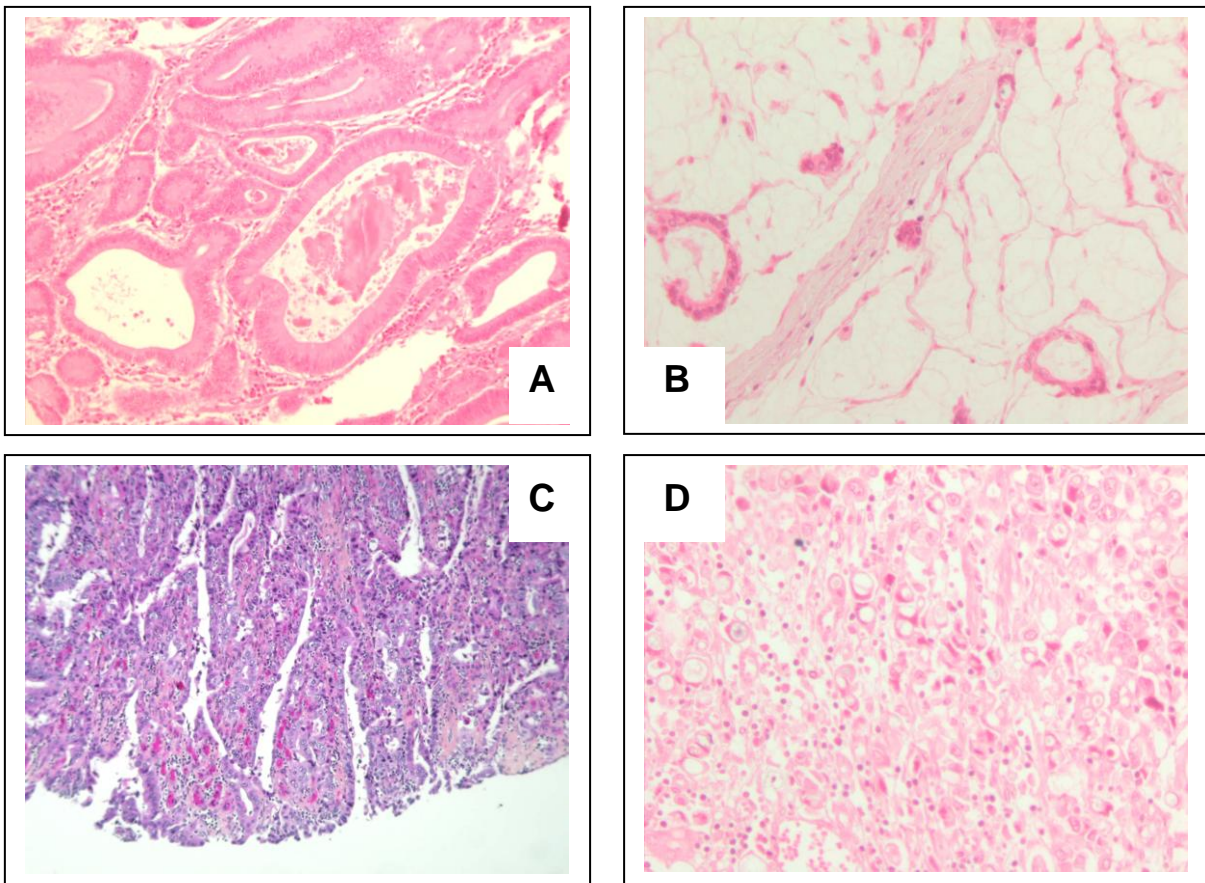


Figure 2 : Types histologiques de la classification de l'OMS

- A) Type tubulaire
- B) Type mucineux (colloïde)
- C) Type papillaire
- D) Type à cellules en bague à chaton

A côté des ces 4 types principaux, d'autres sous-types plus rares sont décrits : le carcinome médullaire, le carcinome à cellule de Paneth, le carcinome à cellules claires pyloro-cardiaque, l'adénocarcinome oncocytique ou à cellules pariétales, le carcinome adénoquameux, le carcinome gastrique avec un contingent de cellules germinales, le carcinome hépatoïde et le carcinosarcome.

c. Classification immunophénotypique japonaise des cancers (26)

Le cancer gastrique a des aspects histologiques et immunohistochimiques hétérogènes car les tumeurs naissent de tissus variés de profils phénotypiques différents : épithélium fundique ou antral natif, métaplasie antrale en muqueuse fundique parfois appelée « métaplasie exprimant le peptide spasmodique » (SPEM), métaplasie intestinale, et dysplasie. Comme les cancers tentent de reproduire le phénotype des tissus dont ils naissent, certains auteurs japonais ont imaginé une classification immunophénotypique des cancers. Cette classification définit 1) un phénotype gastrique ou fovéolaire reposant sur l'expression de MUC5AC qui est la mucine présente dans les cellules épithéliales fovéolaires gastriques, 2) un phénotype intestinal reposant sur l'expression de MUC2 qui est la mucine présente dans les cellules caliciformes intestinales, de CD10 qui est une endopeptidase de la bordure en brosse des entérocytes, 3) un phénotype mixte, associant le phénotype fovéolaire et le phénotype intestinal dans la même tumeur et 4) un phénotype inclassable lorsque la tumeur n'exprime aucun de ces marqueurs. Les travaux des auteurs japonais montrent que cette classification immunophénotypique des cancers de l'estomac est justifiée par des arguments cliniques, évolutifs et moléculaires (26-28). Cette classification immunophénotypique des cancers de l'estomac ne présente aucun parallélisme avec les classifications histologiques de l'OMS et de Laurèn.

D. La génétique du cancer gastrique

Le cancer de l'estomac est une maladie génétiquement hétérogène et complexe. La carcinogenèse gastrique est un processus en plusieurs étapes impliquant une accumulation d'événements génétiques et épigénétiques. Toutes les anomalies génétiques accompagnant l'initiation et la progression des cancers de l'estomac sont loin d'être connues. De nombreuses études cytogénétiques et moléculaires sont menées pour éclaircir ces mécanismes.

1. Données de la cytogénétique

La détection des anomalies des tumeurs solides en cytogénétique conventionnelle est particulièrement difficile, les difficultés étant liées à la complexité même des anomalies chromosomiques. Le développement des techniques d'hybridation in situ (HIS) et d'hybridation génomique comparative (CGH) a permis d'améliorer nos connaissances de ce processus (29).

a. Cytogénétique conventionnelle

Les anomalies chromosomiques simples décrites dans le cancer de l'estomac sont la trisomie des chromosomes 8, 9 et 19, un chromosome X surnuméraire, des délétions du chromosome 7q et l'apparition d'un isochromosome 8 (i8q). Il a été montré que les cancers de l'estomac, où seule l'anomalie chromosomique i8q était retrouvée, étaient de bon pronostic (30). D'autres publications ont rapporté que i(8q) était détecté dans des cancers gastriques de stade évolué, associé à une agressivité tumorale (31).

Les anomalies complexes impliquent les chromosomes 1, 3, 6, 7, 8, 11 notamment 11p13-15, 13, 17 et 19.

b. Hybridation in situ

Les études utilisant l'hybridation in situ avec des sondes fluorescentes (FISH) ont montré des associations entre certaines anomalies chromosomiques et les données clinico-pathologiques. Les anomalies numériques du chromosome 17 seraient significativement associées à la profondeur de l'invasion tumorale, au statut ganglionnaire et à la présence d'embolies vasculaires et lymphatiques (32). De même les anomalies numériques des chromosomes 3, 10, 11, 12 et Y seraient associées à un moins bon pronostic (33).

c. Hybridation Génomique Comparative

La CGH array a permis d'affiner la compréhension des anomalies génétiques accompagnant la progression des cancers de l'estomac. Les principales aberrations chromosomiques retrouvées dans les cancers de l'estomac sont des gains de 5p, 7p, 7q, 8q, 13q, 15q, 18q, 20q et 22q et des pertes de 3p, 5q, 4q, 14q, 16q, 17p et 18q (29). Tout comme dans les études utilisant la technique FISH, les corrélations entre les données clinico-pathologiques et l'apparition des différentes aberrations chromosomiques rapportées par les différentes équipes de recherche sont discordantes (29). Les gains de 18q et de 20q sont fréquents dans les cancers de type intestinal de la classification de Laurèn alors que les gains de 13q sont plus fréquents dans les cancers de type diffus (34). Les pertes de 3p et de 5q sont plus fréquentes dans les cancers de type intestinal (35). Toutefois, pour certains auteurs, il n'existe aucune différence d'aberrations chromosomiques entre les deux types de cancers de l'estomac (29). Ainsi, les mécanismes d'apparition des 2 types de cancers gastriques définis par Laurèn ne seraient pas expliqués par des aberrations du nombre de copies chromosomiques.

Des auteurs ont comparé les anomalies chromosomiques des cancers de type diffus de stade précoce et des cancers de type diffus de stade avancé : les gains de 8q, la perte de 16q et 17q sont plus fréquents dans les cancers précoces alors que les gains de 7p, 7q et 15q et les pertes de 3p et 18q sont fréquents dans les cancers avancés (36) .

Pour certains auteurs, les données de la cytogénétique pourraient apporter des informations pronostiques utiles et pourraient guider les traitements : les pertes de 9p23 et de 14q31 sont associées au statut ganglionnaire et la perte de 3p12 à la présence de métastases péritonéales (29) .

Finalement, les résultats de cytogénétique sont actuellement trop peu reproductibles pour établir des parallélismes avec les séquences pathologiques supposées de la carcinogenèse gastrique.

2. Données de la biologie moléculaire

Le développement et la progression des cancers de l'estomac impliquent un certain nombre d'anomalies génétiques et épigénétiques des gènes suppresseurs de tumeurs, des oncogènes, des gènes régulateurs du cycle cellulaire et des molécules d'adhésion et des gènes réparateurs de l'ADN.

L'accumulation de ces altérations génétiques serait différente dans le type intestinal et dans le type diffus de la classification de Laurèn. Néanmoins, ces deux types de cancers de l'estomac partagent certaines altérations génétiques (29).

a. TP53

Le gène *TP53* localisé sur le chromosome 17p13.1 (11) code une protéine « sentinelle » intervenant dans le contrôle du cycle cellulaire, dans la réparation de l'ADN, dans la différenciation cellulaire et l'apoptose. La mutation de *TP53* est une des anomalies majeures des cancers humains. Elle est fréquemment observée dans le cancer de l'estomac. Le gène *TP53* peut être inactivé par deux mécanismes successifs : la perte d'hétérozygotie et la mutation de l'allèle restant. La fréquence des mutations de *p53* dans les cancers gastriques de type intestinal est d'environ 40% des cancers gastriques ; ce chiffre étant similaire dans les cancers gastriques de type diffus évolués. Les mutations sont par contre très rares dans les cancers gastriques de type diffus de stade précoce (29; 37). Ces études ont été réalisées par des auteurs japonais utilisant la classification japonaise, proche de la classification de Laurèn.

b. *hMLH1*

Comme dans le cancer colo-rectal, l'inactivation de *hMLH1* gène de réparation de l'ADN est le plus souvent liée à des phénomènes épigénétiques d'hyperméthylation des îlots CpG du promoteur du gène. La perte d'expression de *hMLH1* qui en est la conséquence est fréquemment décrite dans les cancers de phénotype instable pour les microsatellites (MSI). Le statut MSI est défini par la présence d'erreurs de réplication dans les séquences répétées en tandem de l'ADN appelées microsatellites.

Vingt pour cent des cancers gastriques de type intestinal de stade précoce sont de phénotype MSI. Dans la même étude, aucun cancer gastrique de type diffus de stade précoce ne présentait ce phénotype (37). De plus certaines études suggéreraient que les cancers de l'estomac de phénotype MSI sont plus fréquents chez les sujets âgés, associés à une faible prévalence des métastases ganglionnaires, à un comportement moins agressif des cancers de l'estomac et à une survie plus longue dans les cancers de stade II (29).

c. *E-cadhérine*

Comme nous le verrons plus loin, la E-cadhérine (*CDH-1*) appartient à la superfamille des cadhérines, protéines impliquées dans l'adhésion cellulaire inter-cellulaire. Le gène *CDH1* de la E-cadhérine situé sur le chromosome 16q22 joue un rôle important dans la carcinogenèse gastrique : des mutations germinales de *CDH-1* ont été identifiées chez les patients atteints de la forme héréditaire des cancers gastriques de type diffus (38). Dans les formes sporadiques, la E-Cadhérine est fréquemment inactivée par LOH, mutation ou hyperméthylation (39; 40). La méthylation est observée dans plus de 50% des cancers sporadiques de type diffus de stade précoce, alors que les mutations sont surtout observées dans les cancers diffus de stade tardif (37).

d. *Autres gènes suppresseurs de tumeur*

Les mutations d'APC, gène localisé sur le chromosome 5q21-q22 (11), sont observées dans plus de 50% des cas de cancer gastrique de type intestinal. Elles ne sont pas détectées dans les cancers gastriques de type diffus (29). L'inactivation par mutation d'APC entraîne l'activation de la voie Wnt entraînant la translocation de la β -caténine dans le

noyau cellulaire. Actuellement, l'implication de la voie APC/ β Caténine dans le développement des cancers de l'estomac reste obscure.

Le gène de *p16*, localisé dans la région chromosomique 9p21 (11), code pour un inhibiteur du cycle cellulaire. La perte d'expression de p16 a été décrite dans les cancers gastriques de type intestinal et diffus ; cette perte d'expression serait associée à la présence de métastases ganglionnaires (29).

La perte d'hétérozygotie et les mutations de *PTEN*, gène situé dans la région chromosomique 10q23.3 (11) ont été associées à l'infiltration et aux cancers gastriques métastatiques (29).

Le gène *RUNX3* (chromosome 1p36) (11), un des trois « mammalian runt-related gene » a été récemment identifié comme gène suppresseur de tumeur. La perte d'expression de *RUNX3* est liée à une délétion hémizygote et à une hyperméthylation qui est fréquemment observée dans les cancers de l'estomac (37).

E. Classification TNM et en stades

Elle tient compte des constatations per opératoires du chirurgien et de l'analyse anatomo-pathologique de la pièce d'exérèse (Tableau 2).

<u>T-Tumeur primitive</u>					
▪	TX : Renseignements insuffisants pour classer la tumeur primitive.				
▪	T0 : Pas de signe de tumeur primitive.				
▪	Tis : Carcinome in-situ : tumeur intra-épithéliale sans invasion de la muqueuse.				
▪	T1 : Tumeur envahissant la muqueuse ou la sous-muqueuse.				
▪	T2 : Tumeur envahissant la musculature ou la sous-séreuse.				
	T2a Tumeur envahissant la musculature.				
	T2b Tumeur envahissant la sous-séreuse.				
▪	T3 : Tumeur envahissant la séreuse (péritoine viscéral) sans envahissement des structures adjacentes.				
▪	T4 : Tumeur envahissant les structures adjacentes.				
<u>N-Adénopathies régionales</u>					
▪	NX : Renseignements insuffisants pour classer les adénopathies.				
▪	N0 : Pas de signe d'atteinte des ganglions lymphatiques régionaux.				
▪	N1 : Envahissement de 1 à 6 ganglions lymphatiques régionaux.				
▪	N2 : Envahissement de 7 à 15 ganglions lymphatiques régionaux.				
▪	N3 : Envahissement de plus de 15 ganglions lymphatiques régionaux.				
<u>M-Métastases à distance</u>					
▪	MX : Renseignements insuffisants pour classer les métastases à distance.				
▪	M0 : Pas de métastase à distance.				
▪	M1 : Présence de métastase(s) à distance				
		Stade 0	Tis	N0	M0
		Stade IA	T1	N0	M0
		Stade IB	T1	N1	M0
			T2a/b	N0	M0
		Stade II	T1	N2	M0
			T2a/b	N1	M0
			T3	N0	M0
		Stade IIIA	T2a/b	N2	M0
			T3	N1	M0
			T4	N0	M0
		Stade IIIB	T3	N2	M0
		Stade IV	T4	N1,N2,N3	M0
			T1,T2,T3	N3	M0
			tous T	tous N	M1

Tableau 2 : Classification TNM et en stades

Les cancers gastriques sont parfois classés morphologiquement en cancers « superficiels » et en cancers « invasifs » (9).

Par définition, les cancers « superficiels » sont limités à la muqueuse et à la sous-muqueuse, correspondant au stade pT1 de la classification TNM, quelque soit leur statut ganglionnaire. Ils sont classés macroscopiquement en type I (polypoïde), II (superficiel) et III (excavé). La probabilité d'envahissement ganglionnaire est de 3 à 11% pour les cancers envahissant la muqueuse et de 12 à 26% pour les cancers atteignant la sous-muqueuse. Le délai de progression vers un cancer « invasif » est en moyenne de 8 ans (41).

Par définition, les cancers invasifs atteignent la musculature (\geq pT2). Boormann (22) a classé ces cancers en 4 types selon leurs aspects macroscopiques : type I (polypoïde), II (ulcérant), III (ulcérant et infiltrant) type le plus fréquent et type IV (infiltrant) correspondant à la limite.

F. Traitement

1. Chirurgie

Jusqu'à présent, elle constitue le seul traitement éventuellement curatif du cancer de l'estomac. Elle n'est malheureusement réalisable que chez moins de 50% de la population générale. Le geste chirurgical de gastrectomie partielle, totale ou en monobloc dépend de la localisation de la tumeur et de son extension. Ce geste s'accompagne toujours d'un curage ganglionnaire devant comporter au moins 20 ganglions. La morbidité est d'environ 30% et la mortalité liée à la chirurgie est d'environ 6% (42).

2. Radiothérapie

A elle seule, elle n'a pas d'efficacité démontrée dans le traitement à visée curative ; elle est parfois utilisée dans le traitement palliatif.

3. Chimiothérapie

Jusqu'à récemment, elle était réputée comme ayant peu d'effet sur l'évolution des cancers de l'estomac. Les résultats récents de l'essai MAGIC (43) sont en faveur de la chimiothérapie périopératoire, c'est à dire débutée en préopératoire et adjuvante. Elle consiste en l'association d'épirubicine, de cisplatine et de 5 FU (ECF). Elle entraîne une diminution de la taille tumorale, du stade tumoral et améliore significativement la survie sans progression et la survie globale des patients.

En cas de métastases, la chimiothérapie prolonge la durée et la qualité de vie d'environ 6 mois mais les taux de survie médiane ne dépassent pas 9 mois (4). Ils existent plusieurs protocoles (44) : le protocole DCF (docetaxel, 5FU, cisplatine), le protocole ECF (epirubicine, cisplatine, 5-FU), le protocole LV5FU2-cisplatine plus souvent prescrit car moins contraignant (4), le protocole ILF (irinotecan, 5FU, leucovorin) qui donneraient de meilleurs résultats que le protocole ELF (etoposide, leucovorin, 5-FU) (45).

4. Radio-chimiothérapie

Il semblerait qu'une radiothérapie associée à une chimiothérapie à base de 5-FU diminue le risque de rechute chez les patients opérés d'un cancer de l'estomac localement évolué. Le protocole utilisé s'appelle protocole Mac Donald. Il associe dix à douze cures de chimiothérapie et une cure de radiothérapie débutée au troisième cycle de chimiothérapie (44).

II. Le Tissue Microarrays (TMA)

Nous décrivons la technique de Tissue Microarrays sur laquelle repose l'ensemble de notre travail et les études statistiques qui en découlent.

A. Historique, définition

L'idée est née de la réflexion en 1997 d'un jeune étudiant, Juha KONOKEN au National Human Genome Research Institut de Bethesda, qui travaillait sur des cDNA micro-array. Il chercha à améliorer sur une plus large échelle la signification de ses résultats obtenus en « DNA microarray ». Il a donc pensé à inclure des centaines de carottes de tissu au sein d'un seul bloc de paraffine (46). Il s'est largement inspiré du principe du bloc tissulaire multi-tumoral surnommé « bloc saucisse » de Battifora développé en 1986 pour vérifier la spécificité des anticorps nouvellement développés pour l'immunohistochimie (47). Guido SAUTER à Bâle a développé la technique et l'a appliquée à des études pharmacologiques (48).

La technologie des TMA permet d'ordonner dans un même un bloc de paraffine des échantillons tissulaires fixés et inclus en paraffine et de les analyser sur une même lame histologique. Cette technique permet ainsi d'intégrer dans un même bloc en paraffine des lésions à différents stades évolutifs d'une cohorte importante de patients et d'observer in situ l'expression de protéines d'intérêt par immunohistochimie et de gènes d'intérêt par hybridation in situ.

B. Méthodologie

La construction des TMA se fait en plusieurs étapes :

- 1) Sélection de blocs de paraffine comportant les tissus d'intérêt d'une cohorte de patient,
- 2) Sélection des zones d'intérêt par la lecture des lames correspondant aux blocs sélectionnés,
- 3) Prélèvements de carottes dans les blocs de tissus inclus en paraffine sélectionnés avec un punch biopsique dont le diamètre varie entre 0,6 et 4 mm,
- 4) Inclusion ortho-normée des carottes prélevées selon un plan préétabli dans un bloc de paraffine receveur.

Ces 2 dernières étapes sont faites à l'aide d'un « tissu microarrayeur » (figure 3) à l'aide de deux aiguilles de calibres différents, une pour créer le trou receveur et une pour combler le trou receveur avec la biopsie issue du bloc de paraffine donneur. Selon le diamètre du punch biopsique utilisé, jusqu'à mille carottes peuvent être incluses dans un seul bloc de paraffine receveur. Le bloc receveur est ensuite coupé avec un microtome (figure 3). Cent à 500 coupes de 5 microns peuvent être obtenues à partir de chaque bloc de Tissue Microarrays. Ce système est manuel et nécessite 1 ou 2 semaines de travail pour construire un TMA. De nouveaux types de tissu-microarrayeur robotisé apparaissent (Suède) et permettront la construction plus rapide des TMAs. Néanmoins le meilleur des robots ne pourra s'affranchir de l'œil du pathologiste pour la sélection des zones d'intérêts.

La perte de points tissulaires lors du transfert ou de la coupe au microtome constitue un des problèmes de cette technique. Chaque lame de TMA présente une perte tissulaire estimée entre 10 et 30% de la totalité des points tissulaires créés. Pour pallier à cette perte, certains auteurs proposent de faire 3 blocs de TMA pour une même série, de bien remplir le trou receveur au besoin par plusieurs fragments du même tissu et surtout d'utiliser un bloc donneur d'au minimum 3-4 mm d'épaisseur tissulaire (49).

Des analyses ont comparé les résultats immunohistochimiques obtenus sur les coupes entières des blocs de paraffine donneurs et les coupes de TMA incluant un nombre croissant de points tissulaires provenant du même bloc donneur. Un taux de concordance satisfaisant est obtenu dès lors que 3 carottes du même cas sont incluses dans le TMA. L'inclusion de 3 carottes permet de pallier les pertes de points tissulaires au cours de la technique et

d'apprécier l'hétérogénéité tissulaire. Néanmoins le nombre de carottes doit être adapté en fonction de la densité cellulaire des tumeurs et du diamètre du punch biopsique utilisé (49).

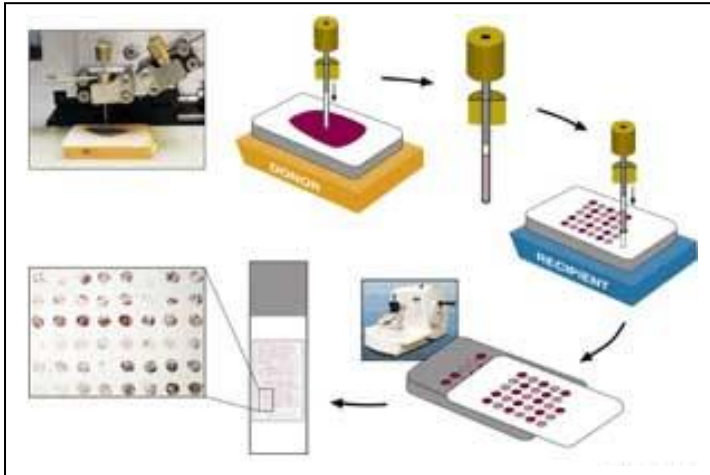


Figure 3 : Protocole de construction d'un Tissu MicroArray

C. Applications

Cette technique est un outil de recherche à haut débit d'étude protéomique.

Le TMA permet de :

- Valider des marqueurs d'intérêt prédictif et pronostique en pathologie tumorale et non tumorale,
- Rechercher de nouvelles cibles thérapeutiques,
- D'effectuer des contrôles de qualité des techniques d'immunohistochimie et de contrôler la spécificité et la sensibilité des nouveaux anticorps développés à des fins diagnostiques (construction d'un modèle prenant en compte soit différents types de fixation, ou de type de tissus permettant ainsi d'obtenir des contrôles externes et internes).

III. Biomarqueurs

Les biomarqueurs d'intérêt pour cette étude d'une cohorte de patients atteints de cancers de l'estomac sont décrits dans ce chapitre et schématisés sur la figure 4.

A. E-cadhérine

La E-cadhérine est considérée comme un gène suppresseur de tumeur (50). La E-cadhérine est un membre de la famille des glycoprotéines transmembranaires, exprimée par les cellules épithéliales, responsable de l'adhérence intercellulaire dépendante du calcium. Le domaine extracellulaire de la E-cadhérine permet l'adhérence intercellulaire et le domaine cytoplasmique interagit avec des protéines intracytoplasmiques liées au cytosquelette (51). Ces protéines sont l' α , la β et la γ -caténines ainsi que la p120 caténine. La E-cadhérine participe donc à l'intégrité structurale des épithélia : elle aide à réguler la stabilité locale, l'adhérence et la déshérence et intervient dans l'activité des autres régulateurs de la polarité cellulaire.

Son implication dans la progression tumorale est décrite depuis longtemps : la perte d'activité de la E-cadhérine dans les tumeurs entraînerait la progression rapide d'un adénome à un carcinome invasif et métastatique (52).

B. β -caténine

La β -caténine est une protéine cytoplasmique, initialement décrite comme une molécule jouant un rôle structural dans l'adhérence cellulaire. Au niveau des jonctions adhérentes intercellulaires, elle interagit directement avec deux autres molécules d'adhérence : la E-cadhérine et l' α -caténine qui se lie aux filaments d'actine. Ce complexe permet de maintenir l'adhérence cellulaire en reliant les cadhérines au cytosquelette d'actine.

Indépendamment de ce complexe, la β -caténine libre dans le cytoplasme joue un rôle central dans la voie de signalisation Wnt, qui est impliquée dans le développement et la progression tumorale (53). Dans le processus de développement, les facteurs wnt induisent une accumulation de β -caténine en inhibant sa dégradation. La β -caténine s'associe ainsi dans le noyau aux facteurs de transcription de la famille Tcf/Lef induisant la transcription de gènes cibles.

Dans les cellules normales et en l'absence de facteurs wnt, la β -caténine est constitutivement dégradée. Cette dégradation est initiée par un complexe multiprotéique incluant le produit du gène suppresseur de tumeur APC, la kinase GSK3 β , les protéines de la famille axine/conductine. Dans la majorité des cancers, des altérations géniques d'APC, de β -caténine ou de l'axine/conductine conduisent à la production de protéines tronquées qui rendent impossible la dégradation de β -caténine. Les complexes β -caténine/Tcf-Lef activent alors de façon constitutive la transcription de gènes dont les produits contribuent à la progression tumorale comme : 1) c-myc, un facteur de transcription oncogénique, 2) la cycline D1, un régulateur important du cycle cellulaire, 3) la matrilysine, qui est impliquée dans l'invasion et la formation de métastases et 4) la gastrine (54).

La β -caténine est impliquée dans la carcinogenèse comme le montre l'augmentation de l'accumulation nucléaire de β -caténine dans les lésions précancéreuses type adénomes gastriques (55). De plus des mutations activatrices du gène de la β -caténine (*CTNNB1* situé sur le chromosome 3p21) ont été détectées dans des cancers gastriques sporadiques (56). Chez les patients ayant une mutation germinale d'APC, le risque de développer un cancer gastrique est multiplié par dix (57).

Néanmoins la relation entre la β -caténine et les cancers de l'estomac est encore obscure.

C. Her2

Her2 est une protéine appartenant à la famille des récepteurs transmembranaires tyrosine kinase. Il s'agit d'un membre de la famille de l'EGFR (epidermal growth factor receptor). Cette famille se compose de 4 membres : Her1 (connu aussi sous le nom d'EGFR), Her2 (ErbB-2), Her3 (ErbB-3) et Her4 (ErbB-4). Ces récepteurs partagent la même structure

moléculaire comprenant un domaine extracellulaire de liaison aux ligands, un court domaine transmembranaire et un domaine intra-cytoplasmique portant l'activité tyrosine kinase. Her3 ne possède pas cette activité. La liaison des ligands au domaine extracellulaire initie une cascade de signalisation qui influence de nombreux aspects de la biologie cellulaire des tumeurs : prolifération, adhésion, migration et différenciation. La liaison des ligands au récepteur monomérique induit une homodimérisation ou une hétérodimérisation avec les autres protéines Her. Her2 n'a pas de ligand connu mais constitue le partenaire préférentiel de l'hétérodimérisation. Her2 est codé par un gène localisé sur le chromosome 17q21. Il agit comme oncogène : l'amplification du gène induit une surexpression de la protéine à la membrane cellulaire conférant à la cellule maligne de nombreux avantages (58).

Her2 est impliqué dans le développement de nombreux type de cancer et notamment le cancer du sein où il est détecté dans 10 à 34% des cancers invasifs. Cette expression est un facteur de mauvais pronostic et de mauvaise réponse au traitement (59).

Des liens ont été décrits entre Her2, la E-cadhérine et la β -caténine. Le fragment soluble de la E-cadhérine produit par le clivage par les A Disintegrin and Metalloproteinase (ADAM) interagirait avec Her2 et Her3 pour stabiliser l'hétérodimérisation et donc l'activation de la voie Erk dans des cellules cancéreuses mammaires (60). Quant au lien avec la β -caténine, la phosphorylation dépendante d'Her2 permettrait la dissociation de la β -caténine du complexe E-cadhérine/ β -caténine et donc l'activation de la voie Wnt (61).

D. Notch-1

La voie de signalisation Notch est impliquée dans l'homéostasie tissulaire. La famille des protéines Notch comprend 4 membres (Notch1 à Notch4) correspondant à des récepteurs membranaires qui sont faits d'un domaine extracellulaire, d'un domaine transmembranaire et d'un domaine intracellulaire. Le domaine intracellulaire de ces récepteurs est clivé par l'activité successive des α sécrétases (ADAM17 ou TACE) et des γ sécrétases (Préséniline 1) après liaison du domaine extracellulaire avec des ligands présents sur les cellules adjacentes Jagged et Delta. Le domaine intracellulaire de Notch est alors transféré dans le noyau où il exerce une activité de facteur de transcription et induit l'expression de gènes cibles comme

Hes (62; 63). *Hes* a été montré comme répresseur transcriptionnel de *Hath1* impliqué dans la différenciation cellulaire intestinale.

La « voie Notch » aurait pour rôle d'entretenir le compartiment de renouvellement cellulaire des tissus, en préservant le compartiment des cellules souches et en freinant la différenciation des cellules progénitrices (64).

La surexpression de Notch1, 2 et 3 a été détectée dans différents types de cancers (colon, poumon, pancréas). L'association Notch–cancer de l'estomac est beaucoup plus obscure. Sekine *et al* a montré par RT-PCR que Notch1, 2, 3, Hes1 et Hath1 sont exprimés dans la muqueuse gastrique normale et dans des lignées cancéreuses gastriques. Il a également démontré que Hath1 pourrait être un régulateur transcriptionnel de l'expression de MUC6, et de MUC5AC, mucines normalement présentes dans les cellules gastriques. MUC6 est exprimée dans les glandes pyloriques et MUC5AC dans les cellules foveolaires de l'épithélium gastrique fundique (65). Ces données suggèrent que la voie Notch est impliquée dans l'inhibition de la différenciation gastrique et est activée dans les cancers gastriques (66).

Jagged-1 est par ailleurs une cible de la voie Wnt. La voie de signalisation Notch maintiendrait l'homéostasie des cellules souches et progénitrices synergiquement avec la voie Wnt (67).

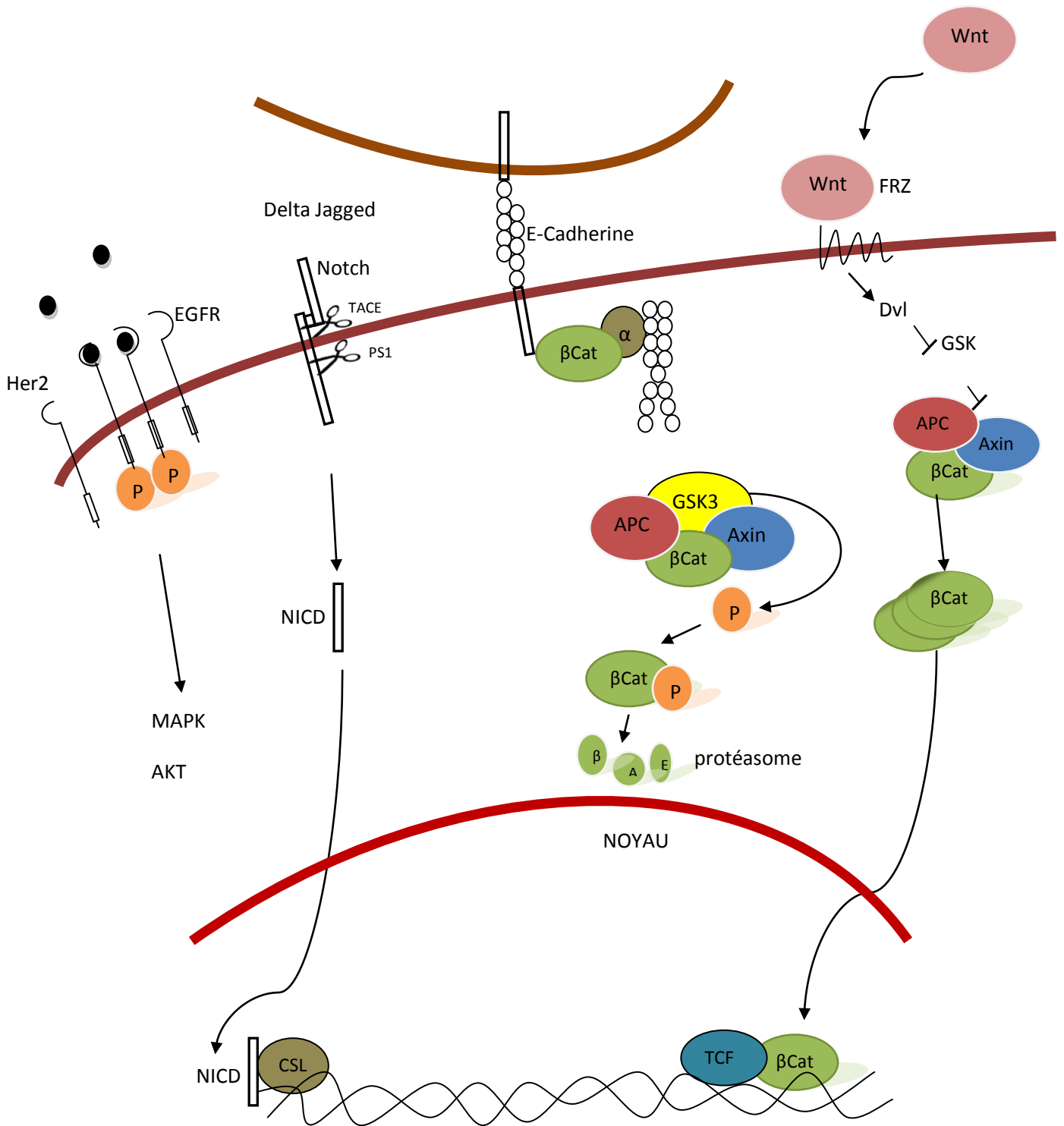


Figure 4 : Schéma représentant les différents biomarqueurs étudiés : la E-cadhérine, la β -caténine, Her2 et Notch1 (FRZ : frizzled ; Dvl : Disheveled ; GSK : glycogen synthase kinase ; NICD : Notch intracellular domain ; TCF : T-cell-specific transcription)

IV. Problématique

A. But du travail

Le but de ce travail était de déterminer l'intérêt diagnostique et pronostique de l'expression de la E-cadhérine, de la β -caténine, de Her 2 et de Notch1 par criblage immunohistochimique et hybridation in situ à haut débit de Tissue-Microarrays de cancers de l'estomac d'une cohorte de 111 patients.

B. Intérêt thérapeutique

Les γ -sécrétases permettent un des clivages protéolytiques de Notch. Des inhibiteurs des γ -sécrétases bloquant ce clivage et donc bloquant l'activation de la voie de signalisation Notch ont été développés. Ces drogues (L-000891675/MK-0752) sont d'ores et déjà testées dans des essais cliniques de traitement des cancers du sein (68). Récemment, une communication à l'ASCO 2009 (69) a décrit l'effet de l'inhibition de la voie Notch par un nouvel inhibiteur des γ -sécrétases (le GSI34) sur la croissance tumorale et l'apoptose. Le GSI34 a de plus un effet potentialisateur de la cytotoxicité des chimiothérapies habituellement utilisés dans les cancers gastriques. Cette étude a été réalisée sur des lignées cancéreuses gastriques.

De même les inhibiteurs d'Her2 sont bien connus : le Trastuzumab (Herceptin™) est un anticorps ciblant spécifiquement la protéine Her2 en se liant directement à son domaine extra-cellulaire. Son utilisation améliore la survie des patients ayant un cancer mammaire Her2 positif (70). Cette efficacité remarquable dans la prise en charge des cancers mammaires a incité de nombreuses équipes à investiguer son activité anti-tumorale dans d'autres cancers et notamment le cancer gastrique (ASCO2009).

MATERIEL ET METHODES

I. Patients

Cent onze patients traités par gastrectomie pour cancer de l'estomac entre 1995 et 2005 ont été inclus dans l'étude. Les blocs de paraffine des tumeurs étaient archivés dans le service d'Anatomo-Pathologie du CHU de Nantes.

Les données clinico-pathologiques suivantes ont été collectées pour l'ensemble des tumeurs :

- l'âge des patients au moment du diagnostic
- le type histologique de la tumeur (selon la classification de l'OMS : tubulaire, papillaire, colloïde, à cellules isolées)
- le grade de la tumeur
- le stade tumoral (pTNM et en stade IA-IB-II-III-IIIIB-IV)
- les données évolutives : date des dernières nouvelles, la durée de survie sans événement, les récurrences éventuelles, le décès éventuel, la cause du décès et la durée totale de survie.

II. Construction des « Tissu Microarrays » (TMAs)

Sept TMAs ont été construits. Les lames colorées à l'hématoxyline-éosine-safran (HES) de l'ensemble des patients, ont été relues pour sélectionner les zones d'intérêt des tumeurs gastriques.

Les TMAs ont été construits à l'aide d'un tissu-microarrayeur (« Beecher Instrument », Silversprings, MD USA) selon le protocole décrit plus haut (71) :

- Forage d'un puits dans un bloc de paraffine vierge (bloc receveur) à l'aide d'une aiguille de 1 mm de diamètre

- Prélèvement à l'aide d'un trocart préleveur de 0.9 mm de diamètre dans le bloc comportant la zone d'intérêt préalablement sélectionnée (bloc donneur)
- Introduction de la carotte biopsique dans le puits creusé dans le bloc receveur
- Répétition de la manœuvre pour l'ensemble des blocs donneurs sélectionnés grâce au déplacement selon les axes x et y ; chaque tumeur était représentée par trois carottes différentes, les lésions précancéreuses étaient représentées par une carotte ; enfin une carotte de muqueuse normale gastrique pour chaque cas était également introduite.

Le repérage de chaque carotte et donc de son origine était renseigné sur un patron informatisé.

Les blocs receveurs étaient ensuite coupés à l'aide d'un microtome en coupes de 4 μm d'épaisseur placées sur des lames de verre sialinisées. La coupe de chaque carotte présente au sein du bloc receveur est devenue ainsi un spot.

III. Protocole d'étude immunohistochimique

A. Protocole d'étude immunohistochimique sur les blocs de TMA

L'immunohistochimie a été réalisée grâce à un automate (le Bond Max autostainer de Menarini, France). Brièvement, des coupes de 4- μm des blocs de TMA étaient déparaffinées dans trois bains successifs de xylène. Après une réhydratation et un rinçage, un démasquage antigénique par la chaleur était effectué soit dans une solution de Citrate (E-cadherine , β -caténine et Her2) soit dans une solution d'EDTA (Notch1). Les peroxydases endogènes étaient ensuite inhibées par une solution de peroxyde d'hydrogène à 3%. Les coupes étaient alors incubées à température ambiante avec l'anticorps primaire puis rincées. Les anticorps primaires employés et leur méthode de révélation sont détaillés dans le tableau 3. La révélation de l'activité peroxydasique était effectuée par incubation avec la Diaminobenzidène (DAB). La contre-coloration était faite avec l'hématoxyline de Harris pendant 1 minute suivie d'une différenciation par l'eau courante et par immersion dans

l'eau lithinée. La déshydratation des lames était ensuite réalisée dans l'alcool absolu et le toluène. Les lames étaient montées à l'aide du milieu Consulmount™ puis observées au microscope optique.

B. Évaluation du marquage immunohistochimique

Pour tous les marqueurs exprimés à la membrane cytoplasmique ou dans le cytoplasme, il a été utilisé une méthode s'inspirant de celle de Sinicrope (72) évaluant à la fois l'intensité du marquage et la proportion de cellules épithéliales marquées. L'intensité du marquage était classée en 1 (faible), 2 (modérée) et 3 (forte). Les cellules considérées comme positives étaient quantifiées sous forme d'un pourcentage par rapport au nombre de cellules totales et classées dans une de ces catégories : 0 (0%), 1 (1-33%), 2 (33-75%), et 3 (>75%). L'intensité du marquage et le pourcentage de cellules tumorales positives étaient multipliés fournissant ainsi un indice de marquage pour chaque tumeur.

Un résultat était considéré comme positif, lorsque l'indice de marquage était supérieur à 1.

Pour le marquage par l'anticorps anti-Notch1, seul le marquage nucléaire était pris en compte car il permettait de suspecter une activation de Notch1.

Pour chaque spot, les comptages étaient effectués dans les champs comportant le plus de noyaux marqués et 500 noyaux étaient comptés au grossissement x 400. Le résultat était obtenu en pourcentage de noyaux marqués.

C. Hybridation in situ avec des sondes chromogéniques (CISH)

La sonde spécifique d'HER2 utilisée est fabriquée et commercialisée par le Laboratoire Zymed (San Francisco, CA). L'hybridation moléculaire et la détection du signal hybridé est effectuée sur des lames de TMA coupées à 5µm selon les recommandations de la trousse de détection CISH des Laboratoires Zymed. L'amplification était définie par la détection d'au

moins six signaux par noyau dans plus de 50% des cellules tumorales ou quand un cluster de copies de gènes était observé.

anticorps	fournisseur	espèce	Epitope reconnu	dilution en IHC	Révélation en IHC
E-Cadherine (NCH-38)	DakoCytomation	Monoclonal de souris	Ectodomaine	1/100	Bond Polymer Refine
B-Caténine (Clone14)	BD Transduction Laboratories	Monoclonal de souris	Partie C-terminale (571-781 aa)	1/400	Bond Polymer Refine
Her2 (DA485)	Dako	Polyclonal		1/800	Bond Polymer Refine
Notch1 (C20-sc6014)	Santa Cruz Biotechnology	Polyclonal de lapin	Partie C-terminale	1/250	Bond Polymer Refine

Tableau 3 : Anticorps primaires utilisés en immunohistochimie (IHC).

IV. Analyses statistiques

Les études statistiques d'association entre les données clinico-pathologiques et l'expression des biomarqueurs testés ont été faites à l'aide des tests de χ^2 ou du test exact de Fisher, lorsque les échantillons de populations étaient de petite taille. Les différences d'expression des biomarqueurs évaluées quantitativement entre 2 groupes différents étaient évaluées par le test de Student ou le test U de Mann-Whitney selon la répartition équilibrée ou non des variables. Des courbes de Kaplan-Meier ont été réalisées pour comparer la durée de survie sans événement et la durée globale de survie, et les différences étaient évaluées par le test de Log Rank. Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel GraphPadPrism4 (73). La différence était jugée statistiquement significative la valeur du p était inférieur ou égal à 0,05.

RESULTATS

I. Cohorte

Les données clinico-pathologiques sont répertoriées dans le tableau 6.

Cent onze patients ont été inclus, 77 hommes et 34 femmes, de 67 ans d'âge moyen (extrêmes : 38 à 99 ans).

Soixante treize patients étaient atteints d'adénocarcinome de type intestinal (65,8%) (64 adénocarcinomes tubulaires, 5 papillaires, 4 mucineux selon la classification de l'OMS). Il s'agissait de 53 hommes et de 20 femmes (âge moyen de 69 ans; extrêmes : 42 à 99 ans). Quarante cinq pour cent des adénocarcinomes de type intestinal étaient dans l'antre, 21 % dans le fundus, 32 % dans le cardia, et 1 % sur moignon.

Trente huit patients étaient atteints d'adénocarcinome de type diffus (34,2%) (16 adénocarcinomes indifférenciés à cellules isolées et 22 adénocarcinomes à cellules en bagues à chaton de la classification de l'OMS). Il s'agissait de 24 hommes et 14 femmes (âge moyen de 60 ans ; extrêmes de 38 à 85 ans). Soixante huit pour cent des adénocarcinomes de type diffus étaient localisés dans l'antre, 21 % dans le fundus, 8 % dans le cardia et 3 % sur moignon.

II. Expression des biomarqueurs

A. Expression de la E-cadhérine, de la β -caténine, de Her2 et Notch1 dans la muqueuse gastrique normale

Une expression cytoplasmique et membranaire de la E-cadherine et de la β -caténine était présente dans les cellules épithéliales du revêtement fovéolaire, des cryptes et des glandes fundiques et antrales de la muqueuse gastrique normale (figure 5A et B). Un marquage nucléaire de la β -caténine était parfois observé dans les cellules épithéliales du fond des cryptes (figure 5C).

Her2 n'était pas exprimé par les cellules épithéliales de la muqueuse gastrique normale (figure 5D).

Une faible expression cytoplasmique de Notch1 était observée dans les cellules épithéliales gastriques fovéolaires, des cryptes et des cellules des glandes fundiques et antrales, alors que les lymphocytes et les cellules endothéliales du chorion exprimaient intensément Notch1 (figure 5 E).

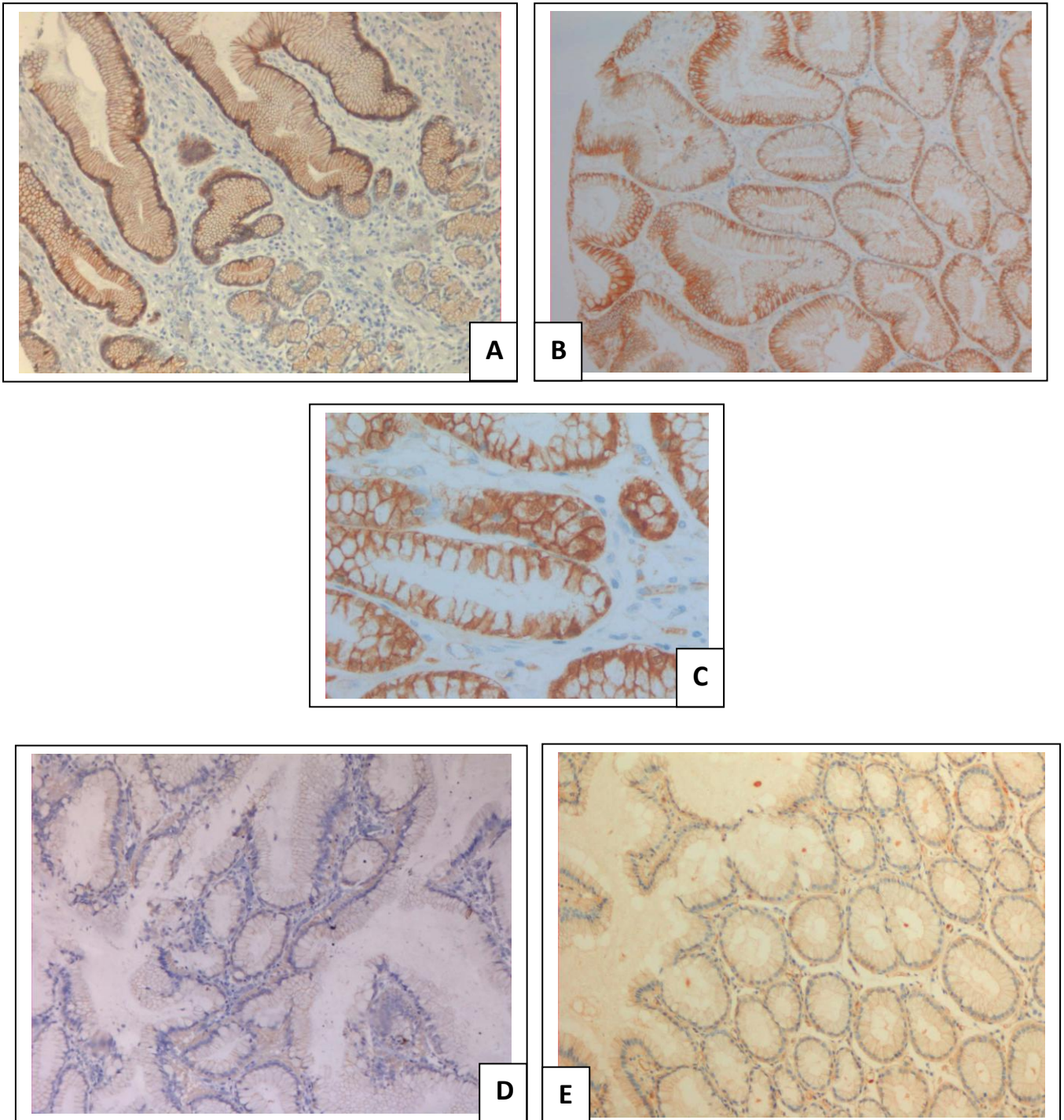


Figure 5 : Expression des biomarqueurs dans la muqueuse gastrique normale.

A : E-cadhérine (x10) : marquage membranaire et cytoplasmique des cellules épithéliales du revêtement fovéolaire, des cryptes et des glandes antrales.

B : β -caténine (x10) : marquage membranaire et cytoplasmique des cellules épithéliales du revêtement fovéolaire, des cryptes et des glandes antrales avec focalement un marquage nucléaire des cellules épithéliales du fond des cryptes (Cx20).

D : Her2 (x10) : absence d'expression par les cellules épithéliales de la muqueuse.

E : Notch1 (x10) : fin marquage cytoplasmique des cellules épithéliales gastriques fovéolaires, des cryptes et des glandes antrales. A noter la positivité des éléments du chorion (lymphocytes, cellules endothéliales).

B. Expression de la E-cadhérine, de la β -caténine, de Her2 et de Notch1 dans les adénocarcinomes gastriques de type intestinal

Les résultats sont récapitulés dans le tableau 4.

Soixante neuf adénocarcinomes de type intestinal (94,5%) exprimaient la E-cadhérine (figure 6A) et 4 (5,5%) ne l'exprimaient pas (figure 6B).

Un marquage membranaire et cytoplasmique des cellules tumorales avec l'anticorps anti- β -caténine était présent dans 70 tumeurs (98,6%). Dans 2 cancers, une expression aberrante de β -caténine était observée avec la présence d'un marquage cytoplasmique associée à une absence de marquage membranaire (figure 6D). Dans 26 tumeurs (35,6%), un marquage nucléaire était observé (figure 6C).

Her2 était exprimé à la membrane des cellules tumorales de 12 des 57 adénocarcinomes de type intestinal testés (21,1%) (Figure 7A). Une amplification de *HER2* était détectée dans ces 12 cas par hybridation in situ chromogénique (Figure 7B). Tous les adénocarcinomes d'architecture papillaire (100%), du fundus et du cardia, et sept des 52 adénocarcinomes tubuleux (13,5%) essentiellement du fundus et du cardia exprimaient Her2.

Un marquage nucléaire de Notch1, témoignant de l'activation de Notch1, était présent dans 60 des 73 cancers de type intestinal (82,2%). Le pourcentage de noyau marqué variait de 0,2 % à 19,7% (médiane = 1,3% ; moyenne = 2,3% \pm 0,3%) (Figure 7C).

C. Expression de la E-cadhérine, de la β -caténine, de Her2 et de Notch1 dans les adénocarcinomes gastriques de type diffus

Les résultats sont récapitulés dans le tableau 4.

Vingt sept des 38 (71,1%) adénocarcinomes gastriques de type diffus exprimaient la E-cadhérine (figure 8A) et 11 (28,9%) avaient une perte d'expression (figure 8B).

L'expression membranaire et cytoplasmique de la β -caténine était présente dans 27 cancers (84,4%) (Figure 8C). L'expression nucléaire de la β -caténine était observée dans 21 cancers (55,3%) (Figure 8C). Comme dans les adénocarcinomes de type intestinal, six tumeurs avaient une expression aberrante de la β -caténine.

Her2 n'était pas exprimé dans les 25 adénocarcinomes de type diffus testés et aucune amplification de *HER2* n'était détectée par hybridation in situ.

Notch1 était exprimé dans le noyau des cellules tumorales de 30 des 38 (78,9%) adénocarcinomes de type diffus. Le pourcentage de noyaux marqués variait de 0,6 à 35,9% (médiane = 4,2%, moyenne = 5,8% ± 0,9%) (Figure 8E).

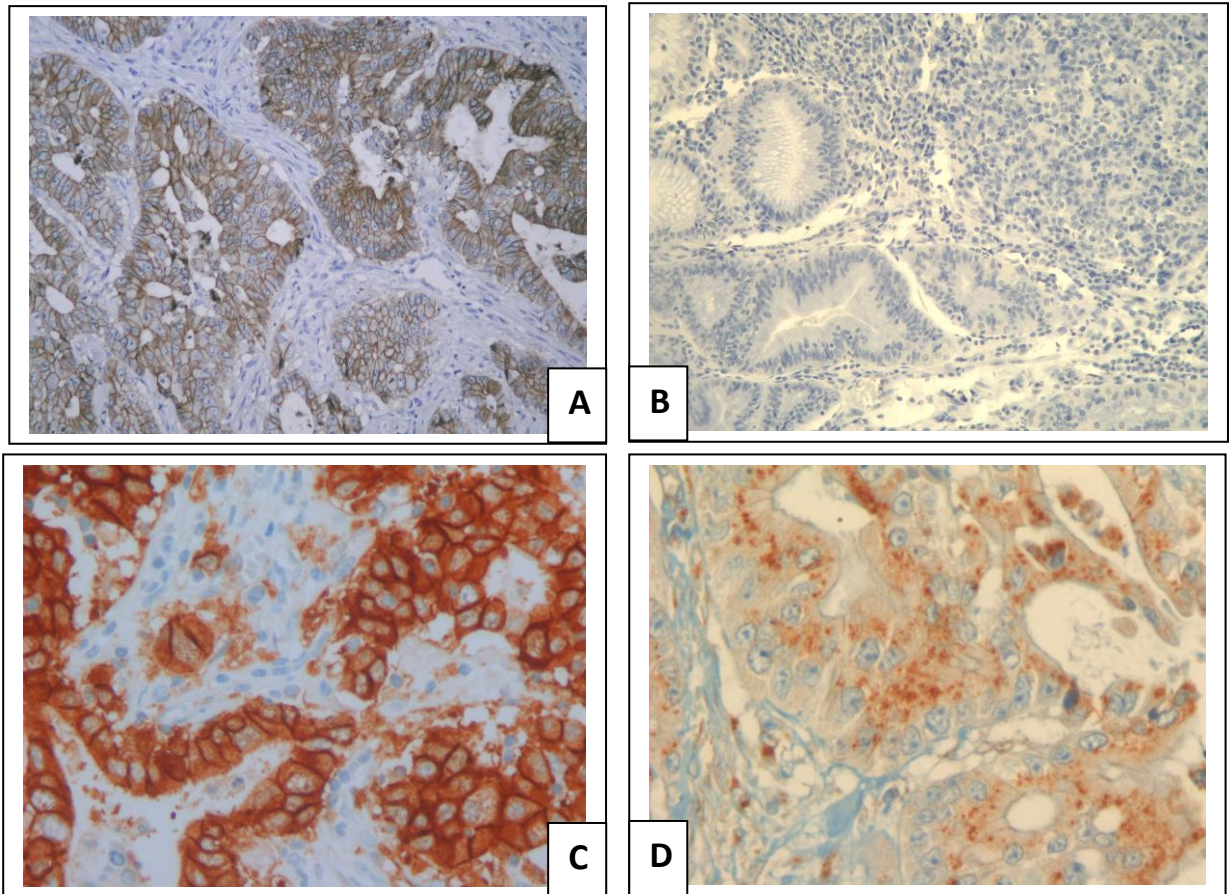


Figure 6 : Expression de la E-cadhérine et de la β -caténine dans les adénocarcinomes de type intestinal.

A : E-cadhérine (x20) : marquage membranaire et cytoplasmique des cellules tumorales d'une tumeur exprimant la E-cadhérine

B : E-cadhérine (x20) : cas d'une tumeur n'exprimant pas la E-cadhérine

C : β -caténine (x40) : marquage membranaire et cytoplasmique et parfois nucléaire des cellules tumorales d'une tumeur exprimant la β -caténine

D : β -caténine (x40) : cas d'une tumeur avec expression aberrante de la β -caténine : présence d'un marquage cytoplasmique avec l'anticorps anti- β -caténine sans marquage membranaire associée.

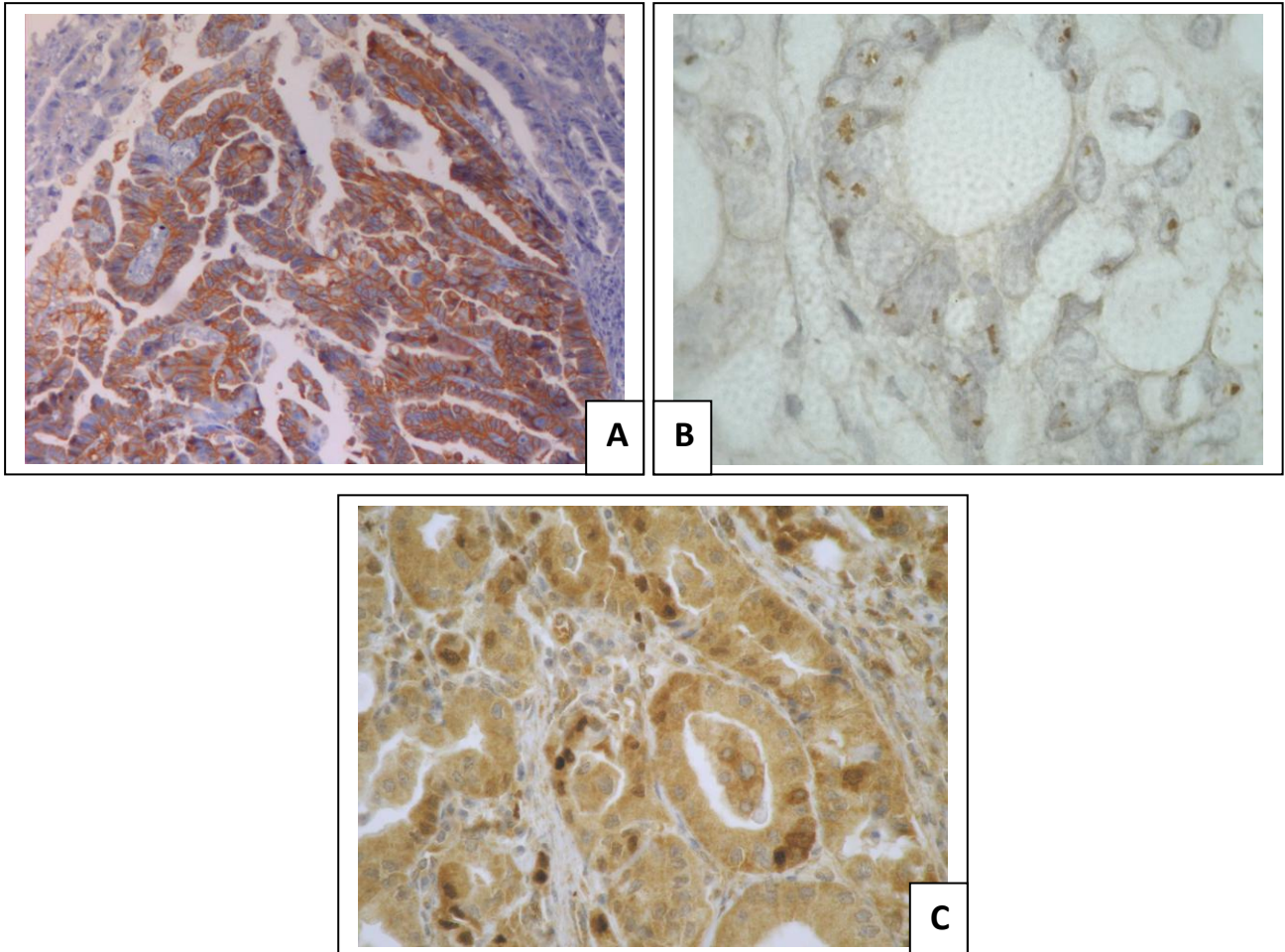


Figure 7 : Expression de Her2 et de Notch1 dans les cancers de type intestinal.

A : Her2 (x20) : marquage membranaire des cellules tumorales d'une tumeur exprimant Her2

B : CISH de Her2 (x1000) : tumeur avec un taux élevé d'amplification du gène HER2

C : Notch1 (x40) : marquage cytoplasmique et parfois nucléaire des cellules tumorales d'une tumeur avec forte activation de Notch.

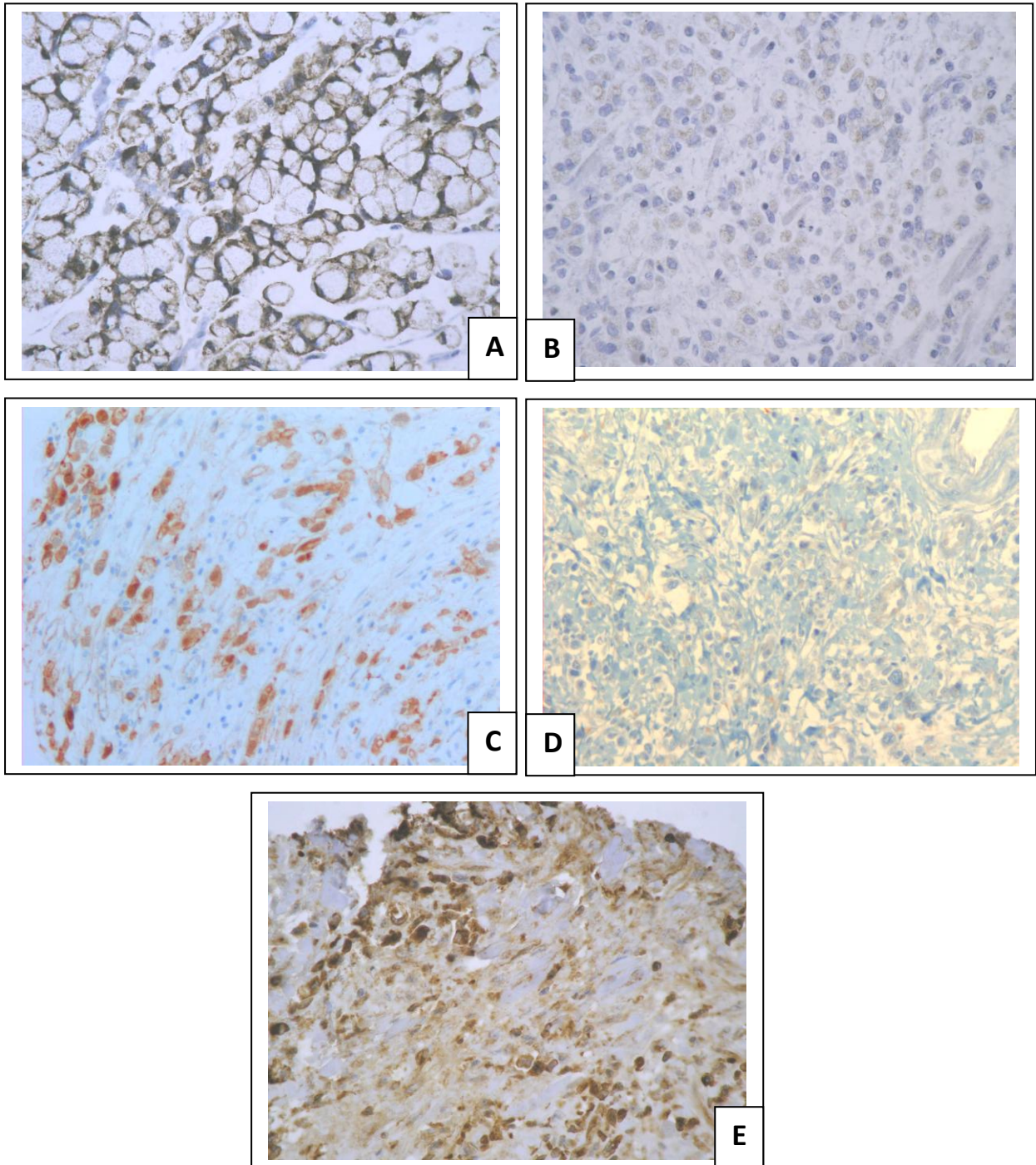


Figure 8 : Expression des biomarqueurs dans les cancers de type diffus.

A : E-cadhérine (x20) : marquage membranaire et cytoplasmique des cellules tumorales d'une tumeur exprimant la E-cadhérine

B : E-cadhérine (x20) : cas d'une tumeur n'exprimant pas la E-cadhérine

C : β -caténine (x20) : marquage membranaire et cytoplasmique et parfois nucléaire des cellules tumorales d'une tumeur exprimant la β -caténine

D : β -caténine (x20) : cas d'une tumeur n'exprimant pas la β -caténine

E : Notch1 (x20) : marquage cytoplasmique et parfois nucléaire des cellules tumorales d'une tumeur avec forte activation de Notch.

D. Le profil d'expression de la E-cadhérine, de la β -caténine, de Her2 et de Notch1 est différent dans les adénocarcinomes de type intestinal et les adénocarcinomes de type diffus

La perte d'expression membranaire de la E-cadhérine était significativement plus fréquente dans les adénocarcinomes de type diffus que dans les adénocarcinomes de type intestinal (test χ^2 : $p=0,002$).

De même, la perte d'expression membranaire et cytoplasmique de la β -caténine était significativement plus fréquente dans les adénocarcinomes de type diffus que dans les adénocarcinomes de type intestinal (test de Fisher : $p = 0,01$).

Le pourcentage de noyaux marqués par Notch1 était significativement plus élevé dans les adénocarcinomes de type diffus que dans les adénocarcinomes de type intestinal (test U de Mann-Whitney : $p = 0,01$) (Figure 9).

L'expression de Her2 et l'amplification du gène n'étaient observées que dans les adénocarcinomes de type intestinal (test exact de Fisher : $p =0,014$) et associée au sous-type histologique papillaire (test exact de Fisher : $p=0,0001$).

		TYPE HISTOLOGIQUE n=111	
		intestinal	diffus
		n = 73	n = 38
E-Cadhérine	<i>positive</i>	69 (94,5%)	27 (71,1%)
	<i>négative</i>	4 (5,5%)	11 (28,9%)
	<i>p</i>	0,002	
β-caténine mb et cytoplasmique	<i>positive</i>	70 (98,6%)	27 (84,4%)
	<i>négative</i>	1 (1,4%)	5 (15,6%)
	<i>p</i>	0,01	
β-caténine nucléaire	<i>positive</i>	26 (35,6%)	21 (55,3%)
	<i>négative</i>	47 (64,4%)	17 (44,7%)
	<i>p</i>	NS	
Her2	<i>positive</i>	12 (21,1%)	0
	<i>négative</i>	45 (78,9%)	25 (100%)
	<i>p</i>	0,014	

Tableau 4 : Corrélation entre l'expression des biomarqueurs (E-cadhérine, β-caténine et Her2) et le type histologique des 111 tumeurs réparties en 73 tumeurs de type intestinal et 38 tumeurs de type diffus. *Le pourcentage indiqué entre parenthèse correspond au % de tumeur du type histologique indiqué plus haut exprimant le marqueur d'intérêt.*

A noter pour le marquage membranaire et cytoplasmique de la β-caténine, seules les tumeurs ayant à la fois un marquage ou une absence de marquage membranaire et cytoplasmique étaient comptabilisées (les marquages aberrants ont été exclus).

Pour l'étude de Her2, 57 adénocarcinomes de type intestinal et 25 de type diffus ont été testés.

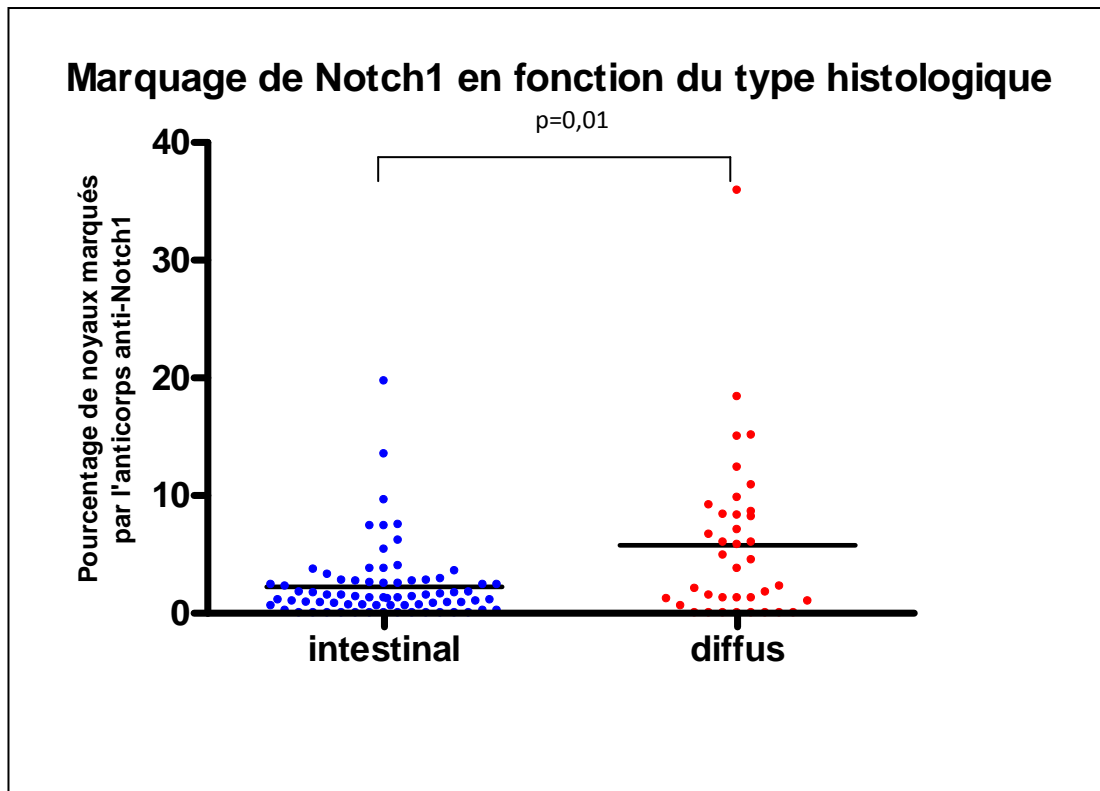


Figure 9: Corrélation entre l'expression nucléaire de Notch1 et le type histologique. Chaque point représente une tumeur ; la barre représente la moyenne du pourcentage de noyaux marqués par l'anticorps anti-Notch1. La moyenne est de 2,3% pour les adénocarcinomes de type intestinal et de 5,8% pour les adénocarcinomes de type diffus.

E. Association entre les marqueurs

Nous ne développerons que les associations statistiquement significatives.

1. La perte d'expression de la E-cadhérine est associée à la perte d'expression de la β -caténine membranaire et cytoplasmique dans les cancers de type diffus

Comme le montre le tableau 5, 80 % des cancers de type diffus n'ayant pas de marquage membranaire et cytoplasmique de β -caténine n'exprimaient pas la E-cadhérine alors que 81,5% des cancers ayant un marquage membranaire de β -caténine exprimaient la E-cadhérine ($p=0,015$).

	<u>E-cadhérine positive</u>	<u>E-cadhérine négative</u>
<i>β-caténine mb et cyto positive</i>	22 (81,5%)	5 (18,5%)
<i>β-caténine mb et cyto négative</i>	1 (20%)	4 (80%)
<i>p</i>	0,015	

Tableau 5 : Association entre l'expression de la E-cadhérine et la β -caténine membranaire et cytoplasmique dans les cancers de type diffus.

2. La perte d'expression membranaire de la E-cadhérine est associée à l'apparition de l'expression nucléaire de la β -caténine dans les cancers de type intestinal

100% des adénocarcinomes de type intestinal avec perte d'expression de la E-cadhérine et 32,9% des adénocarcinomes de type intestinal exprimant la E-cadhérine avaient un marquage nucléaire de la β -caténine. Il apparaît que la perte d'expression de la E-cadhérine était associée à l'expression nucléaire de la β -caténine (test de Fisher $p=0,01$).

3. L'activation de Notch1 est associée à la perte d'expression membranaire de la E-cadhérine et de la β -caténine dans les cancers de type diffus

La moyenne du pourcentage de noyaux marqués par l'anticorps anti-Notch1 était de 4,3% lorsque les tumeurs exprimaient la E-cadhérine alors qu'elle était de 9,3% lorsqu'il y avait perte d'expression de la E-cadhérine (test de Student $p=0,045$) (Figure 10). De même la moyenne du pourcentage de noyaux marqués par l'anticorps anti-Notch1 était de 4,4% lorsque les cancers avaient un marquage membranaire et cytoplasmique de la β -caténine alors qu'elle était de 12,4 % lorsqu'il y avait perte d'expression membranaire et cytoplasmique de la β -caténine (test de Student $p=0,022$) (Figure 11).

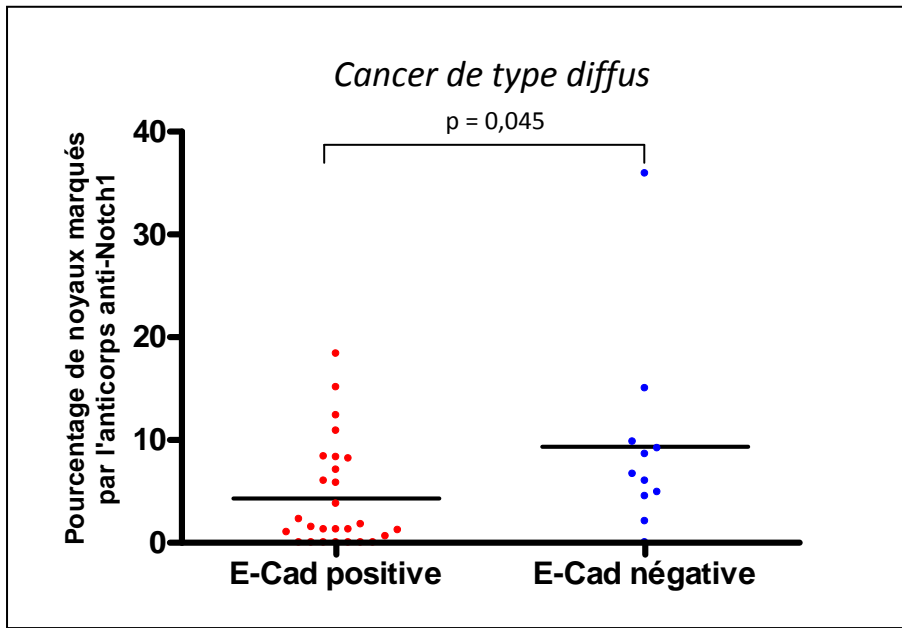


Figure 10 : Comparaison du pourcentage de noyaux marqués par l'anticorps anti-Notch1 en fonction de l'expression de la E-cadhérine par les cellules tumorales des cancers de type diffus. Le pourcentage moyen de noyaux marqués est de 4,3% pour les cancers exprimant la E-cadhérine et de 9,3% pour les cancers avec perte d'expression de la E-cadhérine.

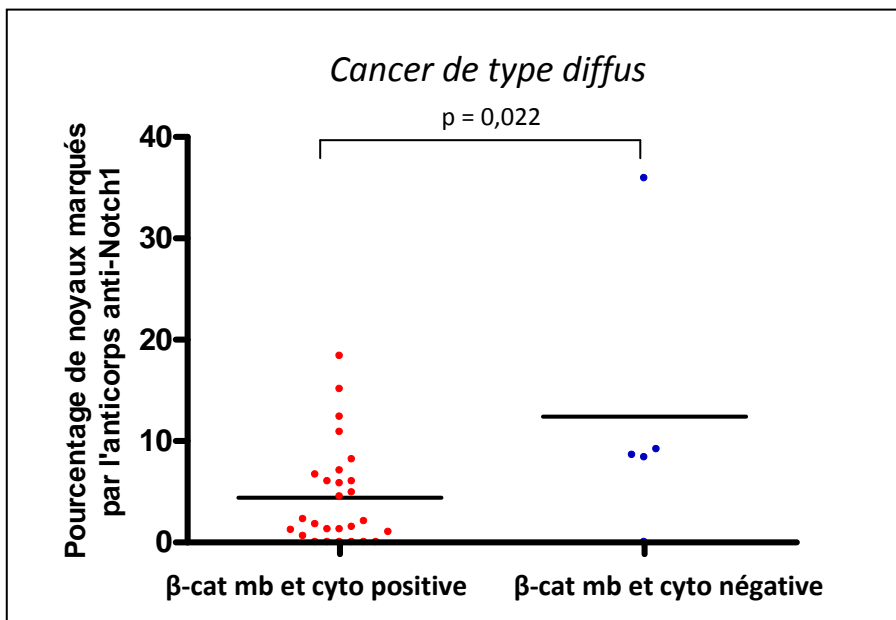


Figure 11 : Comparaison du pourcentage de noyaux marqués par l'anticorps anti-Notch1 en fonction de l'expression membranaire et cytoplasmique de la β -caténine par les cellules tumorales des cancers de type diffus. Le pourcentage moyen de noyaux marqués est de 4,4% pour les cancers exprimant la β -caténine et de 12,4 % pour les cancers avec perte d'expression membranaire et cytoplasmique de la β -caténine.

III. Corrélation de l'expression des marqueurs avec les données clinico-pathologiques

Les données clinico-pathologiques de 103 des 111 patients étaient colligées. Huit patients étaient considérés comme étant «perdus de vue ». Le stade des tumeurs était établi sur les pièces opératoires d'après les critères TNM de la classification internationale des cancers de l'estomac. Une des tumeurs n'ayant pas de statut ganglionnaire n'a pas pu être classée. Parmi les cancers de type intestinal, 41 (57 %) étaient de stade précoce (I-II) et 31 (43 %) de stade évolué (III-IV). Neuf pour cent des adénocarcinomes de type intestinal étaient de stade T1, 52 % de stade T2, 33 % de stade T3 et 6 % de stade T4. Dix huit pour cent étaient de statut N0, 53 % de statut N1, 21 % de statut N2 et 8 % de statut N3. Six des 73 adénocarcinomes de type intestinal était d'emblée métastatique M1 (8 %) (Tableau 6).

Parmi les cancers de type diffus, 13 (34 %) étaient de stade précoce (I-II) et 25 (66 %) de stade évolué (III-IV). Treize pour cent étaient de stade T1, 26 % de stade T2, 58 % de stade T3 et 3 % de stade T4. Trente deux pour cent étaient de statut N0, 18 % étaient de statut N1, 32 % de statut N2 et 18 % de statut N3. Neuf des 38 cancers de type diffus étaient d'emblée métastatique (24 %) (Tableau 6).

Tous les patients sont décédés de leur maladie. La médiane de survie globale était de 22 mois. Elle était de 41 mois dans les cancers de type intestinal et de 19 mois dans les cancers de type diffus. La survie n'était pas statistiquement différente (test de Log Rank $p=0,4221$) (Figure 12). Une évolution métastatique était dépistée dans 28 des 73 adénocarcinomes de type intestinal (38,9%). Les localisations préférentielles des métastases étaient le foie (23,8%) et les ganglions rétro-péritonéaux ou médiastinaux (16,7%). Dans le groupe des cancers de type diffus, une évolution métastatique était détectée dans 22 des 38 adénocarcinomes de type diffus (59,5%). La localisation préférentielle de ces métastases était le péritoine (40,7%).

		<u>ENSEMBLE</u>	<u>INTESTINAL</u>	<u>DIFFUS</u>	<u>p</u>
Total		111	73	38	
Sexe					
	homme	77	53	24	NS
	femme	34	20	14	
Age (moyenne)		67	69	60	
Localisation					
	cardia	27 (24,3%)	24 (32,4%)	3 (7,9%)	0,011
	fundus	23 (20,7%)	15 (20,6%)	8 (21,1%)	
	antre	59 (53,2%)	33 (45,2%)	26 (68,4%)	
	moignon	2 (1,8%)	1 (1,4%)	1 (2,6%)	
Stade					
	I	23 (20,9%)	14 (19,4%)	9 (23,7%)	0,015
	II	31 (28,1%)	27 (37,5%)	4 (10,5%)	
	III	27 (24,6%)	17 (23,6%)	10 (26,3%)	
	IV	29 (26,4%)	14 (19,4%)	15 (39,5%)	
Infiltration					
	T1 (muqueuse ou sous-muqueuse)	12 (10,8%)	7 (9,5%)	5 (13,2%)	0,039
	T2 (muscleuse ou sous-séreuse)	48 (43,2%)	38 (52,1%)	10 (26,3%)	
	T3 (séreuse)	46 (41,5%)	24 (32,9%)	22 (57,9%)	
	T4 (structures adjacentes)	5 (4,5%)	4 (5,5%)	1 (2,6%)	
Statut ganglionnaire					
	N0	25 (22,7%)	13 (18,1%)	12 (31,6%)	0,006
	N1 (1-6 gg métastatiques)	45 (41%)	38 (52,8%)	7 (18,4%)	
	N2 (7-15 gg)	27 (24,5%)	15 (20,8%)	12 (31,6%)	
	N3 (plus de 15 gg)	13 (11,8%)	6 (8,3%)	7 (18,4%)	

Tableau 6: Caractéristiques clinico-pathologiques de la cohorte.

A. Corrélation entre l'expression des biomarqueurs et le stade TNM au moment du diagnostic

Il n'a pas été observé de corrélation entre l'expression des biomarqueurs et le stade T et le statut ganglionnaire des tumeurs.

B. Corrélation entre l'expression des biomarqueurs et la survie globale et la survie sans évènements

Il n'a pas été observé de corrélation entre l'expression des marqueurs et la survenue de métastases.

La perte d'expression membranaire et cytoplasmique de la β -caténine dans le groupe des cancers de type diffus (figure 13) et l'expression de Her2 ou l'amplification de Her2 dans le groupe des cancers de type intestinal (figure 14) étaient liées à une survie globale significativement plus courte (test de log Rank : respectivement $p = 0,025$ et $p = 0,009$).

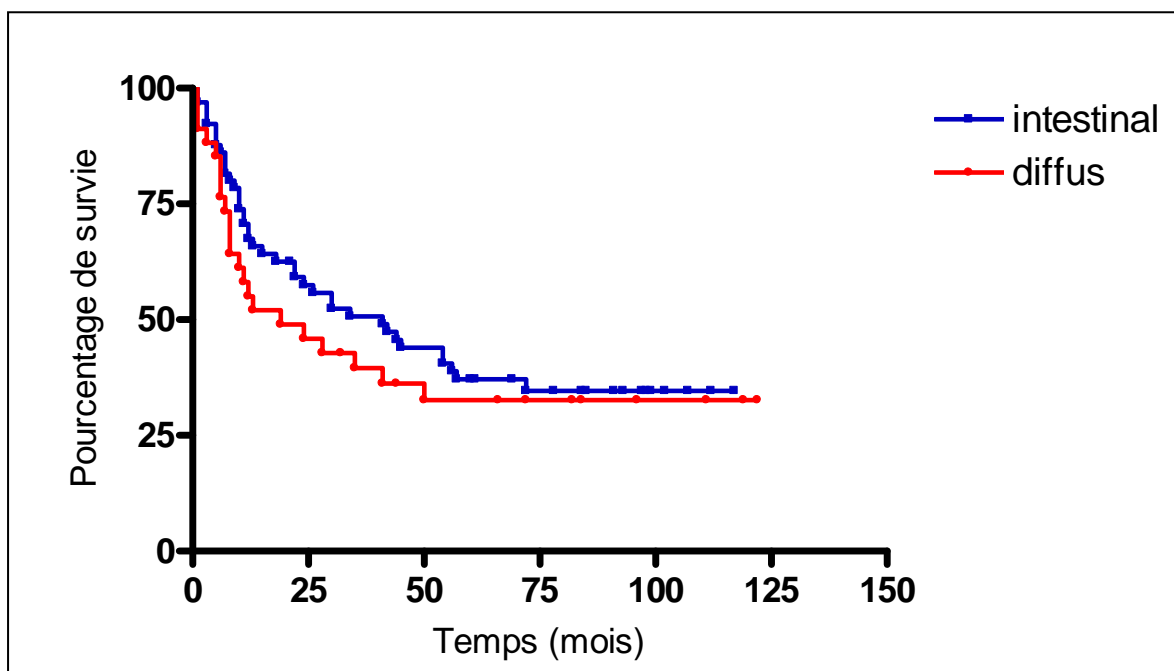


Figure 12: Comparaison de la survie des patients en fonction du type histologique. La médiane de survie est de 19 mois dans les cancers de type diffus et de 41 mois dans les cancers de type intestinal (test de Log Rank : $p=0,42$)

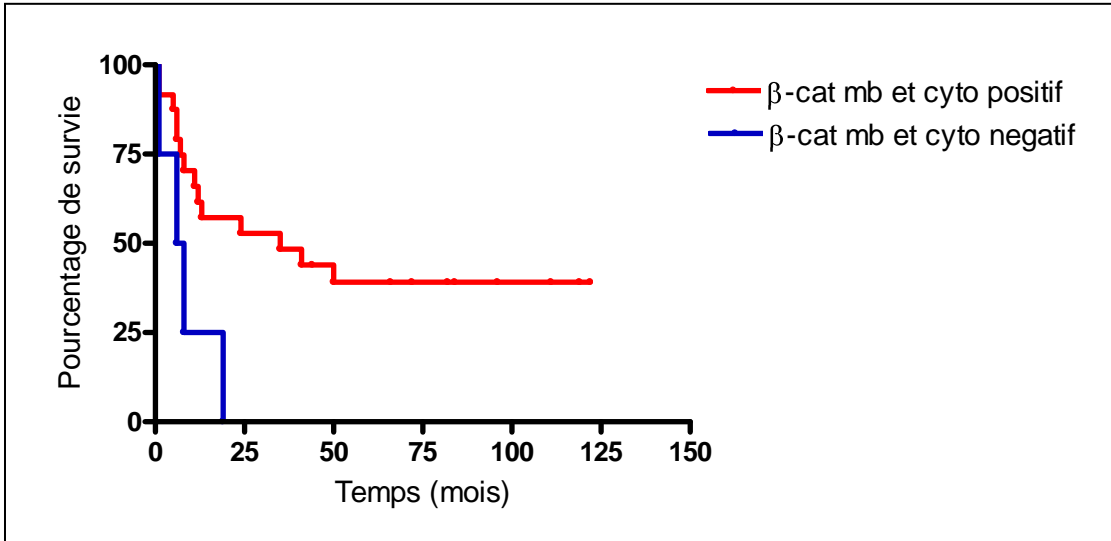


Figure 13 : Comparaison de la survie des patients en fonction de l'expression cytoplasmique de la β -caténine dans les cancers de type diffus. La médiane de survie est de 7 mois dans les cancers de type diffus avec perte d'expression membranaire et cytoplasmique de β -caténine et de 35 mois dans les cancers de type diffus exprimant la β -caténine (test de Log Rank $p=0,025$).

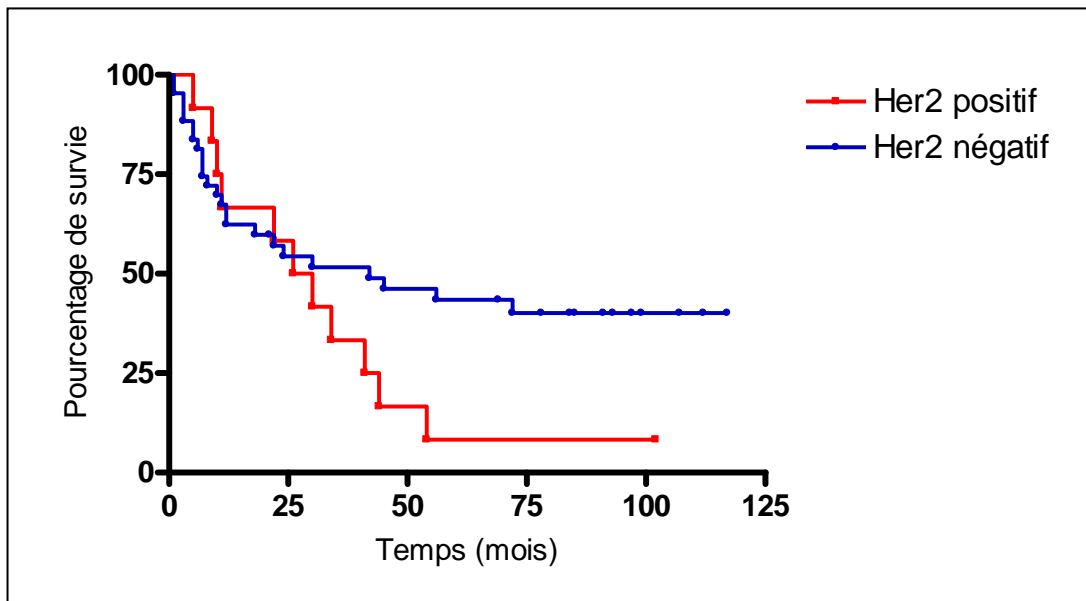


Figure 14 : Comparaison de la survie des patients atteints de cancer de type intestinal en fonction de l'expression de Her2. La médiane de survie est de 20 mois dans les cancers exprimant Her2 et de 42 mois dans les cancers sans expression ou amplification de Her2 (test de Log Rank $p=0,009$).

DISCUSSION

Ce travail de criblage à haut débit de l'expression de la E-cadhérine, de la β -caténine, d'Her2 et de Notch1 dans une cohorte de 111 patients a permis de déterminer un profil d'expression particulier des cancers de l'estomac d'intérêt pronostique et thérapeutique.

Deux profils moléculaires distincts ont été mis en évidence. Ils dépendent du type histologique :

- 1) Les cancers gastriques de type diffus ont un profil caractérisé par la perte d'expression membranaire de la E-cadhérine, par la perte d'expression membranaire et cytoplasmique de la β -caténine, l'augmentation de l'expression nucléaire de Notch1 et l'absence d'expression de Her2.
- 2) Les cancers gastriques de type intestinal ont un profil caractérisé par l'expression membranaire de la E-cadhérine et de la β -caténine, la faible expression nucléaire de Notch1 et l'expression membranaire de Her2.

Ce travail montre pour la première fois que l'activation de Notch1, traduite par l'augmentation de son expression nucléaire, est associée spécifiquement à un type particulier de cancer de l'estomac qui est le type diffus de la classification de Laurén. Dans cette étude nous n'avons pas pu démontrer que l'activation de Notch1 était plus particulièrement associée aux cancers à cellules en bague à chaton ou aux adénocarcinomes indifférenciés à cellules isolées selon la classification de l'OMS (résultat non illustré). Une étude antérieure a montré que l'expression de Notch1 était corrélée à la taille tumorale, au grade de différenciation, à la profondeur d'invasion et à la présence d'embolies vasculaires mais ne s'est pas intéressée au type histologique (74). La voie Notch intervient dans la différenciation et le destin cellulaire des cellules embryonnaires et des tissus adultes. Dans l'estomac, son rôle est peu documenté. Il interviendrait dans la différenciation des cellules foveolaires exprimant le MUC5AC et des cellules des glandes antrales exprimant le MUC6 (65). Ces observations s'accordent avec l'histogenèse supposée indépendante de la métaplasie intestinale des cancers de type diffus. Par ailleurs notre étude montre l'association fréquente dans les cancers de l'estomac de type diffus de l'expression nucléaire

de Notch1 avec la perte d'expression de la E-cadhérine et de la β -caténine. Cette constatation statistique rappelle que dans des modèles animaux, les mutations de la E-cadhérine, présentes dans les cancers héréditaires de type diffus, s'accompagnaient d'anomalies de la voie de signalisation wnt et de l'activation de la voie Notch (75). Dans notre étude, seuls des cancers sporadiques étaient inclus, mais les anomalies de la fonction de E-cadhérine (39; 40; 50; 76) et de la voie Wnt sont aussi décrits dans ces cancers (77).

Il est à noter que les cancers de type intestinal, selon la classification de Laurèn, inclus dans notre étude présentaient généralement une faible expression de Notch alors que ces cancers sont supposés être issus de la métaplasie intestinale de la muqueuse. Notch est pourtant fortement impliqué dans la différenciation des cellules intestinales (78). Cependant l'analyse détaillée de nos résultats montrent que certaines des tumeurs de ce groupe avaient une forte expression de Notch. Il est possible que ces tumeurs suivent une différenciation intestinale. Cette observation montre les limites de la classification de Laurèn qui mêle des tumeurs très hétérogènes d'un point de vue morphologique, histogénétique, phénotypique et génétiques dans un seul et même groupe de cancers dit de « type intestinal » (28).

Le profil des cancers que nous avons identifié a un intérêt pronostique. D'après nos résultats, l'expression de Her2 et son amplification sont associées à un mauvais pronostic dans les cancers gastriques de type intestinal et la perte d'expression de la β -caténine est associée à un mauvais pronostic dans les cancers de type diffus. La valeur péjorative de l'expression de Her2 a déjà été décrite dans d'autres études (58; 79). Le rôle pronostique de l'expression de la β -caténine est abordé de façon très variable dans la littérature. Quelques publications parlent de la valeur pronostique de l'activation nucléaire de la β -caténine (80). Peu de travaux rapportent la valeur pronostique de la perte d'expression membranaire et cytoplasmique de la β -caténine (81; 82). La perte d'expression de la β -caténine dans la région membranaire est généralement liée à une perte de fonction de la E-cadhérine. Nous avons constaté que la perte d'expression de la β -caténine était statistiquement associée à la perte de la E-cadhérine. La concordance n'était toutefois pas absolue expliquant que seule la perte de la β -caténine était de pronostic défavorable. Il est bien connu que dans les cancers de l'estomac de type diffus, la perte de fonction de la E-cadhérine ne s'accompagne pas forcément de sa perte d'expression membranaire (76). L'anticorps que nous avons utilisé en

immunohistochimie était dirigé contre le domaine extra-cellulaire de la E-cadhérine. Par conséquent, il ne détecte pas le domaine de liaison à la β -caténine, situé dans le domaine intracellulaire. La positivité de l'immunomarquage pour la E-cadhérine ne reflète donc pas forcément la disparition de cette partie de la E-cadhérine et de la fonction de liaison à la β -caténine.

Le profil d'expression que nous décrivons a enfin un intérêt thérapeutique. Il montre de plus la nécessité de prendre en compte la différenciation histologique des tumeurs dans l'indication de la recherche des biomarqueurs prédictifs de réponse aux thérapeutiques dites ciblées. L'observation de l'activation de Notch1 dans les cancers de type diffus constitue un argument pour le traitement de ce type de cancer par les inhibiteurs des γ -sécrétases. Les γ -sécrétases sont les enzymes à l'origine du clivage du récepteur Notch, précédant son activation. Les inhibiteurs des γ -sécrétases ont été développés pour traiter la maladie d'Alzheimer. Dans ce cadre, ils sont destinés à inhiber le clivage de la protéine APP (amyloid protein precursor) à l'origine des dépôts amyloïdes dans les plaques séniles (83; 84). Depuis leur développement initial, des essais thérapeutiques ont été menés dans le traitement des cancers du sein (68). Dans les cancers gastriques, des études sont en cours mais n'ont pas atteint le stade clinique (69).

Notre étude montre l'expression de Her2, associée à son amplification, dans une proportion non négligeable de cancers gastriques de type intestinal. Nous avons observé que cette expression semblait concerner un sous type bien particulier de cancers gastriques, d'architecture papillaire ou tubulaire bien différencié selon la classification de l'OMS, localisé près de la région cardiaque. Cette observation ressort également d'une grande série récemment rapportée à l'ASCO (85). Dans cette étude, 3807 patients avec un adénocarcinome de la jonction oeso-gastrique ou gastrique non opérable d'emblée ont été étudiés. Vingt deux pour cent des cancers étaient Her2 positif, essentiellement des cancers de type intestinal de la jonction oeso-gastrique. Dans cette série, le traitement par l'Herceptin™ faisait l'objet d'un essai de phase III (essai ToGA). L'Herceptin™ réduisait le risque de décès de 26%, améliorait la survie de 16 mois et le taux de réponse était de 13%.

Pour réaliser ce travail, nous avons utilisé la technique des Tissue-Microarray (TMA). Cette technique nous a permis d'exploiter une cohorte de 111 patients opérés d'un cancer de

l'estomac. Cette technique de TMA permet un criblage rapide et à haut débit de l'expression de protéines d'intérêt et constitue un outil de choix pour la recherche translationnelle. L'étude de 7 lames de TMA pour chacune des techniques immunohistochimiques et d'hybridation in situ nous a permis de collectionner les résultats pour les 111 patients. Six cents lames auraient été nécessaires en utilisant les techniques conventionnelles. La technique des TMA se développe actuellement pour l'exploitation des cohortes importantes de patients inclus dans les protocoles thérapeutiques avec étude « ancillaire » de biomarqueurs d'intérêt, prédictifs de réponse au traitement. L'analyse des résultats nécessite des outils statistiques puissants : pour ce travail nous avons utilisé des tests de χ^2 , ou de Fisher lorsque l'échantillon était de petite taille, des tests de Student, de Mann-Whitney et des tests de Kaplan-Meier avec Log rank. Néanmoins nos résultats mériteraient d'être couplés à des techniques plus sophistiquées de traitement de données type Tanagra (86). Outre la validation de biomarqueurs d'intérêt pronostique et thérapeutique, la technique des TMA permet d'étudier dans des types spécifiques de tumeurs des associations d'expression de cascades de signalisation d'intérêt biologique. Nous avons en effet détecté dans cette étude une association entre la perte d'expression de la E-cadhérine et l'activation de la voie Notch dans les cancers de type diffus. Cette association pourrait s'intégrer dans le processus biologique des tumeurs connu sous la dénomination de transition épithélio-mésenchymateuse (TEM). Betty Hay a décrit ce concept pour la première fois en 1967, comme étant crucial dans la gastrulation (87). Ce phénomène permettrait le remodelage tissulaire et la migration cellulaire, nécessaires au devenir du « futur » organisme. Plus tard, la TEM a été décrite dans la progression tumorale. La TEM se caractérise par la perte du phénotype épithéliale des cellules et l'acquisition par ces mêmes cellules d'un phénotype mésenchymateux. Cette transformation phénotypique s'accompagne de l'acquisition de propriétés de migration et d'invasion (88). La perte d'expression de la E-cadhérine et l'activation de Notch sont décrites parmi les phénomènes majeurs accompagnant la transition épithélio-mésenchymateuse. Les voies de signalisation de la E-cadhérine et de Notch seraient liées dans le processus de TEM. En effet, il a été montré récemment que les facteurs de transcription Slug activés par la voie Notch (89) se fixent sur le promoteur de la E-Cadhérine et répriment son expression au cours de la progression tumorale (90). Cette perte d'expression de la E-cadhérine associée à l'activation de la voie Notch est étayée par nos observations réalisées dans les cancers gastriques de type diffus.

Cette étude confirme l'hétérogénéité des cancers gastriques. Les types de cancers gastriques devraient être définis par des critères plus rigoureux, conditions permettant d'isoler leurs caractéristiques phénotypiques, et génotypiques et d'améliorer la prise en charge des patients par l'utilisation des thérapeutiques ciblées.

BIBLIOGRAPHIE

1. Lauren P. The Two histological main types of gastric carcinoma: diffuse and so-called intestinal-type carcinoma. An attempt at a histo-clinical classification. *Acta Pathol Microbiol Scand.* 1965 ;6431-49.
2. Yuasa Y. Control of gut differentiation and intestinal-type gastric carcinogenesis. *Nat. Rev. Cancer.* 2003;3(8):592-600.
3. Fayçal J, Bessaguet C, Nousbaum J, Cauvin J, Cholet F, Bideau K, et al. Epidemiology and long term survival of gastric carcinoma in the French district of Finistere between 1984 and 1995. *Gastroenterol Clin Biol.* 2005;29(1):23-32.
4. Bouché O, Lagarde S. Stomach cancer. *Rev Prat.* 2005;55(2):123-30.
5. Registre des tumeurs de Loire-Atlantique et de Vendée(EPIC-PL). *Epidémiologie du cancer en Loire-Atlantique. Période 2002-2004.* .
6. Msika S, Benhamiche AM, Rat P, Faivre J. Long-term prognosis of gastric cancer in the population of Côte-d'Or. *Gastroenterol Clin Biol.* 24(6-7):649-55.
7. Msika S, Benhamiche AM, Jouve JL, Rat P, Faivre J. Prognostic factors after curative resection for gastric cancer. A population-based study. *Eur J Cancer.* 2000;36(3):390-6.
8. Correa P. Human gastric carcinogenesis: a multistep and multifactorial process--First American Cancer Society Award Lecture on Cancer Epidemiology and Prevention. *Cancer Res.* 1992;52(24):6735-6740.
9. Fenoglio-Preiser CM, Noffsinger AE, Stemmermann GN, Lantz PE, Isaacson PG. *Gastrointestinal Pathology: An Atlas and Text.* 3 éd. Lippincott Williams and Wilkins; 2007;pp233-269.
10. Caldas C, Carneiro F, Lynch HT, Yokota J, Wiesner GL, Powell SM, et al. Familial gastric cancer: overview and guidelines for management. *J. Med. Genet.* 1999;36(12):873-880.
11. GDB (TM) Human Genome Database. John Hopkins University. Baltimore (Maryland).
12. Dussaulx-Garin L, Blayau M, Pagenault M, Le Berre-Heresbach N, Raoul JL, Campion JP, et al. A new mutation of E-cadherin gene in familial gastric linitis plastica cancer with extra-digestive dissemination. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2001;13(6):711-5.
13. Lewis FR, Mellinger JD, Hayashi A, Lorelli D, Monaghan KG, Carneiro F, et al. Prophylactic total gastrectomy for familial gastric cancer. *Surgery.* 2001;130(4):612-617; discussion 617-619.

14. Pharoah PD, Guilford P, Caldas C. Incidence of gastric cancer and breast cancer in CDH1 (E-cadherin) mutation carriers from hereditary diffuse gastric cancer families. *Gastroenterology*. 2001 ;121(6):1348-53.
15. Cisco RM, Ford JM, Norton JA. Hereditary diffuse gastric cancer: implications of genetic testing for screening and prophylactic surgery. *Cancer*. 2008;113(7 Suppl):1850-1856.
16. Park YJ, Shin KH, Park JG. Risk of gastric cancer in hereditary nonpolyposis colorectal cancer in Korea. *Clin. Cancer Res*. 2000;6(8):2994-2998.
17. Giardiello FM, Brensinger JD, Tersmette AC, Goodman SN, Petersen GM, Booker SV, et al. Very high risk of cancer in familial Peutz-Jeghers syndrome. *Gastroenterology*. 2000;119(6):1447-1453.
18. Fox JG, Sheppard BJ, Dangler CA, Whary MT, Ihrig M, Wang TC. Germ-line p53-targeted disruption inhibits helicobacter-induced premalignant lesions and invasive gastric carcinoma through down-regulation of Th1 proinflammatory responses. *Cancer Res*. 2002;62(3):696-702.
19. Rugge M, Correa P, Dixon MF, Hattori T, Leandro G, Lewin K, et al. Gastric dysplasia: the Padova international classification. *Am J Surg Pathol*. 2000 Fév ;24(2):167-76.
20. Silva S, Filipe MI. Intestinal metaplasia and its variants in the gastric mucosa of Portuguese subjects: a comparative analysis of biopsy and gastrectomy material. *Hum. Pathol*. 1986;17(10):988-995.
21. Stemmermann GN. Intestinal metaplasia of the stomach. A status report. *Cancer*. 1994;74(2):556-564.
22. Borrmann R. Geshwulste des Magens und Duodenums. In *handbuch der Speziellen pathologischen Anatomie und Histologie*, Henke F, Lubarsch O. 1926.
23. WHO International Reference Histologic Classification of Gastric Cancer . Lyon France : IARC Press. 2000;pp38-52.
24. Nakamura T, Nakano G. Histopathological classification and malignant change in gastric polyps. *J. Clin. Pathol*. 1985;38(7):754-764.
25. Goseki N, Takizawa T, Koike M. Differences in the mode of the extension of gastric cancer classified by histological type: new histological classification of gastric carcinoma. *Gut*. 1992;33(5):606-612.
26. Endoh Y, Sakata K, Tamura G, Ohmura K, Ajioka Y, Watanabe H, et al. Cellular phenotypes of differentiated-type adenocarcinomas and precancerous lesions of the stomach are dependent on the genetic pathways. *J Pathol*. 2000;191(3):257-63.

27. Tajima Y, Yamazaki K, Nishino N, Morohara K, Yamazaki T, Kaetsu T, et al. Gastric and intestinal phenotypic marker expression in gastric carcinomas and recurrence pattern after surgery-immunohistochemical analysis of 213 lesions. *Br J Cancer*. 2004;91(7):1342-8.
28. Sugai T, Habano W, Uesugi N, Jao Y, Nakamura S, Abe K, et al. Three independent genetic profiles based on mucin expression in early differentiated-type gastric cancers--a new concept of genetic carcinogenesis of early differentiated-type adenocarcinomas. *Mod. Pathol*. 2004;17(10):1223-1234.
29. Panani AD. Cytogenetic and molecular aspects of gastric cancer: clinical implications. *Cancer Lett*. 2008;266(2):99-115.
30. Panani AD, Ferti A, Malliaros S, Raptis S. Gastric cancer with an i(8q) and long survival. *Cancer Genet. Cytogenet*. 1992;58(2):214-215.
31. Castedo S, Correia C, David L, Sobrinho-Simões M. Isochromosome 8q. A recurrent change in gastric carcinoma. *Cancer Genet. Cytogenet*. 1991;54(1):137-138.
32. Onchi H, Hirose K, Yamaguchi A, Noriki S, Fukuda M. Prognostic value of numerical aberrations of chromosome 17 in differentiated gastric cancer: evaluation by multivariate regression analysis. *Oncol. Rep*. 2000;7(6):1317-1322.
33. Kitayama Y, Igarashi H, Watanabe F, Maruyama Y, Kanamori M, Sugimura H. Nonrandom chromosomal numerical abnormality predicting prognosis of gastric cancer: a retrospective study of 51 cases using pathology archives. *Lab. Invest*. 2003;83(9):1311-1320.
34. Koo SH, Kwon KC, Shin SY, Jeon YM, Park JW, Kim SH, et al. Genetic alterations of gastric cancer: comparative genomic hybridization and fluorescence In situ hybridization studies. *Cancer Genet Cytogenet*. 2000;117(2):97-103.
35. Wu MS, Chang MC, Huang SP, Tseng CC, Sheu JC, Lin YW, et al. Correlation of histologic subtypes and replication error phenotype with comparative genomic hybridization in gastric cancer. *Genes Chromosomes Cancer*. 2001;30(1):80-6.
36. Peng D, Sugihara H, Mukaisho K, Tsubosa Y, Hattori T. Alterations of chromosomal copy number during progression of diffuse-type gastric carcinomas: metaphase- and array-based comparative genomic hybridization analyses of multiple samples from individual tumours. *J. Pathol*. 2003;201(3):439-450.
37. Tamura G. Alterations of tumor suppressor and tumor-related genes in the development and progression of gastric cancer. *World J Gastroenterol*. 2006;12(2):192-8.
38. Gayther SA, Goringe KL, Ramus SJ, Huntsman D, Roviello F, Grehan N, et al. Identification of germ-line E-cadherin mutations in gastric cancer families of European origin. *Cancer Res*. 1998;58(18):4086-9.

39. Becker KF, Atkinson MJ, Reich U, Becker I, Nekarda H, Siewert JR, et al. E-cadherin gene mutations provide clues to diffuse type gastric carcinomas. *Cancer Res.* 1994;54(14):3845-52.
40. Machado JC, Oliveira C, Carvalho R, Soares P, Berx G, Caldas C, et al. E-cadherin gene (CDH1) promoter methylation as the second hit in sporadic diffuse gastric carcinoma. *Oncogene.* 2001;20(12):1525-8.
41. Wind Ph., Douard R., Cugnenc P.H. *Cancers gastriques.* Dans: *Cancers : évaluation, traitement et surveillance.* Paris: 1997.
42. Bonnel C. Thèse : Complications, morbidités et résultats de la prise en charge chirurgicale du cancer de l'estomac. A propos d'une expérience de 10 ans. 2000.
43. Cunningham D, Allum WH, Stenning SP, Thompson JN, Van de Velde CJH, Nicolson M, et al. Perioperative chemotherapy versus surgery alone for resectable gastroesophageal cancer. *N. Engl. J. Med.* 2006;355(1):11-20.
44. Pezet D, Michel P, Rebischung C, Ychou M. Cancer of the stomach. *Gastroenterol Clin Biol.* 2006;30 Spec No 22S16-2S23.
45. Moehler M, Eimermacher A, Siebler J, Höhler T, Wein A, Menges M, et al. Randomised phase II evaluation of irinotecan plus high-dose 5-fluorouracil and leucovorin (ILF) vs 5-fluorouracil, leucovorin, and etoposide (ELF) in untreated metastatic gastric cancer. *Br. J. Cancer.* 2005;92(12):2122-2128.
46. Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Bärklund M, Schraml P, Leighton S, et al. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med.* 1998;4(7):844-7.
47. Battifora H. The multitumor (sausage) tissue block: novel method for immunohistochemical antibody testing. *Lab Invest.* 1986;55(2):244-8.
48. Simon R, Mirlacher M, Sauter G. Tissue microarrays. *Methods Mol Med.* 2005 ;114:257-68.
49. Jacquemier J, Ginestier C, Charafe-Jauffret E, Bertucci F, Bege T, Geneix J, et al. [Small but high throughput: how "tissue-microarrays" became a favorite tool for pathologists and scientists]. *Ann Pathol.* 2003;23(6):623-32.
50. Chan AOO. E-cadherin in gastric cancer. *World J. Gastroenterol.* 2006;12(2):199-203.
51. Takeichi M. Cadherins: a molecular family important in selective cell-cell adhesion. *Annu. Rev. Biochem.* 1990;59:237-252.

52. Guilford P. E-cadherin downregulation in cancer: fuel on the fire? *Mol Med Today*. 1999;5(4):172-7.
53. Gumbiner BM. Signal transduction of beta-catenin. *Curr. Opin. Cell Biol.* 1995;7(5):634-640.
54. Seva C. La beta-caténine : un acteur clé dans le développement des cancers colorectaux. *Hépatogastro*. 2001;8(2):149-54.
55. Tsukashita S, Kushima R, Bamba M, Nakamura E, Mukaisho K, Sugihara H, et al. Beta-catenin expression in intramucosal neoplastic lesions of the stomach. Comparative analysis of adenoma/dysplasia, adenocarcinoma and signet-ring cell carcinoma. *Oncology*. 2003 ;64(3):251-258.
56. Clements WM, Wang J, Sarnaik A, Kim OJ, MacDonald J, Fenoglio-Preiser C, et al. beta-Catenin mutation is a frequent cause of Wnt pathway activation in gastric cancer. *Cancer Res*. 2002;62(12):3503-3506.
57. Offerhaus GJ, Giardiello FM, Krush AJ, Booker SV, Tersmette AC, Kelley NC, et al. The risk of upper gastrointestinal cancer in familial adenomatous polyposis. *Gastroenterology*. 1992;102(6):1980-1982.
58. Gravalos C, Jimeno A. HER2 in gastric cancer: a new prognostic factor and a novel therapeutic target. *Ann. Oncol.* 2008;19(9):1523-1529.
59. Kaptain S, Tan LK, Chen B. Her-2/neu and breast cancer. *Diagn. Mol. Pathol.* 2001;10(3):139-152.
60. Najy AJ, Day KC, Day ML. The ectodomain shedding of E-cadherin by ADAM15 supports ErbB receptor activation. *J. Biol. Chem.* 2008;283(26):18393-18401.
61. Wang K, Ma Q, Ren Y, He J, Zhang Y, Zhang Y, et al. Geldanamycin destabilizes HER2 tyrosine kinase and suppresses Wnt/beta-catenin signaling in HER2 overexpressing human breast cancer cells. *Oncol. Rep.* 2007;17(1):89-96.
62. Jarriault S, Brou C, Logeat F, Schroeter EH, Kopan R, Israel A. Signalling downstream of activated mammalian Notch. *Nature*. 1995;377(6547):355-358.
63. De Strooper B, Annaert W, Cupers P, Saftig P, Craessaerts K, Mumm JS, et al. A presenilin-1-dependent gamma-secretase-like protease mediates release of Notch intracellular domain. *Nature*. 1999;398(6727):518-522.
64. Artavanis-Tsakonas S, Matsuno K, Fortini ME. Notch signaling. *Science*. 1995;268(5208):225-32.
65. Sekine A, Akiyama Y, Yanagihara K, Yuasa Y. Hath1 up-regulates gastric mucin gene expression in gastric cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2006;344(4):1166-1171.

66. Katoh M, Katoh M. Notch signaling in gastrointestinal tract (review). *Int. J. Oncol.* 2007;30(1):247-251.
67. Katoh M, Katoh M. Notch ligand, JAG1, is evolutionarily conserved target of canonical WNT signaling pathway in progenitor cells. *Int. J. Mol. Med.* 2006;17(4):681-685.
68. <http://www.dana-farber.org>
69. Meng RD, Shelton YL, Schwartz GK. Effect of targeting the Notch developmental pathway in metastatic gastric cancers on growth suppression, apoptosis, and chemosensitivity. 2009 Abstract . ASCO 25.
70. Smith I, Procter M, Gelber RD, Guillaume S, Feyereislova A, Dowsett M, et al. 2-year follow-up of trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer: a randomised controlled trial. *Lancet.* 2007;369(9555):29-36.
71. Blanchot-Jossic F, Jarry A, Masson D, Bach-Ngohou K, Paineau J, Denis MG, et al. Up-regulated expression of ADAM17 in human colon carcinoma: co-expression with EGFR in neoplastic and endothelial cells. *J. Pathol.* 2005;207(2):156-163.
72. Sinicrope FA, Rego RL, Halling KC, Foster NR, Sargent DJ, La Plant B, et al. Thymidylate synthase expression in colon carcinomas with microsatellite instability. *Clin. Cancer Res.* 2006;12(9):2738-2744.
73. <http://www.graphpad.com/>
74. Li D, Wu Q, Peng Z, Yang Z, Wang Y. [Expression and significance of Notch1 and PTEN in gastric cancer]. *Ai Zheng.* 2007;26(11):1183-1187.
75. Pereira PS, Teixeira A, Pinho S, Ferreira P, Fernandes J, Oliveira C, et al. E-cadherin missense mutations, associated with hereditary diffuse gastric cancer (HDGC) syndrome, display distinct invasive behaviors and genetic interactions with the Wnt and Notch pathways in *Drosophila epithelia*. *Hum. Mol. Genet.* 2006;15(10):1704-1712.
76. Ascaño JJ, Frierson H, Moskaluk CA, Harper JC, Roviello F, Jackson CE, et al. Inactivation of the E-cadherin gene in sporadic diffuse-type gastric cancer. *Mod. Pathol.* 2001;14(10):942-949.
77. Zhang H, Xue Y. Wnt pathway is involved in advanced gastric carcinoma. *Hepatogastroenterology.* 2008;55(84):1126-1130.
78. van Es JH, van Gijn ME, Riccio O, van den Born M, Vooijs M, Begthel H, et al. Notch/gamma-secretase inhibition turns proliferative cells in intestinal crypts and adenomas into goblet cells. *Nature.* 2005;435(7044):959-963.

79. García I, Vizoso F, Martín A, Sanz L, Abdel-Lah O, Raigoso P, et al. Clinical significance of the epidermal growth factor receptor and HER2 receptor in resectable gastric cancer. *Ann. Surg. Oncol.* 2003;10(3):234-241.
80. Jung IM, Chung JK, Kim YA, Kim JE, Heo SC, Ahn YJ, et al. Epstein-Barr virus, beta-catenin, and E-cadherin in gastric carcinomas. *J. Korean Med. Sci.* 2007;22(5):855-861.
81. Woo DK, Kim HS, Lee HS, Kang YH, Yang HK, Kim WH. Altered expression and mutation of beta-catenin gene in gastric carcinomas and cell lines. *Int. J. Cancer.* 2001;95(2):108-113.
82. Ramesh S, Nash J, McCulloch PG. Reduction in membranous expression of beta-catenin and increased cytoplasmic E-cadherin expression predict poor survival in gastric cancer. *Br. J. Cancer.* 1999;81(8):1392-1397.
83. Henley DB, May PC, Dean RA, Siemers ER. Development of semagacestat (LY450139), a functional gamma-secretase inhibitor, for the treatment of Alzheimer's disease. *Expert Opin Pharmacother.* 2009;10(10):1657-1664.
84. Siemers E, Skinner M, Dean RA, Gonzales C, Satterwhite J, Farlow M, et al. Safety, tolerability, and changes in amyloid beta concentrations after administration of a gamma-secretase inhibitor in volunteers. *Clin Neuropharmacol.* 2005;28(3):126-132.
85. <http://www.edimark.fr/ejournaux/asco2009/digestif/1juin/breves.php>.
86. Kandel C, Leclair F, Laboisse C, Mosnier JF. Reg 1 alpha expression is associated with the intestinal immunophenotypic differentiation of gastric carcinomas and their precancerous lesions. *Journal of Surgical Pathology* (under review).
87. Trelstad RL, Hay ED, Revel JD. Cell contact during early morphogenesis in the chick embryo. *Dev Biol.* 1967;16(1):78-106.
88. Baum B, Settleman J, Quinlan MP. Transitions between epithelial and mesenchymal states in development and disease. *Semin Cell Dev Biol.* 2008;19(3):294-308.
89. Leong KG, Niessen K, Kulic I, Raouf A, Eaves C, Pollet I, et al. Jagged1-mediated Notch activation induces epithelial-to-mesenchymal transition through Slug-induced repression of E-cadherin. *J. Exp. Med.* 2007;204(12):2935-2948.
90. Bolós V, Peinado H, Pérez-Moreno MA, Fraga MF, Esteller M, Cano A. The transcription factor Slug represses E-cadherin expression and induces epithelial to mesenchymal transitions: a comparison with Snail and E47 repressors. *J Cell Sci.* 2003;116(Pt 3):499-511.

Titre de la Thèse : La signalisation Notch dans les adénocarcinomes gastriques de type diffus.

RESUME

Le but de ce travail était d'apprécier l'impact de certains acteurs de voies de signalisation dans la différenciation morphologique et l'évolution des cancers gastriques. Cette étude repose sur une cohorte de 111 patients atteints de cancers de l'estomac annotés clinico-pathologiquement. L'expression de la E-cadhérine, de la β -caténine, de Notch1 et de Her2 a été étudiée par immunohistochimie et hybridation in situ chromogénique appliquées à des Tissue MicroArray. Deux profils d'expression distincts ont été identifiés : un profil associé aux cancers de type diffus et un profil associé aux cancers de type intestinal. La perte d'expression de la β -caténine dans les cancers de type diffus et l'expression de Her2 dans les cancers de type intestinal était associée à une survie globale plus courte des patients. Ainsi, la recherche de l'expression des biomarqueurs prédictifs de réponse aux thérapeutiques dites ciblées devrait être orientée par la différenciation et l'histogénèse des cancers gastriques.

MOTS-CLES

Cancer de l'estomac - Tissue MicroArray - Immunohistochimie - Biomarqueurs - Thérapeutiques ciblées