

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE



MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR

ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Université Djillali Liabes Sidi Bel Abbès

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biologie

Thèse

Pour l'obtention du diplôme de Doctorat 3eme cycle LMD

Spécialité: Sciences Biologiques

Option : Biologie de la cellule normale et pathologique

THEME

**Etude de la signification clinico-histopathologique de
l'expression des protéines Cbl & EGFR dans le cancer
gastrique**

Présentée par : **Rachida SALAH**

Le20:/04/2016

Devant le jury composé de :

Présidente : MOULESSEHOUL. Soraya

Examineur : TOU. Abdenaceur

Examineur : SAHRAOUI. Toufik

Directeur de thèse : HARIR. Nouria

Professeur UDL Sidi Bel Abbès

Professeur UDL Sidi Bel Abbès

Professeur Université Oran I

Professeur UDL Sidi Bel Abbès

Année universitaire : 2016-2017

Sommaire

Dedicace	
Remerciment	
Résumé	
Abstract	
Liste d'abreviation	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction Generale	
Chapter I: Proteines Cbl et recepteur du facteur de croissance EGFR	
I.Protéines CBL (Casitas B-cell Lymphomas).....	1
I.1 Historique	1
I.2_Distribution tissulaire et cellulaires des protéines CBL	2
I.3 Structures nucléiques des protéines CBL	3
I.4 Structures en domaines des protéines CBL	4
I.5 Les ubiquitine ligases Cbl	5
I.6 Fonction biologique.....	8
I.7 Cbl dans les réseaux de signalisation oncogéniques	10
I.8 Cbl : une cible thérapeutique potentielle dans les cancers	13
I.9.1 Recepteurs HER.....	15
I.9.2 Fonction des récepteurs HER.....	17
I.9.3 HER1 ou EGFR.....	21
Chapter II: Cancer Gastrique	
II.1 Généralités sur le cancer gastrique	25
II.2 Fréquence du cancer gastrique.....	25
II.3 Facteurs de risque.....	26
II.3.1 Age et niveau socio-économique	26

II.3.2 Lésions précancéreuses	26
a- La gastrite chronique atrophiante	26
b- L'ulcère gastrique chronique.....	26
d- La métaplasie intestinale.....	27
e-L'estomac opéré.....	27
f-Les autres lésions précancéreuses.....	27
II.3.3 L'helicobacter pylori (HP)	27
II.3.4-Facteurs environnementaux et alimentaires	28
II.3.5-Facteurs génétiques.....	29
a. Adénocarcinomes gastriques diffus héréditaires.....	29
b. Adénocarcinomes gastriques survenant dans le cadre de syndromes familiaux.....	29
II.4-Anatomopathologie du cancer gastrique.....	29
II.4.1-Aspects macroscopiques.....	30
a.Cancers superficiels.....	30
b-Cancers invasifs.....	30
II.4.2-Aspects microscopiques.....	30
a-Tumeurs épithéliales.....	30
b-Autres types anatomopathologiques.....	31
II.4.3-Stades du cancer de l'estomac.....	34
II.4.3-Métastases gastriques.....	36
II.5. Etude clinique.....	37
II.5.1 Circonstances de découverte.....	37
II.5.2 Signe fonctionnels.....	37
II.5.3 Signe généraux.....	37
II.5.4 Signe physique.....	37
II.6 Examens paracliniques.....	38

II.6.1 Bilan du diagnostic.....	38
II.6.2 Bilan extension.....	38
II.7 Pronostic du cancer de l'estomac.....	39
II.8. Aspect thérapeutiques.....	39
II.8.1 Traitement préventif.....	39
II.8.2 Traitement curatif.....	39
II.9 La protéine Cbl et le cancer gastrique	42

Chapitre III: Matériaux & Méthodes

III.1 Objectif.....	45
III.2-Etudes expérimentale.....	45
III.2.1-Cadre d'étude.....	45
III.2.2-Type d'étude.....	46
III.2.3-Population d'étude.....	46
III.2.4-Critères d'inclusion.....	46
III.2.5-Matériel d'étude.....	46
III.2.6-Liste des produits.....	46
III.3.1-Etude Immunohistochimique.....	47
III.3.2-Protocole de l'immunohistochimie.....	48
III.4-Évaluation morpho métrique.....	48
III.5 Analyse statistique.....	49

Chapitre IV: Resultat & Discussion

IV.1-Répartition des patients selon le sexe et l'âge.....	50
IV.2- Aspects anatomo-pathologiques.....	51
IV.2.1-Localisation de la tumeur	52
IV.2.2- La macroscopie de la tumeur.....	52

IV.2.3-La microscopie de la tumeur	53
IV.3- Résultats de l'Etude Immunohistochimique.....	54
IV.3.1-Protéine c-Cbl.....	55
a-Relation entre la positivité de l'expression des protéines c-Cbl et les différents paramètres clinico-pathologiques.....	56
b-La distribution de la protéine c-Cbl	56
IV.3.2-Protéine Cbl-b.....	58
a-Relation entre la positivité de l'expression des protéines Cbl-b et les différents paramètres clinicopathologiques.....	60
b-La distribution de la protéine Cbl-b.....	61
IV.3.3-Le récepteur membranaire EGFR.....	62
a-Relation entre la positivité de l'expression des protéines EGFR et les différents paramètres clinicopathologiques.....	62
b-Etudes de la corrélation d'expression entre les proteines EGFR, c-CBL et CBL-b.....	64
IV.4-Discussion.....	65
IV.4.1-Epidémiologie.....	65
IV.4.2-Sexe.....	65
IV.4.3-Age.....	65
IV.4.4-Aspects anatomo-pathologiques.....	66
a-Localisation de la tumeur.....	66
b-Aspects macroscopiques.....	66
c-Aspects microscopiques.....	66
IV.4-Immunohistochimie.....	68

IV.4.1-La protéine c-Cbl et EGFR	68
IV.4.2-Protéine Cbl-b et EGFR.....	70
Conclusion Generale	72
References Bibliographie	
Annex	

Dédicacions

Nous rendons grâce à ALLAH le tout puissant, le très miséricordieux de nous avoir donné la force nécessaire et la chance de mener ce travail à terme. Son prophète MOHAMED paix et salut sur lui.

A mes Parents SALAH Mohamed & Ghassoul Fatima :

Merci papa pour tes nombreux encouragements. Ta force de caractère et ton courage ont été une véritable inspiration pour moi Que ton âme repose en paix.

Merci maman pour tes précieux conseils, ton soutien constant, l'amour inconditionnel que tu m'as donné depuis que je respire.

Ce travail je vous le dédie chers parents, symbole de toute l'affection et le profond respect que je vous porte. Vous aurez toujours une place particulière dans mon cœur et dans ma vie.

A ma sœur et mes frères :

Vous avez été pour moi mes confidentes. Vos sacrifices pour la réalisation de ce travail me sont inestimables. Vous êtes des frères formidables. Que le Seigneur resserre nos liens.

A mon MARI MOHAMED :

Ton amour, ton soutien moral, durant toutes ces années d'études. Les mots me manquent pour te remercier.

Remercîment

Aux enseignants du primaire, du secondaire et à tous mes maîtres de la Faculté des sciences de la nature et de la vie spécialement département de la biologie

Ce travail soit l'expression de ma profonde gratitude! Soyez-en fiers. Merci.

Au Pr HARIR Nouria Très cher Maître vous avez été pour nous un guide, un conseiller .La lumière de notre trajet :

*Merci de m'avoir donné ce sujet. Vous avez toujours été rigoureux tout en gardant l'esprit familial dans le travail. Que ce travail vous rende fier de moi et fasse votre joie! Puisse Dieu vous récompenser et vous accorder une longue vie.
Merci!*

Au Pr MOULSEHOUL Soria

*Votre rigueur, votre courage ont fait de vous un maître admiré de tous. Auprès de vous nous avons acquis l'amour de la recherche scientifique. Très cher Maître les mots me manquent pour vous exprimer toute ma reconnaissance et toute mon affection. **Merci !***

*Je tiens à remercier vivement **Pr. Tou Abdenaceur**, pour son esprit, ses grandes générosités scientifiques, pour sa lecture attentive et ses remarques, malgré ses nombreuses occupations et charges. Votre participation à ce jury est un honneur pour moi.*

*J'adresse mes sincères remerciements à **Pr Sahraoui Toufik**, pour ses précieux conseils, ses orientations, son esprit scientifique et pour sa participation à ce jury.*

Aux docteurs BENDJAMIAA, Aidouni

Merci pour votre aide, vos conseils et votre disponibilité. Que ce travail soit le témoin de ma profonde estime et de mon affection pour vous. Soyez bénis à jamais!

Au personnel du service d'anatomie et cytologie pathologiques Particulièrement les Techniciens

Je remercie tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de cette thèse

Résumé :

Introduction : Les protéines Cbl jouent des rôles importants dans la régulation des récepteurs des facteurs de croissance, en agissant comme ubiquitine ligases et des protéines adaptateurs multiples. Dans la présente étude, nous avons examiné l'expression des protéines Cbl dans les carcinomes gastriques et étudié la corrélation d'expression de ces protéines avec les différentes caractéristiques clinico-pathologiques ainsi que le niveau d'expression du récepteur EGFR.

Matériels et méthodes: Quatre-vingt-six (96) blocs de paraffine de sections cancéreuses des tissus gastriques et 17 blocs de paraffine de sections présentant d'autre pathologie gastrique non cancéreuse ont été recueillies au niveau du service d'anatomo -pathologie, de l'hôpital militaire d'Oran (ouest de l'Algérie) pour la période 2006-2015. Tous les cas ont été identifiés histologiquement comme présentant des cellules gastriques malignes. Un protocole immunohistochimique a été développé pour l'analyse de l'expression des protéines c-Cbl , Cbl-b et EGFR dans les tissus cancéreux de l'estomac et les tissus des cas témoins.

Résultats : L'âge médian des patients atteints de cancer gastrique était de 60 ans (extrêmes, 27-87). Il s'agissait de 70 cas de sexe masculin (72,9%) et 26 cas (27,1%) de sexe féminin avec un sex -ratio 2,7. L'adénocarcinome moyennement différencié chez 33 cas (34,4%) était le type histologique le plus fréquent. L'analyse immunohistochimique a révélé que les protéines c-Cbl et Cbl-b ont été exprimées dans les cellules cancéreuses gastriques avec des scores différents et une intensité de coloration différente. Le score le plus prédominant noté pour c-CBL était le score 2 dans 20 cas (20,8%), suivie par le score 4 dans 16 cas (16,7%), puis les scores 3, 6 et 7 dans le même nombre de 12 cas. En ce qui concerne les niveaux de l'immuno-coloration; une coloration intense a été noté dans 17 cas (17,7%) suivi par une coloration modérée dans 31 cas (32,3%).

Des 96 de cancer gastrique, 51 cas ont exprimé la protéine Cbl-b à des degrés divers. Le score observé le plus prédominant était le score 0 noté dans 37 cas (38,5%), suivi par le score 2 dans 13 cas (13,5%), score 4 dans 11 (11,5%). En ce qui concerne les niveaux de l'immuno-coloration de CBL-b, une intense coloration a été rapportée dans 14 cas (14,6%); suivi d'une coloration modérée dans 16 cas (16,7%).

L'étude de l'expression des protéines CBL n'a pas démontré une corrélation entre le niveau d'expression de ces protéines et la présence des métastases ganglionnaires dans les tissus cancéreux. De même aucune corrélation n'a été retrouvée avec les différents stades pathologiques du cancer gastrique ($p > 0,05$). D'un autre cote, les protéines CBL ont été

retrouvées exprimées au même degré dans les tissus cancéreux infiltrant et non infiltrant. Le marquage positif de l'EGFR (dans 50 cas) a été démontré corrélé à la présence de métastases et des ganglions lymphatiques et aux stades pathologiques avancés du cancer gastrique, $p = 0,001$. La coloration positive de l'EGFR a été très remarquable dans les cas de cancer infiltrant que dans les cancers non infiltrant, $P = 0.001$. La Co-expression des deux protéines EGFR et CBL a été plus notée dans le cancer différencié que dans les cas indifférenciés.

Conclusion : Les protéines Cbl et EGFR peuvent être considérés comme des indicateurs de pronostic dans le cancer gastrique. De même, Cbl peuvent être vu comme une opportunité thérapeutique dans les tumeurs malignes humaines:

Mots clés : Cancer gastrique, c-CBL, CBL-b, EGFR ; Immunohistochimie

Abstract:

Introduction: Cbl proteins play important roles in the regulation of growth factor receptors by acting as ubiquitin ligases and multiple adapter proteins. In this study, we examined the expression of Cbl protein in gastric carcinoma and studied the correlation of expression of these with different clinicopathological characteristics and the expression level of EGFR

Materials and Methods: Eighty-six (96) paraffin blocks of tumor tissue sections of gastric and 17 sections of paraffin blocks with other non-cancerous gastric pathology were collected at anatomical Service -pathologie, of military hospital of Oran (western Algeria) for the period 2006-2015. All cases were identified histologically as malignant gastric cells. Immunohistochemistry protocol was developed for the analysis of protein expression c-Cbl, Cbl-b, and EGFR in cancer tissues of the stomach and the case-control tissues.

Results: The median age of gastric cancer patients was 60 years (range, 27-87). They were 70 cases of male sex (72.9%) and 26 cases (27.1%) of sex feminin a sex -ratio 2.7. Moderately differentiated adenocarcinoma 33 cases (34.4%) was the most common histological type. Immunohistochemical analysis revealed that proteins c-Cbl and Cbl-b were expressed in gastric cancer cells with different scores and a different staining intensity. The most predominant score note for c-CBL was the score 2 in 20 cases (20.8%), followed by the score 4 in 16 (16.7%), then scores 3, 6 and 7 in the same number of 12 cases. As regards the levels of immunostaining; intense staining noted you in 17 cases (17.7%) followed by a moderate staining in 31 cases (32.3%). 96 of gastric cancer, 51 cases expressed the Cbl-b protein to varying degrees. The observed score the most predominant was the score 0 noted in 37 cases (38.5%), followed by the score 2 in 13 cases (13.5%), score 4 in 11 (11.5%). Regarding the immunostaining levels CBL-b, an intense staining was compared years in 14 cases (14.6%); followed by a moderate staining in 16 cases (16.7%)

The study of the expression of proteins CBL has not shown a correlation between the expression level of these proteins and the presence of lymph node metastases in cancer tissues. Similarly no correlation was found with the different pathological stages of gastric cancer ($p > 0.05$). On the other side, the CBL proteins were expressed to the same degree found in cancer tissue infiltrating and non infiltrating. The positive staining for EGFR (in 50

cases) has been shown to correlate with the presence of metastasis and lymph nodes and advanced pathological stages of gastric cancer, $p = 0.001$.

On the other hand, positive staining of EGFR has been very remarkable in the case of invasive cancer in the non-infiltrating cancers, $P = 0.001$; Co-expression of both EGFR and CBL proteins was noted in the more differentiated cancer than in undifferentiated cases.

Conclusion: Cbl protein and EGFR can be considered as poor prognostic indicators in gastric cancer. Moreover, Cbl can be seen as a therapeutic opportunity in human malignancies

Keywords: Gastric cancer, c-CBL, CBL-b, EGFR; Immunohistochemistry.

Liste d'abbreviations

ADN: acide désoxyribonucléique

ARNm: acide ribonucléique messenger

APS: adaptor protein containing pleckstrin homology and SH3 domains

ARGBP2: Arg-binding protein 2

BCL-2: Bcell lymphoma protein 2 α

BCR: B-cell receptor

C3G: Crk SH3-binding guanine nucleotide releasing protein

CAP: Cbl-associated protein

CHU: Centre hospitalo-universitaire

CIN85: Cbl interacting protein of 85 kDa

CSF-1: Colony stimulating factor-1

DAB: Diaminobenzidine

EGF: Epidermal growth factor

EGFR: Epidermal growth factor receptor

Eps15: EGFR pathway substrate 15

Erk: Extracellular regulated kinase

FGFR: Fibroblast growth factor receptor

G : Grade

GRB2 : Growth factor receptor-bound protein2

GPCR: G-protein coupled receptor

GTPase: Guanosine triphosphatase

H&E: Hématoxyline et éosine

HER2: Human epidermal growth factor receptor 2

HGFR: Hepatocyte growth factor receptor

HRP: Horseradish peroxidase

IHC: Immunohistochimie

IL: Interleukin

IP3: Inositols triphosphates 3

JAK: Janus kinase

M: Metastasis

MAPK: Mitogen-activated protein kinase

N : Node

P53: Protéine 53

P85 : Protéine 85

PBS: Phosphatase buffer saline

PDGFR: Platelet Derived Growth factor receptor

PKC: Protein kinase C

PI-3'K: Phosphoinositide-3' kinase

PLC β : Phospholipase C β

PSTAT3: Stat3 phosphorylé

PTK: Protein tyrosine kinase

PTB: Phosphotyrosine binding domain

Rac: Ras-related C3 botulinum toxin substrate

RAF: Rapidly Accelerated Fibrosarcoma

RAP1: Ras-related protein 1

RAS: Rat Sarcoma

RING: Really interesting new gene

ROCK: Rho-associated kinase

RTK: Receptor tyrosine kinase

SBR: Scarff-bloom-richardson

SDF-1: Stromal cell-derived factor

SHC: Src homology C-terminal

SH2: src homology 2

SLAP: Src-like adaptor protein

SLI-1: Suppressor of lineage defect-1

SOS: son of Sevenless

SPRY2: Sprouty 2

STAT 3: Signal Transducers and Activators of Transcription 3

STS: Suppressor of T-cell signaling

T : Tumor

TCR: T-cell receptor

TKB: Tyrosine kinase binding

TNM: Tumor node metastasis

TULA: T-cell ubiquitin ligand

UBA: Ubiquitin-associated domain

Ubc: Ubiquitin conjugating

VEGFR: Vascular endothelial growth factor receptor

ZAP-70: ζ associated protein of 70 kDa.

Liste des figures

Titre des figures	page
Figure 01: Les membres de la famille des protéines Cbl	2
Figure 02: Localisation Chromosomique du gène <i>c-Cbl</i> : 11q23.3	3
Figure 03: La structure en domaine des proteines Cbl chez les mammifères	4
Figure 04: Les interactions possibles des protéines Cbl	10
Figure 05: Mutation de la protéine Cbl dans la région RING	11
Figure 06: Classification des récepteurs tyrosine kinase	15
Figure 07: Famille du récepteur HER	16
Figure 08: Mode d'activation du récepteur HER	18
Figure 09: Principaux ligands responsable pour récepteur HER	20
Figure 10: Les inhibiteurs d'EGFR	23
Figure 11: Anatomie de l'estomac	25
Figure12: Ulcère gastrique	27
Figure 13: Ulcère gastrique induit par HP	28
Figure 14 (A): Adénocarcinome de type intestinal GR 20X	31
Figure 14 (B): Adénocarcinome de type diffus	33
Figure 14 : (C) : la limite plastique	33
Figure 15: Les lymphomes gastriques	31
Figure 16 : Métastases gastrique	36
Figure 17: Expression de Cbl dans le carcinome gastrique et la muqueuse non néoplasique	43
Figure 18: Expressions de c-Cbl et Cbl-b et EGFR dans le carcinome gastrique	44
Figure 19: Répartition des cas selon le Sexe	50
Figure 20: Répartition selon les tranches d'Age	51

Figure 21: Répartition des cas selon la localisation de la tumeur	52
Figure 22: Répartition des cas selon les aspects macroscopiques du cancer gastrique	52
Figure 23: Répartition des cas selon les aspects microscopiques	53
Figure 24: Répartition des patients selon les ganglions lymphatiques et l'infiltration gastrique	53
Figure 25: Répartition des patients selon la classification TNM	54
Figure 26: Expressions de c-Cbl dans le cancer gastrique	55
Figure 27 : Expressions de c-Cbl dans les cas témoins	56
Figure 28 : Expressions de Cbl-b dans le cancer gastrique	59
Figure 29 : Expressions de Cbl-b dans les cas témoins	59
Figure 30: Expressions d'EGFR dans le cancer gastrique	62
Figure 31: Expressions d'EGFR dans les cas témoins	63

Liste des tableaux

Titre des tableaux	Page
Tableau 01: Les interactions connues pour Cbl-b et Cbl-c avec d'autres protéines cellulaires	7
Tableau 02 : Surexpression de l'EGFR en fonction des tissu	24
Tableau 03 : Classification TNM	34
Tableau 04: Etude de l'expression de c-Cbl en fonction des paramètres histopathologique et cliniques.	57
Tableau 05: Score d'expression de la proteines c-Cbl	58
Tableau 06: Intensité du marquage des protéines c-Cbl	58
Tableau 07: Etude de l'expression de Cbl-b en fonction des paramètres histopathologique et cliniques	60
Tableau 08: Score d'expression de la proteines Cbl-b	61
Tableau 09: Intensité d'immunomarquage de la protéine Cbl-b	62
Tableau 10: Etude de l'expression de EGFR en fonction des paramètres histopathologiques et cliniques	63
Tableau 11: Relation entre l'expression de l'EGFR et la protéine c-Cbl	64
Tableau 12: Relation entre l'expression de l'EGFR et la protéine c-Cbl	65

Introduction

Introduction :

Tous les eucaryotes supérieurs utilisent des protéines tyrosine kinases (PTK), les commutateurs moléculaires pour contrôler une variété de signaux cellulaires. Notamment, de nombreuses PTK ont été identifiées comme proto-oncogènes dont aberrante expression, mutations ou altération par des agents pathogènes peut conduire à des tumeurs malignes humaines. Par conséquent, il est évident que les fonctions de PTK doivent être régulées avec précision afin de maintenir l'homéostasie de l'organisme (**Mayumi. N, 2011**).

Les enquêtes au cours des ces dernières années ont révélé que les membres des protéines de la famille Cbl peuvent servir en tant que régulateurs négatifs de la signalisation RTK, et des études biochimiques et de biologie cellulaire ont décrypté le mécanisme de base de ce règlement. Récemment le terrain a commencé à apprécier la signification de la signalisation médiée par les PTK dans l'organismique et dans les maladies humaines. (**Dikic.I, 2003**).

Les protéines Cbl contrôlent plusieurs processus cellulaires en agissant comme ubiquitine ligases et des molécules d'adaptateur à multifonctions. En effet, Lors de l'activation des récepteurs tyrosine kinase, CBL permet le recrutement de ces derniers par le mécanisme ubiquitylation. De ce fait, ils sont impliqués dans divers mécanismes physiologiques tels que : la prolifération cellulaire, la différenciation et la motilité des cellules, ainsi que dans différentes pathologies telles que les maladies auto-immunes, l'inflammation et le cancer (**Thien C. B., 2001**).

Des études récentes ont suggéré que le système récepteur / ligand EGF a été impliqué dans la prolifération de la muqueuse gastrique et la mise au point de survenue d'un cancer gastrique, et que la surexpression ou l'activation de l'EGFR a été fortement lié à un mauvais pronostic du cancer de l'estomac (**Dong Q, 2010 ; Celikel C,2007**). Les mutations au sein de Cbl ou au niveau de ces domaines d'interaction, peuvent conduire à la conversion de Cbl en un oncogène modifiant, ainsi, ses fonctions (**Sehat B, 2008**).

La coexpression de C-CBL, CBL-B et EGFR dans le cancer gastrique et leurs associations sont rarement rapportée dans la littérature étrangère et national.

Introduction

La tendance actuelle, en ce qui concerne les objectifs à court et moyen terme, porte essentiellement sur la compréhension des mécanismes de la cancérogénèse, la prévention, le dépistage, le développement de nouvelles molécules d'intérêt thérapeutique, l'amélioration de la qualité de vie des patients, ainsi que le développement de marqueur diagnostiques, pronostiques, ou encore prédictifs de réponse aux traitements.

Dans ce modeste travail, nous passons en revue les progrès récents dans la compréhension du rôle physiologique des protéines Cbl, l'importance d'un répertoire croissant de protéines interagissant avec Cbl pour la régulation des voies de signalisation déclenchées par les facteurs de croissance et nous avons, expérimentalement, examiné en premier temps le niveau d'expression des protéines Cbl ainsi que de l'EGFR dans les tissus du cancer gastrique par comparaison à des tissus gastriques ne présentant pas de pathologies cancéreuses. Dans un second temps nous avons analysé les possibles corrélations entre le niveau d'expression de ces protéines ainsi que les différents paramètres pathologiques, histologiques, épidémiologique et clinique des patients cancéreux admis au niveau de l'hôpital militaire de la wilaya d'Oran

Partie I:

Chapitre I:

Protéines Cbl

&

*Le Récepteur du facteur de
croissance EGFR*

I. Protéines CBL (Casitas B-cell Lymphomas) :

La famille des ubiquitines ligases Cbl a récemment émergée comme étant un régulateur clé des RTK (Fiore F, 2001), en promouvant l'ubiquitination des récepteurs activés et en les ciblant pour une dégradation dans les lysosomes ou dans le protéasome. Cette famille est constituée de protéines adaptatrices agissant comme régulateurs positifs et négatifs des récepteurs à activité tyrosine kinase. Trois homologues de CBL ont été caractérisés chez les mammifères: c-CBL (ou CBL), CBL-b, CBL-c différant par la longueur de leur domaine C-terminal et donc par leurs fonctions adaptatrices. (Dong Q, 2010). Lors de l'activation de ces récepteurs, CBL permet le recrutement de molécules impliquées dans la transduction du signal.

I.1-Historique:

L'odyssée de Cbl a commencé avec la découverte de la protéine oncogène, c-Cbl, une séquence d'acide aminé de 357 de long. Cet oncogène a été découvert par Langdon et ses collègues en 1989 à travers sa transduction dans le rétrovirus Cas NS-1, ce qui induisait des lymphomes pré-B et des leucémies myéloïdes chez la souris (d'où le nom de Casitas lignée B lymphome) et transformation aiguë dans des fibroblastes de rongeurs immortalisés (Langdon, 1995). Le gène de Cbl a été, par la suite, cloné par la même équipe de Langdon en 1991.

Langdon, en 1995, impliquaient Sli-1, un homologue de Cbl dans *Caenorhabditis elegans*, en tant que régulateur négatif de la maturation induite par l'engagement de la vulve de l'homologue tyrosine kinase de l'EGFR (Let-23) dans ce nématode. De ces observations, l'idée que Cbl agit comme un régulateur négatif des voies de signalisation a été soulevée et divers mécanismes ont été, ainsi, suggérés et explorés. Langdon et ses collaborateurs (1996) ont été les premiers à suggérer le rôle de Cbl dans la dégradation du récepteur de CSF-1 via le mécanisme d'ubiquitination. A la suite, plusieurs enquêtes sont allés dans la même direction pour suggérer que l'activité des récepteurs tyrosines kinases PDGF, l'EGF et CSF-1 ainsi que celle des tyrosines kinases de la famille Src sont régulés à la baisse par leur ubiquitination par les protéines CBL et leur dégradation subséquente par le sentinelle du protéasome.

I.2-Distribution tissulaire et cellulaires des protéines CBL :

Les niveaux d'expression des ARN messagers des Cbls chez les mammifères varient de manière différentielle. Par exemple, c-Cbl et Cbl-b sont exprimés dans la plupart des tissus, mais les niveaux les plus hauts sont retrouvés dans le thymus et les testicules (**Langdon, W.Y, 1989**). Pour ce qui est de Cbl-c, il est faiblement exprimé dans les tissus hématopoïétiques mais il est fort exprimé dans les tissus épithéliaux (**Keane, M.M., 1999**). Dans les cellules des mammifères, deux membres apparentés de la famille Cbl, Cbl-b et Cbl-c, sont également présents (**Figure 01**). Cbl-b, qui est la plus étroitement liée à la Cbl, se retrouve dans de nombreux types de cellules et est hautement exprimé dans les lymphocytes T matures (**Keane M.,1995**). En revanche, Cbl-c, un court homologue de Cbl, également connu comme Cbl-3, est plus exprimé dans l'endoderme de divers organes, mais à de faibles niveaux dans les tissus hématopoïétiques (**Fiore F, 2001 ; Yoon C ,1995**)

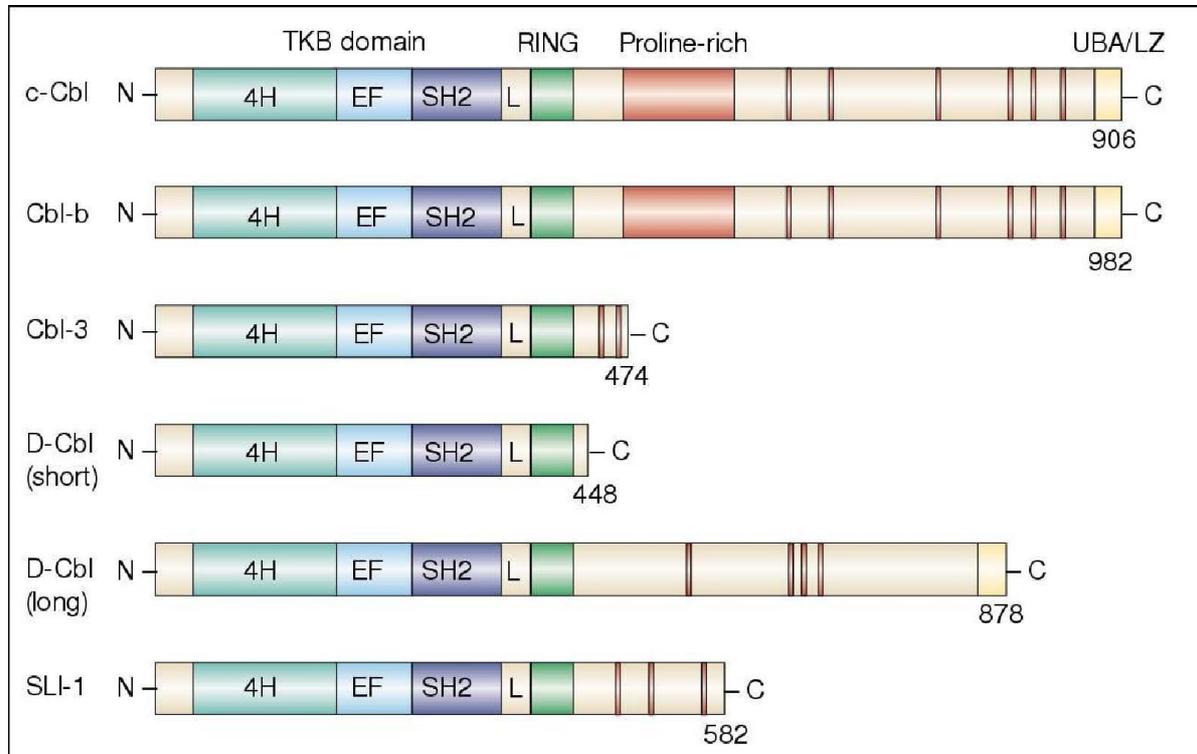


Figure 01 : Présentation schématique des membres de la famille des protéines Cbl (Thien et al, 2001).

I.3-Structures nucléiques des protéines CBL:

Les gènes codants pour la famille des protéines Cbl (situés dans la région chromosomique 11q23.3) (**Figure 02**) ont été identifiés dans plusieurs espèces. Les travaux de **Nau et Lipkowitz (2003)** ont permis de présenter en détail la structure intron-exon des gènes *CBL* chez l'homme ainsi que leur évolution. Le gène *c-CBL* a un cadre de lecture ouvert composé de 16 exons, *CBL-b* de 19 exons et *CBL-c* de 11 exons. Les formes de *CBL-b* et *c-CBL* humains et de souris ont une structure intron / exon identiques. En accord avec les faits connus au sujet des séquences conservées entre les protéines Cbl, les premiers 430 acides aminés des trois membres de la famille humaine Cbl affichent un degré élevé d'homologie. Cela concerne le domaine de TKB, le domaine RING et le domaine de liaison entre les deux. Cette relation entre les membres de la famille Cbl est également soulignée pour les protéines Cbl de souris. Parmi les espèces non mammifères, les gènes *Cbl* sont présents dans les ascaris, les poissons, les grenouilles et les oiseaux. Les ascaris (*C. elegans*) ont une seule protéine Cbl (*Sli-1*). Les insectes ont un gène *CBL*, ce qui donne lieu à l'épissage de deux isoformes chez la drosophile, alors que les poissons, les amphibiens et les oiseaux possèdent deux gènes *c-Cbl* et *Cbl-b*. Les mammifères, y compris l'homme, les rongeurs, les vaches et les cochons, ont des gènes codant pour *c-Cbl*, *Cbl-b* et *Cbl-c* (Cbl-c), bien que pour certaines espèces seulement des séquences partielles des gènes de *Cbl* sont disponibles (**Kim, 2010**)

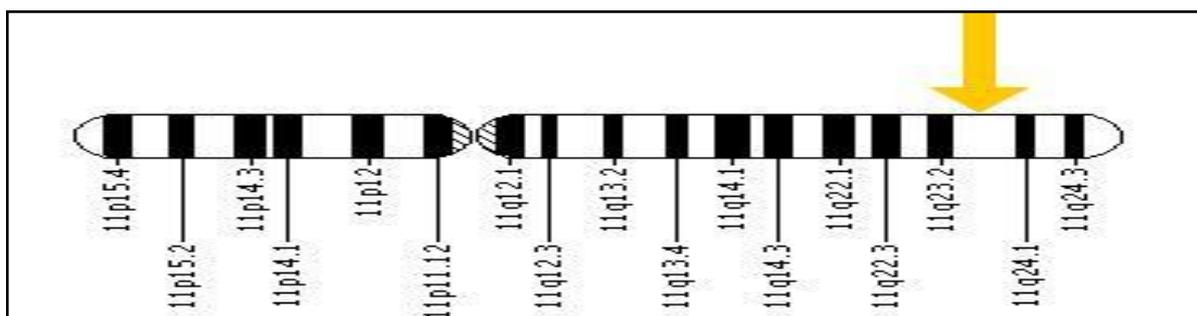


Figure 02: Localisation Cytogénétique de c-Cbl: 11q23.3 (Langdon WY, 1992)

L'existence de gènes *Cbl* a été tracée aussi loin que chez les espèces les plus primitivement connues telle que les ascidies et les chordés. Le gène de *CBL* chez l'ascidie présente une homologie C-terminale avec les gènes *c-Cbl* et *Cbl-b* des mammifères (**Dikica. I ; 2003**).

I.4-Structures en domaines des protéines CBL:

Chez les mammifères, la famille des protéines Cbls est composée de c-Cbl, Cbl-b, et Cbl-3 (Nau, M.M, 2003). Les trois membres ont une forte homologie dans leur séquence terminale d'acides aminés, laquelle est formée d'un domaine liant les tyrosines kinases (TKB). Le TKB contient un domaine SH2 variable qui sert dans la liaison avec des résidus tyrosines phosphorylés spécifiques chez les récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK). Un domaine de 28 anneaux (RING) suit le domaine TKB, qui régule l'association de CBL, et le transfert de l'ubiquitine vers le RTK (Thien, C.B, 2001). La portion C terminal des Cbls contient une région riche en prolines, très rudimentaire chez Cbl-3, qui régule des interactions avec d'autres protéines contenant un domaine SH3. Cette région est suivie par plusieurs résidus tyrosines phosphorylables qui sont nécessaires non seulement pour l'activité des enzymes mais aussi pour leur capacité à agir comme des protéines adaptatrices. Les ubiquitines ligases c-Cbl et Cbl-b ont une séquence homologue pour le domaine leucine 'zipper' et le domaine d'association avec l'ubiquitine (UBD). Le domaine leucine 'zipper' permet l'homo et l'hétérodimerisation des ligases alors que le domaine UBD permet l'association aux ubiquitines (Figure 03).

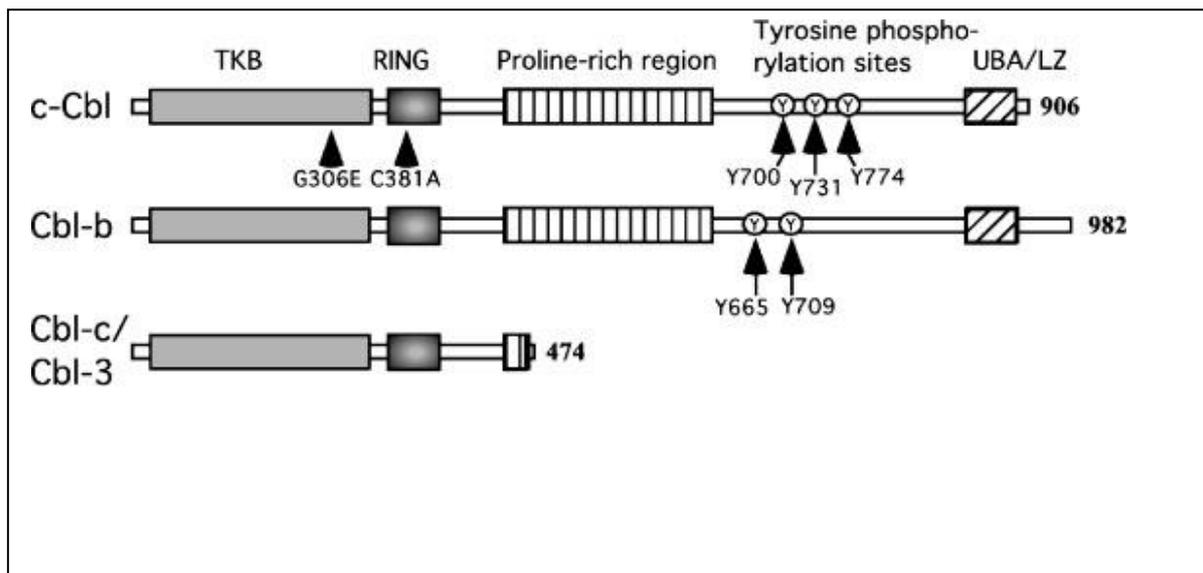


Figure 03. La structure en domaines Cbl chez les mammifères. (Swaminathan G et al, 2006)

Chapitre I: Les Protéines Cbl & Le Récepteur du facteur de croissance EGFR

Le recrutement de Cbl aux RTKs activés mène à la phosphorylation de Cbl, ce qui est nécessaire à une activité ligase (E3) efficace de la protéine (**Levkowitz, G, 1996**). Des analyses effectuées sur une mutation générée dans le domaine TKB de Cbl ont démontré que ce domaine est indispensable à Cbl pour promouvoir la multi-ubiquitination. L'interaction du domaine TKB de Cbl avec les RTKs sert aussi à assurer la bonne orientation de son association avec le récepteur et permettre le transfert de l'ubiquitine. Des gènes similaires à ceux des Cbls ont été retrouvés chez d'autres organismes tels que le *C. elegans* (SLI-1), la drosophile (d-Cbl), le *Xenopus*, et les poulets (g-Cbl) (**Tsygankov, A.Y., 2001**). Une comparaison des séquences primaires de Cbl chez différentes espèces, révèle une forte conservation évolutive du domaine TKB et même du domaine RING de Cbl (**Robertson, H., 2000**). Chez la drosophile, d-Cbl est exprimée d'une manière très comparable structurellement à celle chez l'humain. Le grand degré de conservation des domaines TKB et RING souligne l'importance de ces domaines dans le fonctionnement de Cbl, et suggère que ces motifs jouent un rôle unique qui est particulière à la famille des protéines Cbls (**Acconcia, F., S, 2009**).

I.5-Les ubiquitine ligases Cbl : Des protéines à multiples domaines d'interaction:

Les protéines Cbl sont des protéines à multiples domaines d'interaction et deux régions sont très conservées : le domaine d'interaction avec les tyrosines kinases (domaine TKB) et le domaine RING (**Figure 03**). Le domaine TKB permet l'interaction de Cbl avec les tyrosines phosphorylées des autres protéines. Ce domaine est composé de quatre hélices enroulées, d'un domaine d'interaction avec le calcium et d'un domaine SH2 (src homology 2 domain). C'est ce dernier domaine qui dicte la spécificité du substrat avec lequel Cbl va interagir. Le domaine Linker permet de faire le lien entre le domaine TKB et le domaine RING. Il est composé de deux résidus tyrosine essentiels (Y368 et Y371). La délétion d'un des deux résidus entraîne la perte de fonction de Cbl et lui confère un potentiel oncogénique. Ces deux résidus servent de substrat de phosphorylation pour les récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK) (**Fiore F, 2001**). Le domaine RING est un domaine à doigts de zinc (Ring finger) qui contrôle l'activité ligase de l'enzyme E3 et sert de site de fixation à l'enzyme E2. La partie carboxyterminale après le domaine RING est beaucoup moins conservée et sa longueur varie selon les membres de la

Chapitre I: Les Protéines Cbl & Le Récepteur du facteur de croissance EGFR

famille Cbl. Néanmoins, deux éléments sont conservés : la région riche en proline et les résidus tyrosine (trois pour c-Cbl ou deux pour Cbl-b). La région riche en proline est impliquée dans les interactions avec les protéines à domaine SH3 comme PI3K (phosphoinositide 3-kinase), tandis que les tyrosines situées dans la partie en carboxyterminale sont phosphorylées par les Src kinases. Le domaine UBA (ubiquitin associated domain) situé à l'extrémité de c-Cbl et Cbl-b est un domaine d'interaction avec l'ubiquitine. Il interagit de façon non covalente avec l'ubiquitine ou de préférence avec les chaînes de polyubiquitine, et intervient aussi dans les interactions entre les protéines (**Figure 01**).

Des expériences ont montré que les domaines Linker et RING sont essentiels à l'activité ligase de l'enzyme E3 de Cbl, plusieurs mutations dans le domaine RING ont été identifiées dans différents types de cancer. Des mutations dans le domaine TKB inhibent l'interaction de Cbl avec les protéines à activité tyrosine kinase, mais ne semblent pas modifier l'activité ligase de l'enzyme E3 de Cbl. Du fait de leurs multiples domaines d'interactions, les protéines Cbl interagissent avec et contrôlent la dégradation d'un grand nombre de protéines parmi lesquelles on peut citer des récepteurs à activité tyrosine kinase (EGFR [epidermal growth factor receptor], IGF1R [insulin-like growth factor-1 receptor], PDGFR [platelet-derived growth factor receptor], FGFR [fibroblast growth factor receptor], VEGFR [vascular endothelial growth factor receptor], HGFR [hepatocyte growth factor receptor], Kit, etc.), les récepteurs des cytokines IL[interleukin]-2, IL-3, IL-4, CSF-1 (colony stimulating factor-1), les récepteurs à l'antigène sur les lymphocytes T et B, les intégrines, les protéines cytosoliques à activité tyrosine kinase (Src kinases) et les protéines cytoplasmiques (PI3K) (**Keane MM, 1999; Kim M., 1999**) (**Tableau 01**).

Les Cbls se localisent principalement dans le cytosol, mais elles peuvent aussi se retrouver à la membrane cellulaire ou associées au cytosquelette (**Keane, M.M, 1999 ; Langdon, W.Y, 1992**). La phosphorylation de Cbl est associée avec sa translocation vers la membrane cellulaire et avec la régulation négative des différents récepteurs tyrosine kinases, des protéines tyrosine kinases, des phosphatases non-récepteurs, des protéines adaptatrices, et des protéines du cytosquelette. L'ubiquitination des RTKs par les Cbls, plus spécifiquement c-Cbl dans les mammifères, a comme but de réguler à la baisse ces récepteurs via son association avec une phosphotyrosine spécifique du récepteur ciblé.

Chapitre I: Les Protéines Cbl & Le Récepteur du facteur de croissance EGFR

Tableau 01 : Les interactions connues pour Cbl-b et Cbl-c avec d'autres protéines cellulaires (Interaction '+'; '-' non-interaction).

Protein	Protein domain	Cbl domain	Cbl-b	Cbl-c	Functional role
EGFR	pY-1045	PTB	+	+	Ligand-dependent receptor downregulation
ErbB-2	pY-1112	PTB			Ligand-dependent receptor downregulation
HGFR	pY-1003	PTB			Ligand-dependent receptor downregulation
CSF-1R	pY-973	PTB			Ligand-dependent receptor downregulation
ZAP-70	pY-292	PTB	+		ZAP-70 Inactivation, TCR/Sig regulation
Syk	pY-323	PTB	+		Inactivation of Syk, BCR & FcR Sig
Src	pY-416	PTB			Inhibition of Src activity
BLNK	pY-115	PTB	+		BLNK negative regulation in BCR Sig
Sprouty2	pY-55	PTB			Competition of Cbl binding to EGFR
APS	pY-618	PTB			Cbl recruitment for IR, c-Kit, PD GFR
Lyp1	Putative PXXpY	(PTB)			Dephosphorylation of Cbl
Sprouty2	C-term domain	RING finger			Inhibition of RTK ubiquitination
UbcH7	L1 and L2 loops	RING finger			Ubiquitination of proteins
Grb2	SH3	pro-rich (481–563)	+	-	Indirect recruitment of Cbl to EGFR
Nck	SH3 A & B	pro-rich & 820–828	(+)		Regulation of Xenopus embryo patterning
p85 (PI-3' kinase)	SH3	pro-rich (595–982 in Cbl-b)	+		Ubiquitination and negative regulation of PI3
CAP	SH3	pro-rich	+		GLUT4 translocation, actin regulation
ArgBP2	SH3 B & C	pro-rich			Negative regulation of Abl kinase by Cbl
CIN85	SH3 A,B,C	pro-arg motif	+	-	RTK endocytosis
CMS	SH3 A,B,C	pro-arg motif	+		Cell morphology
PLC β 1/2	SH3	pro-rich	+	-	Calcium levels in T/B CR pathways
Fyn	SH3	pro-rich (552–614)	+	+	TCR signaling
Src, Fyn, Lck,	SH3	pro-rich			Osteoclast functions, RTK downregulation
Hck					cell morphology, ubiquitination and degradation
Fgr	SH3	pro-rich	+	-	Ubiquitination
Lyn	SH3	pro-rich	+	+	Signal from B cell, HGF, G-CSF receptors
Btk	SH3	pro-rich (526–537)	+		BCR signaling
Abl	SH3	pro-rich			Cytoskeleton regulation (in PI3K, CrkL)
AIP4	WW	pro-rich		+	Downregulation of activated RTKs
Myosin 1C	SH3	pro-rich			N.D.
SH3P17	SH3	pro-rich			Regulation of endocytosis
Dap160	SH3	N.D.			Endocytosis
CrkL, Crk II, I	SH2	pY-700/774	+		C3G/Rap1 regulation, Cell morph
Vav	SH2	pY-700	+		TCR signaling
p85 (PI-3'kinase)	SH2	pY-731	(+)		Negative regulation of PI-3 kinase activity
SFKs	SH2	N.D.			Stabilization of interactions with Cbl
Abl	SH2	N.D.			Stabilization of the complex with Cbl
PKC α / q	N.D.	C-terminal Cbl			Cbl tyrosine phosphorylation inhibition
14-3-3	N.D.	pS-619-623 and pS-639-642	-		N.D.
Cbl	leucine zipper	leucine zipper			Homodimerization
SLAP2	C-term part	N-term part	+		Inhibition of TCR signaling

I.6-Fonction biologique :

Les perceptions sur des bases biochimiques du rôle physiologique de Cbl et un potentiel de pouvoir de transformation sont venues de plusieurs investigations récentes qui impliquent fortement Cbl dans le règlement de la signalisation des tyrosines kinases. Un indice important a été fourni par la phosphorylation constitutive sur résidu tyrosine d'une série de mutants délétés de Cbl lorsque exprimés dans les cellules. Ceux-ci comprenaient une délétion de 17 acides aminés (aa 366 ± 382; 70 / Z del..) à proximité des séquences N-terminales - du domaine RING (Gilman A. G, 2002), une forme isolée du lymphome de la lignée pré B 70Z / 3, et d'autres petites délétions au sein de cette région de 17 acides aminés ou des délétions ponctuelles de la tyrosine 368 ou 371, mais pas leurs substitutions en phénylalanine. Cbl a également été trouvé pour être constitutivement hyperphosphorylés sur tyrosine dans les cellules exprimant l'oncogène Abl activé (v-abl ou BCR / ABL), les tyrosines kinase Src ou Lck, lier les domaines SH2 de ces kinases *in vitro*, et les associé, *in vivo*, avec Abl (Gilman A. G, 2002 ; Keane, M.M, 1995; Fiore F, 2001).

Ces observations ont suggéré une association entre la déréglementation de la phosphorylation sur résidu tyrosine de Cbl et la transformation cellulaire. Dans d'autres études complémentaires, la protéine Cbl a été identifiée comme une protéine de liaison au domaine SH3 de Fyn, Lck ou des domaines SH3 de Nck (Keane M. M., 1999). En outre, la Cbl était démontrée être un substrat précoce et dominant de la phosphorylation sur résidu tyrosine en réponse à l'activation d'une variété de récepteurs de surface cellulaire couplé à des tyrosines kinases (Tableau 01). Cbl a également été montré pour former un complexe d'activation avec les domaines SH2 de la sous-unité p85 de kinase PI3k, et les protéines adaptatrices Crk, ainsi que dans de nombreux cas avec les récepteurs autophosphorylés, ou des tyrosines kinases réceptrices associées (Gilman A. G, 2002 ; Meisner H., 1997). Bien que les deux formes A et B de la sous-unité p85 de PI-3- kinase sont capables de s'associer avec Cbl, l'interaction avec la forme p85 peut se produire de manière préférentielle. Ces résultats suggèrent que la Cbl peut fonctionner dans les voies médiées par PI 3-kinase généré par les médiateurs lipidiques et ceux médiés par interaction avec Crk et les facteurs d'échange, qui régule la petite protéine G, RAP1. Cbl interagit également avec les domaines SH3 de l'adaptateur Grb2 pour former un complexe d'activation indépendant et distinct de Grb2, cette fraction de Cbl subit une importante phosphorylation de la tyrosine lors

Chapitre I: Les Protéines Cbl & Le Récepteur du facteur de croissance EGFR

de la stimulation du ligand dans une variété de types cellulaires (**Gilman A. G, 2002 ; Meisner H., 1997; Robertson H., 2000**). De manière intéressante, une augmentation de l'association Grb2 et Cbl a été observée lors de l'activation du récepteur (**Robertson H., 2000 ; Meng W., 1999**) ce qui suggère la possibilité que Cbl peut réguler la disponibilité de Grb2 à d'autres protéines à domaine de liaison SH3 telles que SOS. Enfin, Cbl interagit avec la famille des tyrosines kinases Src, apparemment par l'intermédiaire de SH3, ainsi que des mécanismes SH2-dépendants (**Keane M. M., 1999**). D'autres études ont montré que Cbl est essentielle pour la fonction de Src dans les ostéoclastes (**Joazeiro C. A., 1999**) L'ensemble de ces données ont fourni un fort soutien pour la participation de Cbl dans la signalisation d'un large éventail de récepteurs couplés aux tyrosines kinases. La plupart des fonctions précitées de Cbl peuvent être attribués à des motifs dans la région Cbl-C. En revanche, Une convergence des études biochimiques et génétiques récentes a montré que la séquence primaire de la région N transforme la protéine Cbl (**Gilman A. G, 2002**). Cependant, la transduction du signal a conduit à l'identification de cette région critique pour le rôle de Cbl.

Un de ces sites, Y292, est censé interagir avec un régulateur négatif encore à identifier. Il est possible que la Cbl représente un régulateur pour ZAP-70. D'autres études, y compris l'identification des objectifs supplémentaires et des sites de liaison pour le domaine Cbl-TBP, des sites de phosphorylation *in vivo* de tyrosine dans des motifs de liaison SH2 sur Cbl, le rôle des domaines RING et leucine devrait aider à déterminer comment Cbl participe à la régulation de la signalisation des tyrosines kinases. Il est probable que ces enquêtes aideront à élucider les mécanismes d'activation cellulaire et la transformation oncogénique méditée par la machine des tyrosines kinases.

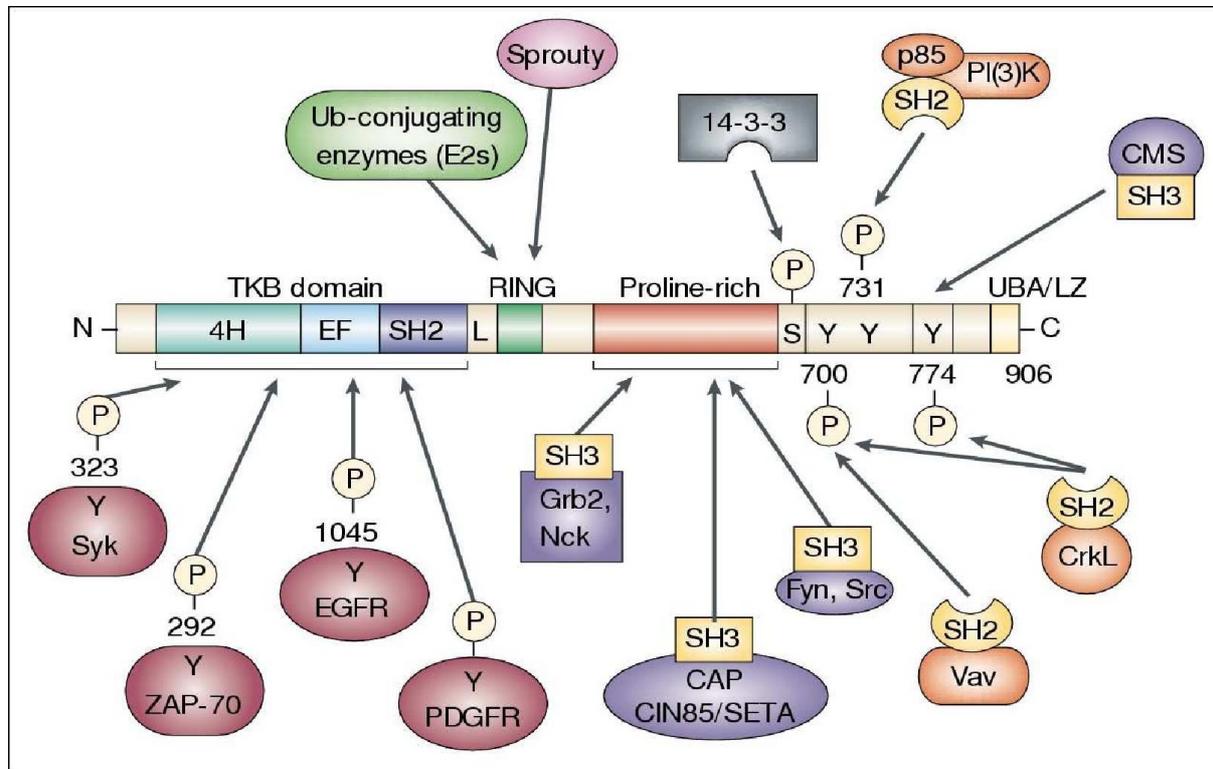


Figure 04 : Les interactions possibles des protéines Cbl (Thien et al, 2001)

I.7-Cbl dans les réseaux de signalisation oncogéniques :

Le premier membre de la famille Cbl a été isolé à partir d'un rétrovirus Cas-NS1 qui induit un lymphome (Casitas B-lineage lymphoma) issu de cellules préB et proB chez la souris. Cette forme, nommée v-Cbl, est une forme tronquée de la forme sauvage c-Cbl (Keane, M.M, 1995). Il a été proposé que les propriétés de transformation de v-Cbl sont dues à la concurrence avec la protéine sauvage pour la liaison au domaine TBP des effecteurs et empêcher le fonctionnement normal de la forme sauvage de Cbl. De même, d'autres formes de transformation de Cbl qui agissent dans un mode dominant négatif, et dans tous les cas étudiés, ils portent des délétions ou mutations au sein du domaine RING et / ou la région de liaison précédente. Cependant, certaines mutations du domaine RING de Cbl ne sont pas suffisantes pour promouvoir la transformation, même si elles abolissent à la fois l'ubiquitination et la régulation à la baisse des récepteurs à activité tyrosine kinase (Thien C. B., 2001). En outre, une mutation de perte de

Chapitre I: Les Protéines Cbl & Le Récepteur du facteur de croissance EGFR

fonction dans le domaine TKB (G306E), qui abroge la liaison à PTK activé, a été soulignée pour supprimer l'effet de transformation de v-Cbl (Bonita et al, 1997; Thien et Langdon, 1997).

Une autre variante oncogénique de c-Cbl, p95Cbl, récemment isolé à partir de la lignée cellulaire du sarcome murin de réticulum, J774, renforce le point de vue de la transformation médiée par Cbl, tout en causant la dérégulation de la signalisation PTK. p95 Cbl abrite une délétion de 111 acides aminés, comprend deux résidus critiques dans la région de liaison et l'ensemble du domaine ring et toute la région environnante. L'expression de p95 Cbl dans les cellules a abouti à l'acquisition de ces cellules l'indépendance à la croissance et à la perte des molécules d'ancrage et changement de morphologie ; caractéristiques de transformation cellulaire.

Cbl peut être convertie en une protéine oncogène par des délétions ou des mutations qui perturbent sa capacité à réguler vers la baisse les RTK (Figure. 05).

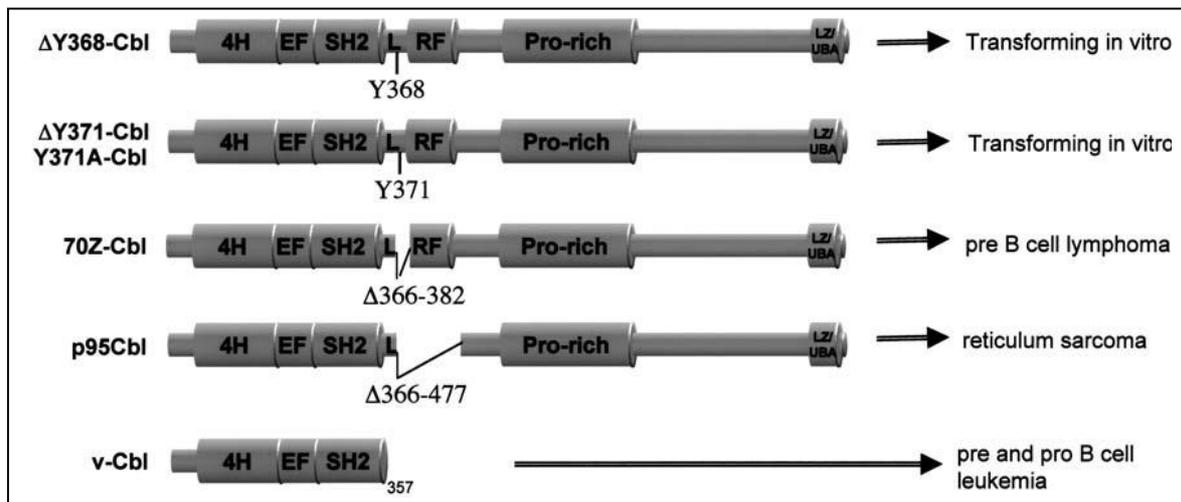


Figure 05 : Mutation de la protéine Cbl dans la région RING

En effet, la délétion du résidu Y368 qui se trouve dans la région RING fait, la perte de l'ubiquitination de l'EGFR et la transformation cellulaire , la suppression de C381 dans le domaine RING induit un défaut d'ubiquitination (Thien C. B., 2001). De plus, une délétion ou mutation de la tyrosine Y371 en alanine, mais pas mutation phénylalanine, induit l'oncogénicité de Cbl, probablement en perturbant la structure de la région de liaison (Andoniou C. E, 1994 ; Thien C. B., 2001). Un autre oncogène mutant d'origine naturelle 70ZCbl, présente une délétion de 17 acides aminés couvrant la région de liaison et le début du domaine ring (Andoniou C. E,

Chapitre I: Les Protéines Cbl & Le Récepteur du facteur de croissance EGFR

1994), tandis que la forme p95 Cbl isolée de la lignée cellulaire murin de sarcome J-774 comporte une deletion de 111 acides aminés, y compris le domaine RING (résidus 366-477) (Bisson S. A., 2002). Des cellules exprimant le mutant 70Z, mais pas v-Cbl, a montré une augmentation de 10 fois dans l'activité kinase de l'EGFR dans les cellules privées de sérum et lors de la stimulation du ligand (Thien C.B, 1997).

Les formes oncogéniques de Cbl sont non seulement impliquées dans la croissance cellulaire, mais aussi dans la survie cellulaire, l'invasion et les métastases. Les cellules exprimant le mutant oncogène Cbl DY371 ont un niveau accru de protéine Bcl-2 et sont protégés contre l'induction de l'apoptose (Hamilton E., 2001).

Au cours des pathologies myéloïdes, les mutations de CBL sont généralement de type faux-sens. Elles touchent habituellement les exons 8 et 9 codant pour le domaine RING et la région linker, et plus rarement l'exon 12 codant pour le domaine riche en proline. (Langdon, W.Y., 1989; Fiore F, 2001). Elles sont pour la plupart associées à une perte de l'activité E3 ubiquitine-ligase et probablement à une inhibition de CBL-b. Elles confèrent ainsi une capacité de croissance indépendante des cytokines. (Fiore F, 2001). Une homozygotie par disomie uniparentale acquise est fréquemment observée chez les patients porteurs de mutation de CBL. (Peschard P., 2001 ; Kim M., 1999) et plus rarement à celles activant la voie JAK-STAT.(Keane M. M., 1995)

Les mutations de CBL sont surtout associées aux formes frontières « syndrome myéloprolifératif (SMP)/myélodysplasique (SMP/SMD), où elles sont détectées dans 10-20% des cas (leucémie myélomonocytaire chronique (Keane M. M., 1999) leucémie myélomonocytaire juvénile, et leucémie myéloïde chronique atypique) (Langdon W. Y, 1989 ; Keane M. M, 1999). Elles ont toutefois été décrites au cours des SMP, mais avec une fréquence bien moindre : < 2% des polyglobulies de Vaquez et thrombocytémies essentielles et 0-6% des myélofibroses primitives. (Yoon C. H., 1995 ; Keane M. M, 1995) Les mutations de CBL semblent être préférentiellement liées aux phases avancées des SMP. Les mutations de CBL-b sont exceptionnelles. (Keane M. M., 1999).

I.8-Cbl une cible thérapeutique potentielle dans les cancers :

Les thérapies ciblées, anticorps monoclonaux et inhibiteurs de kinase, dirigées contre les récepteurs à activités tyrosine kinase et les protéines tyrosine kinase représentent un progrès majeur en cancérologie. Indépendamment de l'expression de la cible moléculaire, l'activité des thérapies ciblées est tributaire de la présence dans le tissu tumoral d'anomalies génétiques capables de perturber la signalisation cellulaire tumorale en aval des récepteurs. L'utilisation des biomarqueurs en pratique clinique permet d'adapter des traitements aux caractéristiques individuelles de chaque patient. A titre exemple La découverte de l'implication de la mutation *KRAS* dans la résistance aux anti-EGFR dans le cancer colorectal métastatique a marqué une étape importante dans la progression vers la médecine personnalisée en cancérologie. Il reste à développer de nombreux biomarqueurs, pour les protéine cbl mais également pour les autres thérapies ciblées et les chimiothérapies cytotoxiques, tant dans le domaine des prédictions de réponse que dans le domaine des prédictions de toxicité.

Les révolutions techniques que connaît actuellement la biologie moléculaire devraient permettre de mettre rapidement à disposition des cliniciens les moyens de choisir de manière rationnelle les thérapies ciblées, dont le nombre devrait augmenter extrêmement rapidement dans les prochaines années. Les techniques de protéomique évoluent rapidement vers une plus grande automatisation, et présentent des améliorations en termes de reproductibilité et de robustesse. Elles pourraient ainsi très rapidement satisfaire les critères requis pour le diagnostic clinique. Ces évolutions permettront de réaliser l'analyse intégrée des données de génétique constitutionnelle, de génétique somatique et des données fonctionnelles.

L'intérêt de l'évaluation de la fonctionnalité des voies de signalisation par analyse multiplexe des niveaux expression des formes phosphorylées des principales kinases intracellulaires des protéines Cbl sur échantillons de tumeurs. met en évidence l'impact d'anomalies génétiques tumorales sur la fonctionnalité des voies de signalisation RAS/RAF/MAPK et PI3K/AKT. L'approche de la recherche proposons est potentiellement transposable à l'étude des mécanismes de résistance diverses thérapies ciblées, inhibiteurs de tyrosines kinase ou anticorps monoclonaux, ciblant les voies de signalisation des RAS/RAF/MAPK et des PI3K/AKT.

En particulier, une anomalie de l'activité des protéines Cbl pourrait contribuer au processus tumoral puisqu'elles contrôlent l'ubiquitination et la dégradation de protéines ayant une activité

Chapitre I: Les Protéines Cbl & Le Récepteur du facteur de croissance EGFR

tyrosine kinase. Plusieurs travaux ont en effet montré que des formes mutées de Cbl agissent comme des oncogènes, conférant aux protéines Cbl un statut de suppresseurs de tumeur par leur régulation de la dégradation des protéines (Liu J, 2002).

Anti tumorale de Cbl in vivo résulte d'une diminution de la prolifération cellulaire et d'une augmentation de l'apoptose des cellules tumorales, par parallèle un effet d'une diminution de l'expression des récepteurs PDGFR, EGFR et FGFR2 (Odai H, 1995). Ces données récentes montrent que le rôle antitumoral de Cbl passe par l'ubiquitination et la dégradation de ces récepteurs membranaires. D'un point de vue thérapeutique, ceci suggère une possible stratégie ciblant c-Cbl dans les cancers associés à une activation des RTK. Il n'y a pas encore d'outils pharmacologiques permettant de favoriser spécifiquement l'activité ubiquitine ligase de Cbl. Une possibilité serait cibler des protéines adaptatrices qui interagissent avec Cbl et entrent en compétition avec les RTK (CIN85 [Cbl-interacting protein 85], Abl [Abelson leukemia viral oncogene], Grb2 [growth factor receptor-bound protein 2], FRS2 [fibroblast growth factor receptor substrate 2], etc.). Ainsi, moduler l'ubiquitination et la dégradation des récepteurs impliqués dans le développement tumoral en ciblant Cbl pourrait être une stratégie thérapeutique intéressante pour réduire la tumorigenèse dans ces cancers.

I.9.1-Récepteurs HER :

Les récepteurs du facteur de croissance épidermique humain ou Human Epidermal growth factor Receptors (HER) sont parmi les premiers oncogènes identifiés. Ils font partie de la superfamille des récepteurs à tyrosine kinase, répartis en 20 familles différentes (**Figure 06**).

Plusieurs récepteurs à tyrosine kinase sont des proto-oncogènes et sont de ce fait des cibles potentielles pour des thérapies anticancéreuses (**Hubert P, 2007**).

La famille des récepteurs HER comprend quatre récepteurs homologues : HER1 (Erb-B1, EGFR, Epidermal Growth Factor Receptor), HER2 (Erb-B2), HER3 (Erb-B3), et HER4 (Erb-B4) (**Figure 07**) qui partagent une grande homologie de structure primaire (40-45%). Ces récepteurs sont des récepteurs transmembranaires présentant un domaine N-terminal extracellulaire portant le site de fixation du ligand, un domaine transmembranaire et un domaine C-terminal intracellulaire qui porte l'activité tyrosine kinase.

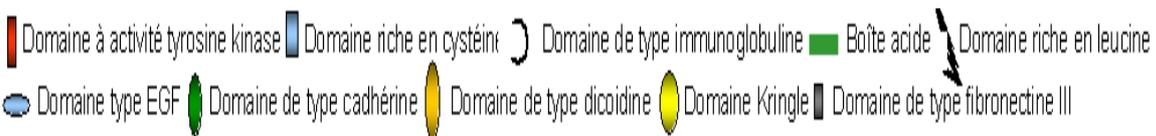
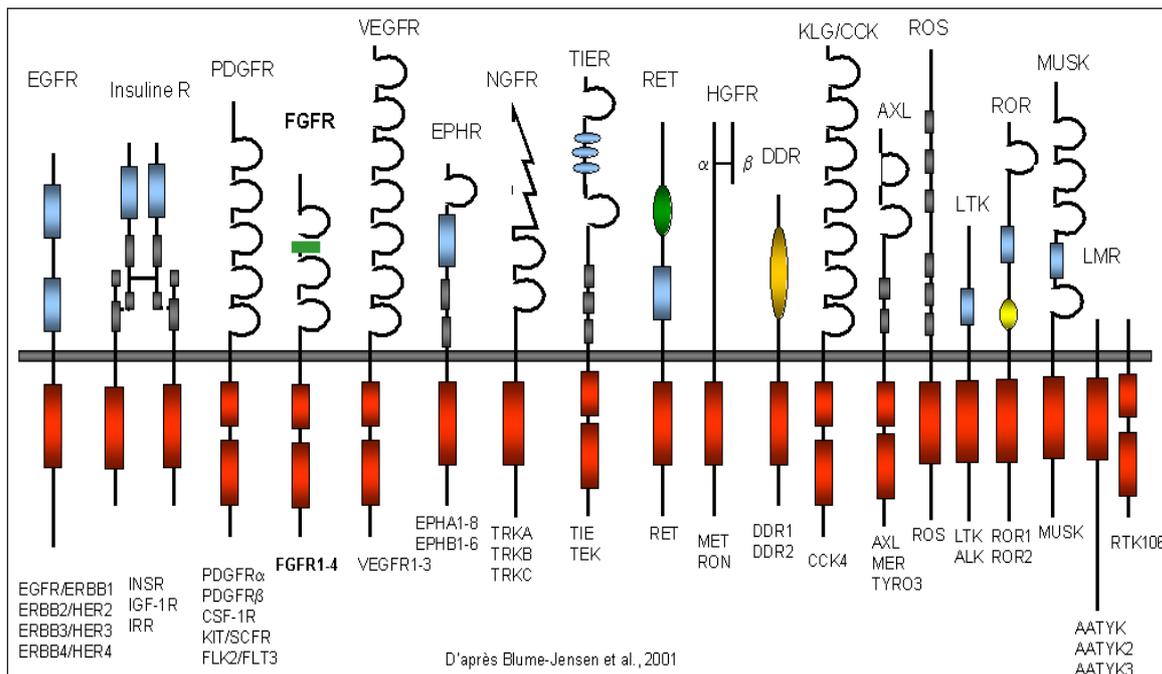


Figure 06 : Classification des récepteurs à activité tyrosine kinase, répartis en 20 familles différentes. (**Hubert P, 2007**).

Chapitre I: Les Protéines Cbl & Le Récepteur du facteur de croissance EGFR

Ces récepteurs sont exprimés à l'état physiologique dans de nombreux types de tissus d'origine épithéliale, mésenchymateuse ou encore neurale, dans lesquels ils jouent un rôle majeur dans le développement, la prolifération, la différenciation et le métabolisme cellulaire (Holbro T, 2004). Les récepteurs HER sont surexprimés ou présentent des mutations activatrices dans de nombreux types tumoraux. (Tableau 02)

Au cours de ces dernières années, l'étude de ces récepteurs a conduit à une meilleure approche biologique des mécanismes inhérents à la carcinogenèse ainsi qu'au développement de thérapies ciblées qui répondent à des besoins majeurs de spécificité (Azria D, 2006).

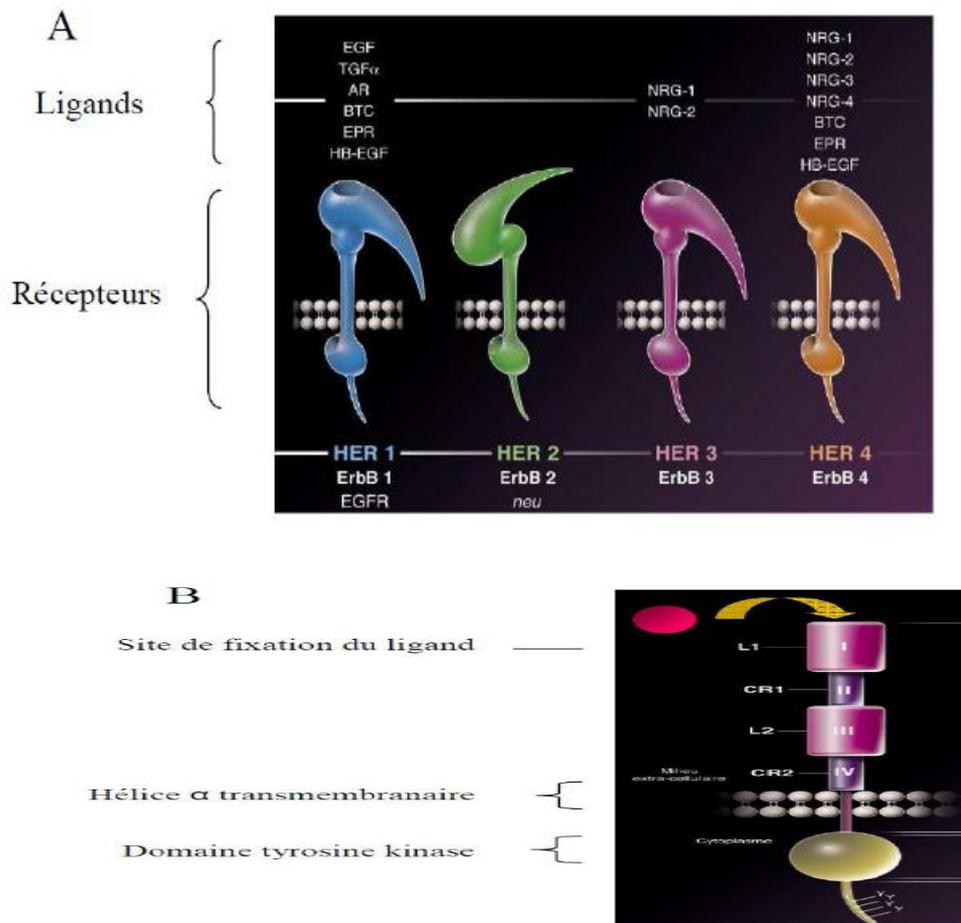


Figure 07: A: Famille des récepteur HER comprenant HER1 ou EGFR, HER2, HER3 et HER4. **B:** Structure des récepteurs HER: ces récepteurs sont des récepteurs transmembranaires présentant une partie extracellulaire portant le site de fixation du ligand, un domaine transmembranaire et un domaine intracellulaire qui porte l'activité tyrosine kinas

Chapitre I: Les Protéines Cbl & Le Récepteur du facteur de croissance EGFR

Tableau 02 : Fréquence des mutations et de l'amplification des récepteurs HER en fonction du type tumoral. D'après (Sergina N , 2007).

Gène	Pathologie	Altération	Fréquence
<i>EGFR</i>	Sein, autres	Amplification	5% dans les cancers du sein
	Glioblastomes	Délétion, amplification	40-50%
	Cancer du poumon non à petites cellules	Mutation domaine kinase	10% caucasiens 30-50% asiatiques
<i>HER2</i>	Sein	Amplification	25-30%
	Cancer du poumon non à petites cellules	Mutation domaine kinase	4%
<i>HER3</i>		Pas d'altération significative décrite	
<i>HER4</i>	Divers	Mutation du domaine kinase	1-2% Asie

I.9.2-Fonctionnement des récepteurs HER :

Les récepteurs HER à l'état monomérique sont normalement exprimés à la surface de la cellule. L'activation du récepteur nécessite sa dimérisation (homodimérisation ou hétérodimérisation), consécutive à la fixation du ligand. La fixation des ligands au récepteur a pour conséquence la stabilisation du domaine extracellulaire dans une conformation favorable à sa dimérisation avec un second monomère (**Figure 08**) (Sergina N , 2007). Cette activation est définitive ; sans mécanisme de déphosphorylation actuellement connu, l'activité tyrosine-kinase du récepteur peut se poursuivre indéfiniment. Le récepteur peut être internalisé et être dégradé par la voie lysosomiale ou recyclé et ré-exprimé à la surface membranaire.

Cette dimérisation permet la transphosphorylation du domaine kinase intracellulaire au niveau de résidus tyrosine, permettant ainsi le recrutement de molécules de signalisation et l'activation des voies de signalisation. Il peut s'agir d'une homo- ou d'une hétérodimérisation.

Chapitre I: Les Protéines Cbl & Le Récepteur du facteur de croissance EGFR

Ce système d' homo et hétérodimérisation confère aux récepteurs HER un haut degré de complexité. D'autre part, différentes combinaisons de récepteurs peuvent aboutir à des réponses biologiques variables (Cai W, 2008). Les homodimères d'EGFR ou d'HER2 entraînent un signal d'intensité modérée, les homodimères d'HER3 ne permettent pas de transduction du signal. Les hétérodimères entraînent un signal d'intensité plus forte que les homodimères (Amin DN, 2010). Les hétérodimères contenant HER2, et plus particulièrement les dimères HER2-HER3 sont les plus actifs (Sergina N, 2007).

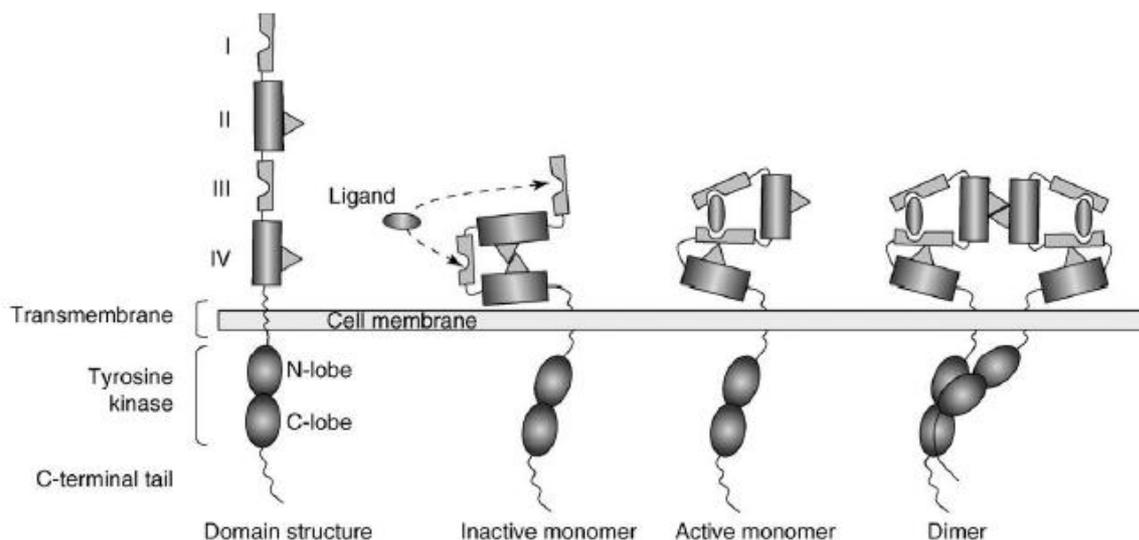


Figure 08 : Mode d'activation des récepteurs HER. Le domaine extracellulaire est composé de quatre domaines, I, II, III et IV. Les domaines I et III sont des sites de fixation du ligand. Les domaines II et IV sont des domaines riches en cystéine permettant l'interaction entre les monomères. Le domaine tyrosine kinase intracellulaire présente une homologie avec les autres membres de la famille des récepteurs à tyrosine kinase. Le domaine C-terminal est riche en résidus tyrosine qui correspondent aux sites de phosphorylation. En l'absence de ligand, le récepteur est inactif et le domaine extracellulaire est replié dans une conformation permettant l'interaction des domaines II et IV. La fixation d'un ligand sur le monomère permet le rapprochement des domaines I et III, exposant ainsi le domaine II, interface de dimérisation. Les domaines de dimérisation de deux récepteurs peuvent alors interagir, ce qui a pour conséquence un rapprochement des domaines kinase, et l'induction de leur transphosphorylation. (Sergina N, 2007).

Chapitre I: Les Protéines Cbl & Le Récepteur du facteur de croissance EGFR

Cette diversité de possibilités de dimérisation, ainsi que la diversité des ligands et de couplage à des protéines de signalisation en aval de ces récepteurs permet une large gamme de possibilités quant aux conséquences de l'activation de ces récepteurs. La multiplicité des récepteurs HER chez les mammifères pourrait avoir un rôle de modulation du signal. Ceci peut s'illustrer par l'existence de HER2 et HER3, dont la fonctionnalité est incomplète.

Chaque récepteur présente un rôle précis au cours du développement, contrairement aux autres membres des familles de récepteurs à activité tyrosine kinase, qui sont caractérisés par des redondances parmi les différents membres de ces familles (**Sergina N , 2007**). La sélectivité dans l'engagement dans une voie de signalisation est différente selon les séquences intracellulaires de chaque membre de la famille HER. EGFR et HER4 présentent la plus grande diversité d'effecteurs intracellulaires. HER2 présente peu de diversité quant à ses possibilités d'interaction avec des protéines intracellulaires ; HER3 présente également peu d'effecteurs mais est caractérisé par un grand nombre de sites de fixation pour la sous-unité régulatrice p85 de PI3K. En revanche, chaque membre de la famille présente des sites de fixation pour la protéine adaptatrice Grb2 (Growth factor receptor binding protein 2) et peut potentiellement activer la voie des RAS/RAF/MAPK (**Sergina N , 2007**).

Les récepteurs HER peuvent également être transloqués au niveau nucléaire et induire l'expression de nombreux gènes impliqués dans la progression tumorale tels que la cycline D1 ou encore la voie de iNOS/NO (inductible NO synthase/ Nitric Oxide) et de la COX2 (cyclooxygénase 2) (**Wieduwilt MJ, 2008**).

L'activation des récepteurs HER par les ligands peut se faire de manière juxtacrine, autocrine, paracrine ou endocrine. La diversité des ligands capables d'activer les récepteurs HER a augmenté au cours de l'évolution (**Singh AB, 2005**). Il existe de nombreux ligands spécifiques des récepteurs HER, qui présentent tous un domaine EGF (Epidermal Growth Factor) -like qui leur confère leur spécificité de liaison (**Holbro T , 2003**). Ces ligands se divisent en trois groupes en fonction de leur affinité pour les différents récepteurs: le premier groupe se compose de l'EGF, l'amphiréguline et du TGF α , qui se lient spécifiquement à EGFR ; l'affinité d'EGFR pour l'EGF peut être modulée par la présence de HER2 et HER3 (**Singh AB, 2005**). La β -celluline, l'héparinbinding EGF et l'épiréguline font partie du second groupe et se lient à EGFR et HER4. Le troisième groupe se compose des neurégulines 1 à 4, qui présentent une affinité

Chapitre I: Les Protéines Cbl & Le Récepteur du facteur de croissance EGFR

pour les récepteurs HER3 et HER4. Il n'existe aucun ligand identifié pour HER2 (**Figure 09**) (**Robert J, 2010**).

Ces ligands sont synthétisés sous forme de précurseurs ancrés dans la membrane. Leur activation est consécutive à leur clivage par des métalloprotéases, générant ainsi des ligands solubles d'environ 55 acides aminés (**Singh AB, 2005**). Le clivage de la partie extracellulaire est effectué par une famille de protéines, les A Disintegrin and Metalloproteinase (ADAM). Une fois clivée, la partie C-terminale du précurseur est transloquée dans le noyau et induit la prolifération cellulaire par activation du gène de la cycline A et c-myc (**Kataoka H, 2009**).

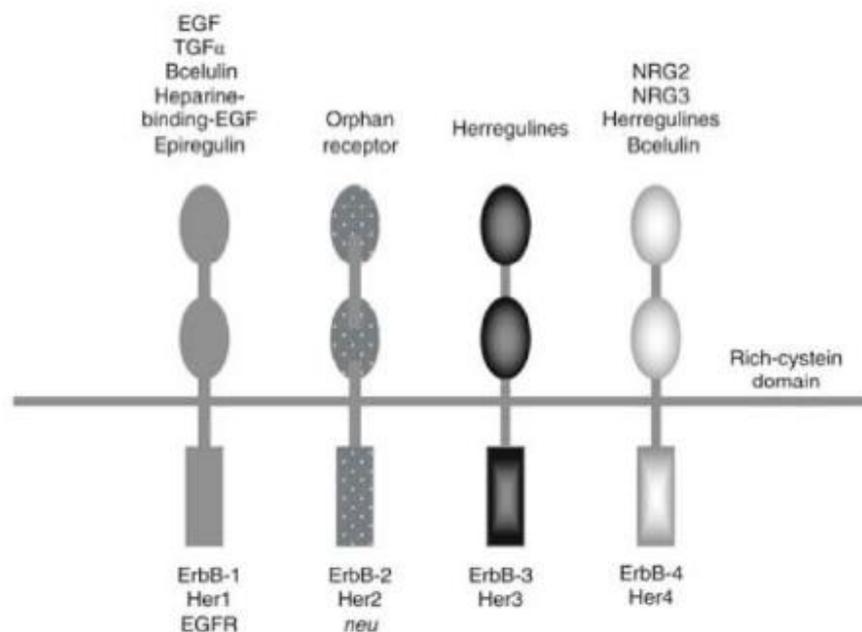


Figure 09 : Principaux ligands responsables de l'activation des récepteurs HER. Ces ligands présentent tous un domaine EGF-like qui leur confère leur spécificité de liaison. Ces ligands se divisent en trois groupes en fonction de leur affinité pour les différents récepteurs: Il n'existe aucun ligand identifié pour HER2 (**Kataoka H, 2009**).

Plusieurs études mettent en évidence l'importance de ces phénomènes d'activation des précurseurs de ces ligands dans la prolifération et la migration cellulaires (**Dong J,1999**) et font de ces protéases des cibles thérapeutiques potentielles (**Kataoka H, 2009**).. Dans certaines

Chapitre I: Les Protéines Cbl & Le Récepteur du facteur de croissance EGFR

circonstances, les précurseurs membranaires sont capables d'activer les récepteurs HER sans protéolyse préalable (**Singh AB, 2005**).

I.9.3- HER1 ou EGFR :

EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) fut le premier récepteur à tyrosine kinase caractérisé (**Singh AB, 2005**). Ainsi que l'un des premiers proto-oncogènes identifiés. EGFR présente un rôle physiologique préférentiel dans le développement des tissus d'origine épithéliale, contrairement aux récepteurs HER2, HER3 et HER4 qui présentent un rôle dans le développement des tissus nerveux et musculaires squelettiques (**Singh AB, 2005**). L'activation d'EGFR a pour conséquences une augmentation de la prolifération cellulaire, de la motilité cellulaire, et une diminution de l'apoptose. EGFR joue également un rôle dans le phénomène de transition épithélio-mésenchymateuse, dans la régulation des métalloprotéases matricielles, du VEGF-A et probablement un rôle dans le maintien des cellules souches (**Dong J,1999**), ainsi que dans les phénomènes d'angiogenèse tumorale. En clinique, la surexpression d'EGFR est associée à un pronostic péjoratif ainsi qu'à un risque accru de diffusion métastatique (**Spindler KL, 2006**).

Indépendamment de son activité kinase, EGFR aurait également un rôle dans la stabilisation des transporteurs du glucose SGLT1, favorisant la survie cellulaire par inhibition des phénomènes d'autophagie (**Ozcan F, 2006**).

La forme membranaire d'EGFR peut, comme tous les récepteurs de la famille HER, s'homodimériser ou s'hétérodimériser, préférentiellement avec HER2 et HER3, très exceptionnellement avec HER4. On peut distinguer deux sous-types de récepteur en fonction de leur affinité, haute (10% du pool d'EGFR) ou basse (90% du pool d'EGFR), pour l'EGF (**Schlessinger J,2002**).

L'activation des voies de signalisation en aval d'EGFR est variable en fonction du sous-type de récepteur stimulé. La fixation des ligands sur les récepteurs à haute affinité active les voies des RAS/RAF/MAPK et PI3K/AKT, tandis que la fixation des ligands sur les récepteurs à basse affinité a pour conséquence l'activation des voies STAT (Signal Transducer and Activator of Transcription) et PLC γ /PKC (Phospholipase C γ / Proteine kinase C). L'existence de récepteurs avec différentes propriétés de signalisation a pour conséquence une variation qualitative dans la réponse d'EGFR à sa stimulation par un même ligand en fonction de ses concentrations (**Krall JA, 2011**).

Chapitre I: Les Protéines Cbl & Le Récepteur du facteur de croissance EGFR

Il existe également une fonction nucléaire d'EGFR. Découverte récemment, la fraction intranucléaire d'EGFR permet l'activation directe de la transcription de gènes codant des protéines impliquées dans le cycle cellulaire (cycline D1) et dans l'inflammation (COX-2). La localisation nucléaire d'EGFR est de mauvais pronostic dans les cancers du sein, des voies aérodigestives supérieures ainsi que dans les cancers de l'ovaire, et pourrait également avoir un impact sur la réponse aux traitements par chimiothérapie et par thérapies ciblées (**Lo HW, 2010**). Des modèles *in vivo* ont confirmé que certaines mutations d'EGFR sont tumorigènes, mais nécessitent la mutation d'autres gènes impliqués dans le cycle cellulaire. Ainsi EGFR joue un rôle majeur dans l'acquisition du phénotype malin et dans la progression tumorale, notamment en ce qui concerne l'oncogénèse colorectale. Considérant son importance majeure dans l'oncogénèse, ainsi que sa fréquence de surexpression dans de nombreux types tumoraux (**Tableau 03**) ce récepteur constitue une cible thérapeutique de choix, en particulier dans les cancers colorectaux et les cancers des voies aérodigestives supérieures (**Penault-Llorca F, 2005**). Plusieurs molécules ciblant EGFR appartenant à la classe des anticorps monoclonaux (cétuximab (Erbix®), panitumumab (Vectibix®)) et des inhibiteurs de tyrosine kinase (géfitinib (Iressa®), erlotinib (Tarceva®), lapatinib (Tyverb®)) disposent actuellement d'une AMM (Autorisation de Mise sur le Marché) (**Figure 10**). Une vingtaine d'autres molécules ciblant EGFR est actuellement en cours de développement.

EGFR présente des mutations ponctuelles ou des délétions au niveau de son domaine kinase dans 10 à 15% des cancers du poumon non à petites cellules chez les caucasiens, et 30 à 50% (**Lo HW, 2010**).

Chez les asiatiques. Ces mutations ont pour conséquence une augmentation de l'activité kinase du récepteur, pouvant aller jusqu'à l'activation constitutive du récepteur, indépendamment de la fixation de son ligand. Les mutants d'EGFR transforment les fibroblastes *in vitro* et *in vivo*. Dans le cancer colorectal, ces mutations sont rares.

Chapitre I: Les Protéines Cbl & Le Récepteur du facteur de croissance EGFR

Plusieurs modes d'activation oncogénique d'EGFR ont été décrits (Moon C, 2010).

- augmentation de l'expression d'EGFR par divers mécanismes : augmentation de la transcription, stabilisation au niveau membranaire par inhibition de son internalisation ou de sa dégradation, ou encore amplification du gène.
- mutations d'EGFR ayant pour conséquence l'expression d'une forme du récepteur constitutionnellement active ; on distingue des mutations dans des domaines codant la partie extracellulaire du récepteur (EGFRvIII) ou sa partie intracellulaire (mutation T790M)

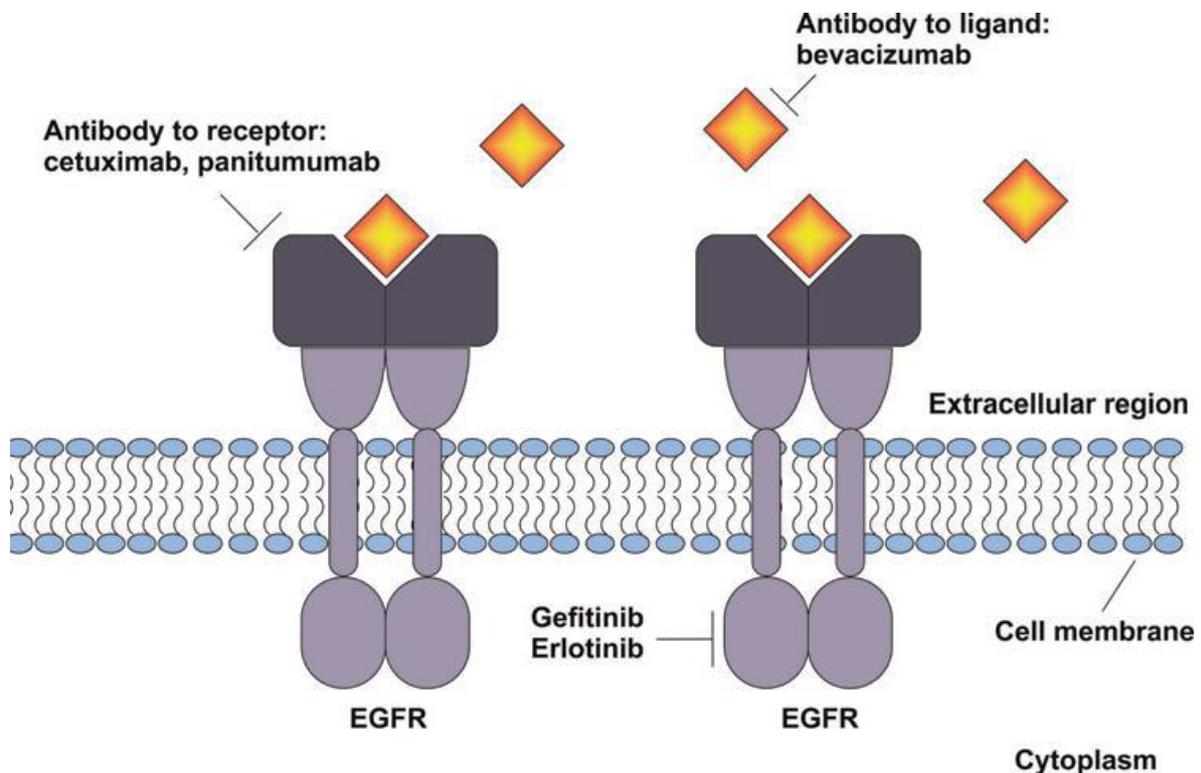


Figure 10 : Les inhibiteurs d'EGFR présentent une action extracellulaire (anticorps monoclonaux : cétuximab et panitumumab) ou intracellulaire (inhibiteurs de tyrosine kinase : géfitinib et erlotinib). (Moon C, 2010).

Chapitre I: Les Protéines Cbl & Le Récepteur du facteur de croissance EGFR

- augmentation chez les asiatiques. Ces mutations ont pour conséquence une augmentation de l'activité kinase du récepteur, pouvant aller jusqu'à l'activation constitutive du récepteur, indépendamment de la fixation de son ligand. Les mutants d'EGFR transforment les fibroblastes *in vitro* et *in vivo*. Dans le cancer colorectal, ces mutations sont rares.

Plusieurs modes d'activation oncogénique d'EGFR ont été décrits (**Pines G, 2010**):

- augmentation de l'expression d'EGFR par divers mécanismes : augmentation de la transcription, stabilisation au niveau membranaire par inhibition de son internalisation ou de sa dégradation, ou encore amplification du gène
- mutations d'EGFR ayant pour conséquence l'expression d'une forme du récepteur constitutionnellement active ; on distingue des mutations dans des domaines codant la partie extracellulaire du récepteur (EGFRvIII) ou sa partie intracellulaire (mutation T790M)
- augmentation de l'expression des ligands (TGF α)
- autoactivation par une boucle autocrine

L'impact de ces mutations sur la réponse thérapeutique aux thérapies ciblées anti-EGFR sera détaillé ultérieurement. EGFR est également impliqué dans les phénomènes de résistance à la radiothérapie ainsi qu'à l'hormonothérapie (**Penault-Llorca F, 2005**)

Tableau 2 : Surexpression d'EGFR en fonction des tissus (**Penault-Llorca F, 2005**).

Tissus	Surexpression d'EGFR (%)	Référence
Cancer des voies aérodigestives supérieures	80-100	(41-43)
Cancer colorectal	70-90	(44)
Cancer du poumon non à petites cellules	40-80	(45)
Cancer de l'estomac	20-80	(46, 47)
Cancer du pancréas	30-90	(48)
Cancer du sein	15-90	(49)
Cancer de l'ovaire	35-70	(50)
Cancer du rein	50-90	(51)
Gliomes	40-50	(52, 53)
Cancer de la prostate	40-80	(54)
Cancer du col de l'utérus	80-100	(55)

Partie I:

Chapitre II:

Cancer Gastrique

II.1- Généralités sur le cancer gastrique :

Les tumeurs malignes de l'estomac constituent un volet important de la pathologie cancérologique du tube digestif. Selon la classification de Siewert, le cancer de l'estomac est défini par une tumeur épithéliale maligne dont le centre est à plus de 2 cm en dessous de la jonction œsogastrique (**Figure 11**). On doit le distinguer des cancers du cardia, dont l'atteinte est située en bas de cette limite. Son développement est dans un premier temps locorégional avant de s'étendre au niveau du péritoine, les ganglions et en fin la diffusion par des métastases. (**Mutter.P, 2006**)

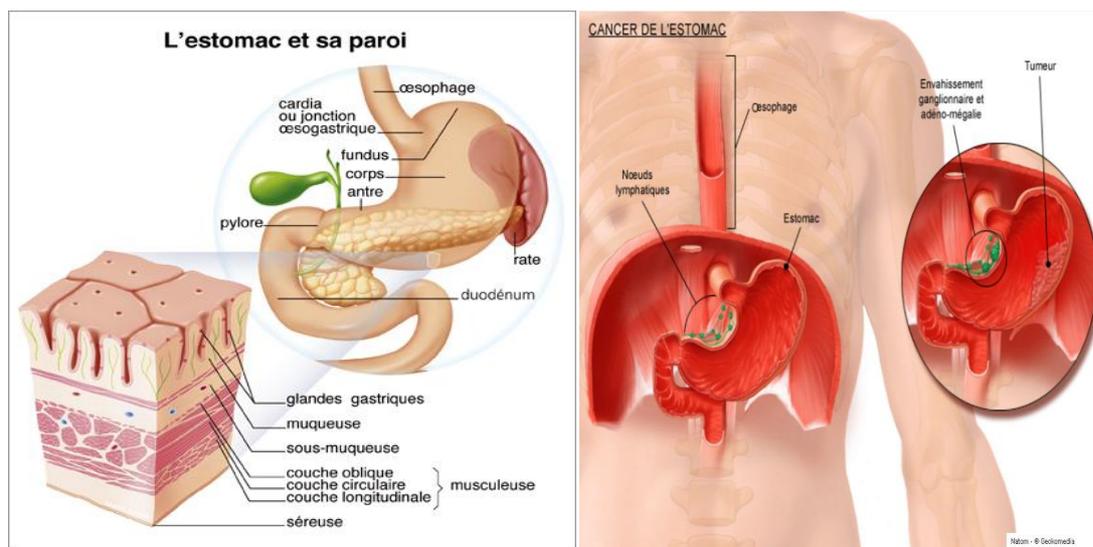


Figure 11 : Anatomie de l'estomac (Mutter.P, 2006)

II.2- Fréquence du cancer gastrique :

Le cancer de l'estomac reste fréquent avec environ 9.000 nouveaux cas par an. Il se situe au cinquième rang des cancers en France et représente la deuxième cause de mortalité par cancer dans le monde (**Dalley M, 2007 ; Lasser P.H, 2002**)

Son incidence est variable d'un pays à un autre. Il existe des zones à forte incidence comme le Japon (128 cas/ 100000 hab/an), l'Amérique du sud et l'Amérique du centre, et des zones à faible incidence comme l'Europe de l'Ouest, les pays scandinaves et l'Amérique du Nord

Chapitre II: Cancer Gastrique

(24 cas/100 000 hab/an). Au Maroc, le carcinome gastrique représente 3,1% de tous les cancers et 33% des cancers digestifs (**Barkun.A, 2003**). En Algérie, le cancer de l'estomac se situe au cinquième rang après le cancer des poumons, colo-rectales, vessie et la peau (**Registre des tumeurs d'Alger, 2006**)

Le cancer de l'estomac est rare avant l'âge de 50 ans mais le risque augmente avec l'âge et plus rapidement chez l'homme que chez la femme (**Faivre. J, 1997**). L'âge moyen de survenue de ce cancer est de 60 ans. Le sex ratio est de 2 à 3. La survie à 5 ans est de 10 à 15%. 80% des cas sont diagnostiqués après l'âge de 65 ans. Les deux tiers le sont à un stade avancé (**Scolle. F, 2008**). Selon les principales données du registre des tumeurs d'Alger, chez l'homme le taux d'incidence standardisé est de 6,1 ; Tandis que chez le sexe féminin le taux est de 2,7 (**Barkun.A, 2003**)

II.3-Facteurs de risque :

La carcinogénèse gastrique fait intervenir de nombreux facteurs de risque, certains de ces facteurs agissant à un stade précoce et d'autres à un stade tardif :

II.3.1-Age et niveau socio-économique : Les personnes les plus exposées au cancer de l'estomac sont les hommes âgés de plus de 50 ans, qu'ils soient d'origine urbaine ou rurale. En revanche, l'incidence est plus élevée dans les classes sociales défavorisées (**Faivre.J,1998 ; Songun I, 2010**)

II.3.2-Lésions précancéreuses : Un grand nombre de lésions, tumorales et inflammatoires, a été reconnu comme facteur prédisposant :

a-La gastrite chronique atrophiante : elle se comporte comme un précurseur incontestable du carcinome gastrique. Le risque en est quadruplé quand la gastrite chronique s'associe à une anémie pernicieuse (**Barkun.A, 2003 ; Dieumegard.B, 1999**)

b-L'ulcère gastrique chronique : le risque de carcinogénèse sur un ulcère chronique est diversement appréhendé, compte tenu de l'ancienneté des séries mais aussi de la notion même de

« l'ulcère transformé ». Le risque de cancer gastrique est multiplié par deux en cas d'ulcère gastrique (Barkun.A, 2003 ; Aisse.L, 2002) (Figure 07)

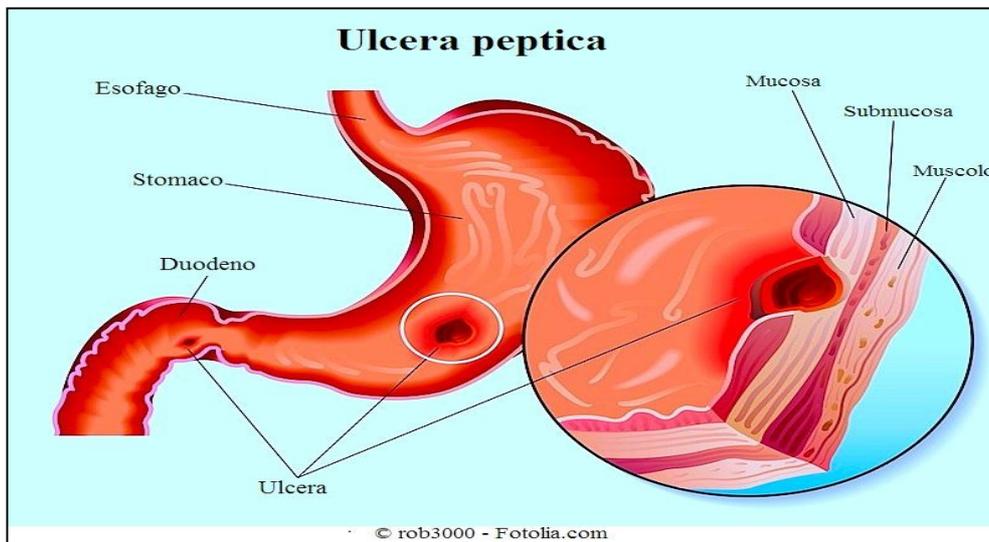


Figure 12 : Ulcère gastrique (Barkun. A, 2003)

d- La métaplasie intestinale : elle est caractérisée par la transformation de la muqueuse gastrique en des cellules semblables à celles de l'intestin grêle ; elle est souvent associée au cancer de l'estomac. La métaplasie intestinale incomplète de type III, est un indicateur élevé du cancer de l'estomac (Aisse.L, 2002).

e-L'estomac opéré : chez les sujets ayant subi une gastrectomie au-delà de quinze ans, le risque de survenue du cancer gastrique est multiplié par deux (Faivre.J, 1997).

f-Les autres lésions précancéreuses : polypes adénomateux, maladie de Biermer, maladie de Ménétrier. Ces pathologies sont à l'origine de 1 à 2% des cancers de l'estomac (Dieumegard. B, 1999)

II.3.3-L'hélicobacter pylori (HP) : (Figure 13)

Le risque du cancer de l'estomac est 6 fois plus élevé chez les sujets présentant une infection à HP. (Faivre.J, 1997) . Elle est la seule bactérie reconnue et classée comme carcinogène par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS). Hélicobacter pylori (HP) dans l'antra gastrique humain. Elle provoque une prolifération des follicules lymphoïdes au sein de la muqueuse gastrique, alors que celle-ci en est normalement dépourvue et constitue la première étape dans

Chapitre II: Cancer Gastrique

l'apparition d'un lymphome B gastrique de faible malignité type MALT (mucosae associated lymphoid tissue). L'éradication de cette bactérie entraînerait une régression de ce type de lymphome dans 90 à 100 % des cas. Il existe une relation entre le cancer gastrique et HP; ceci par l'intermédiaire de la gastrite chronique, l'atrophie gastrique, la métaplasie intestinale et la dysplasie aboutissant à l'apparition du cancer. L'hypochlorhydrie favorise la pullulation microbienne et par conséquent la formation de nitrosamines carcinogènes (Aisse.L, 2002)..

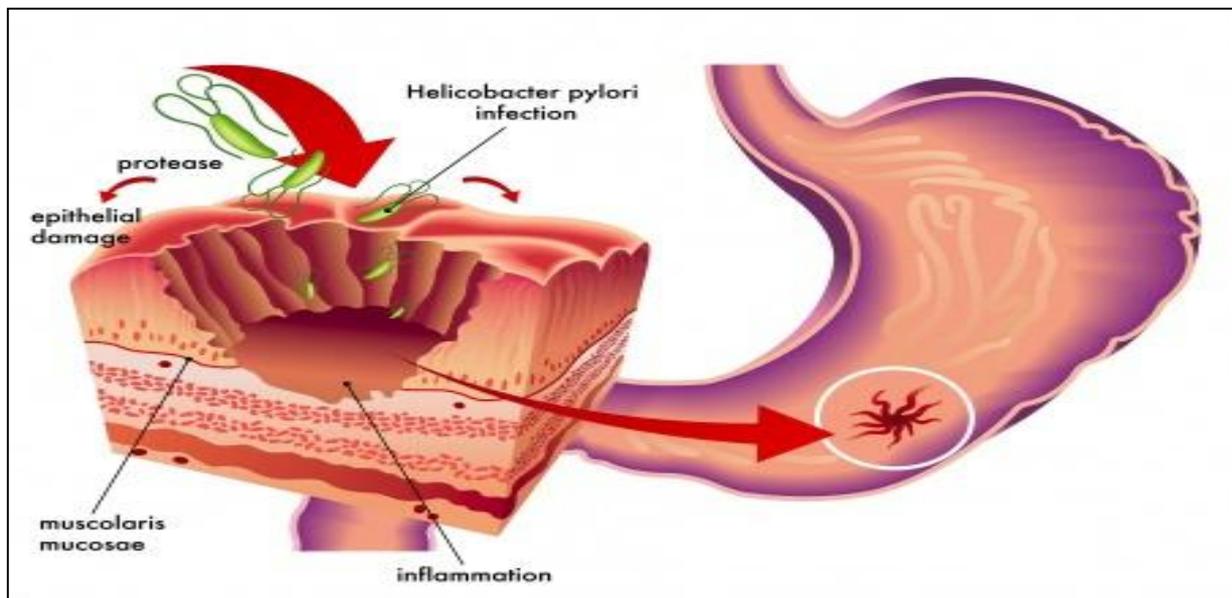


Figure 13: Ulcère gastrique induit par *Helicobacter Pylori* (HP+) (Barkun. A, 2003)

II.3.4-Facteurs environnementaux et alimentaires :

Ils sont très impliqués dans la genèse du cancer gastrique par exemple le sel est fortement suspecté. Plusieurs enquêtes cas-témoins ont fait apparaître que les sujets atteints du cancer de l'estomac ont une alimentation plus riche en sel que les témoins, notamment en aliments salés et fumés. Le tabac et l'alcool ne sont pas des facteurs étiologiques essentiels, mais plusieurs études de cas-témoins ou de cohortes suggèrent qu'une forte consommation de ces produits augmente le risque de cancer gastrique (Faivre.J, 1998 ; Songun I, 2010)

Le rôle protecteur des fruits et légumes est le mieux établi. Le risque est diminué de moitié chez les grands consommateurs de légumes et de fruits par rapport à ceux qui en consomment le

moins. Ce rôle protecteur semblerait se faire grâce à la présence de la vitamine C et du Bêta-carotène contenus dans ces produits alimentaires (**Martun L, 2009**).

II.3.5-Facteurs génétiques :

La recherche de prédispositions familiales est recommandée (antécédents familiaux, survenue avant 40 ans) afin de poser l'indication d'une consultation génétique.

a. Adénocarcinomes gastriques diffus héréditaires :

Les cancers gastriques diffus héréditaires sont dus à une mutation germinale à transmission autosomique dominante, responsable de la perte de fonction de la protéine E Cadhérine. Le diagnostic doit être évoqué dans une même famille et sur au moins deux générations successives. En cas de suspicion d'une forme héréditaire, le patient sera adressé en consultation génétique (**Martun L, 2009**).

b. Adénocarcinomes gastriques survenant dans le cadre de syndromes familiaux :

Le risque de cancer gastrique est augmenté chez :

- les apparentés au premier degré de malades ayant un cancer de l'estomac.
- les patients ayant un syndrome (cancer colorectal non polyposique familial) ou syndrome de Lynch
- les patients atteints de polypose adénomateuse familiale.

Même si le risque de cancer gastrique n'est pas au premier plan, il est recommandé dans ces 3 situations de chercher systématiquement *H. pylori* (le plus souvent lors d'une endoscopie digestive haute) et de l'éradiquer s'il est présent (**Martun L, 2009**)

II.4-Anatomopathologie du cancer gastrique:

L'anatomie pathologique a un apport important dans la prise en charge du cancer de l'estomac; elle a un apport diagnostique par le biais des biopsies réalisées lors des endoscopies, et un apport pronostique par le biais de l'étude des pièces d'exérèse chirurgicale (**Irakia, 2004**).

II.4.1-Siège de la tumeur :

Les cancers les plus fréquents (60%) sont les cancers antro-pyloriques responsables d'une sténose pylorique. Le cancer du cardia (jonction œsogastrique) est responsable de dysphagies précoces. Il a un mauvais pronostic (**Pan, 2004**). Les formes diffuses sont plus rares.

II.4.2-Aspects macroscopiques :(Rubib BP, 2006)

Les cancers gastriques sont habituellement invasifs et plus rarement superficiels

a-Cancers superficiels : est un sous-groupe présentant un excellent pronostic. Il se définit comme un cancer limité à la muqueuse avec extension possible à la sous muqueuse avec ou sans métastase ganglionnaire.

b-Cancers invasifs : La classification de Bormann, bien qu'ancienne, reste en fait la plus utilisée. On distingue 4 types macroscopiques :

Type I : Végétant.

Type II : Végétant et ulcéré.

Type III : Infiltrant et ulcéré.

Type IV : Infiltrant

II.4.2-Aspects microscopiques :

a-Tumeurs épithéliales :

a.1-Classification OMS :

Plus de 90% des cancers de l'estomac sont des adénocarcinomes.

La classification OMS repose sur des données cytologiques et architecturales. On distingue **(Potet.F, 2006)**

- L'adénocarcinome papillaire
- L'adénocarcinome tubule
- L'adénocarcinome mucineux (ou colloïde muqueux)
- L'adénocarcinome à cellules indépendantes

a.2-Classification de LAUREN et variante de MULLIGAN :

Cette classification, inclut à la fois des critères histologiques et architecturaux et des critères selon le mode d'extension **(Rejchrt S, 2005)**.

Deux formes sont distinguées :

- **La forme intestinale :** elle présente la structure d'un adénocarcinome tubulé ou papillaire bien différencié à architecture compacte bien limitée en périphérie. **(Figure 14)**

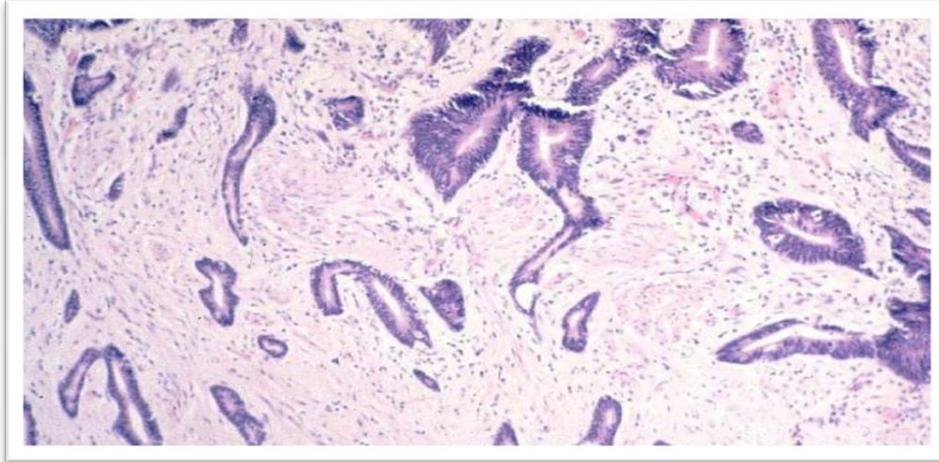


Figure 14 (A) : Adénocarcinome de type intestinal GRX20 (Lauran.P, 2006)

- **La forme diffuse :** est surtout faite de cellules indépendantes muco-sécrétantes. Elle est mal limitée et son pronostic est plus mauvais (Figure 14).

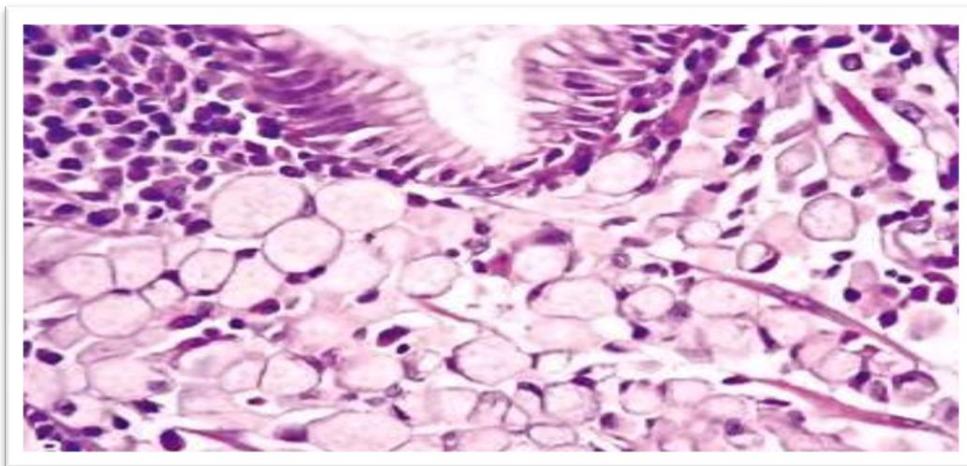


Figure 14 (B): Adénocarcinome de type diffus GR 40X (à cellules en bague à chaton) (Lauren.P, 2006)

a.3-Classification de MING : (Afuwape O, 2011)

Elle est basée sur des critères architecturaux et distingue 2 formes :

- **La forme expansive** : caractérisée par une architecture massive repoussant les tissus voisins.
- **La forme infiltrante** : caractérisée par une infiltration diffuse, très mal limitée à sa périphérie et dissociant les tissus non tumoraux

a.4-Classification de GOSEKI : (Goseki. N, 2005)

Le mucus sécrétés par les cellules tumorales semblerait avoir un caractère ayant une influence sur le mode d'extension du cancer et les récives.

On distingue 4 groupes :

- Cancers tubulaires pauvres en mucus.
- Cancers tubulaires riches en mucus.
- Cancers peu différenciés pauvres en mucus.
- Cancers peu différenciés riches en mucus.

b- Autres types anatomopathologiques (Glehen O, 2000)

b.1 -Carcinome adéno-squameux : plus fréquent au niveau du cardia, il assure un contingent adénocarcinomeux épidermoïde.

b.2 -Carcinome hépatoïde : les cellules tumorales ressemblant à des hépatocytes et expriment les alpha-foeto-protéines, son pronostic est défavorable.

b.3 -La linite gastrique: C'est un Adénocarcinome peu ou indifférenciée, qui a toujours une composante de cellules atypiques, soit de type anaplasique, soit de type mucipare, appelées cellules "en bague à chaton", mêlées à des éléments inflammatoires envahissant la paroi gastrique jusqu'à la séreuse sans la détruire, au sein d'une intense réaction fibreuse du stroma. Lorsque cette tumeur envahit la totalité de l'estomac, l'aspect macroscopique est caractéristique transformant la totalité de l'estomac en un tube rigide, à parois épaissies, blanchâtres, induré. **(Figure14).**



Figure 14 (C): la limite plastique (Marcaton, 2005).

B.4-Tumeurs neuro-endocrines (TNE) : Elles représentent 5% des carcinoïdes digestifs, macroscopiquement, unique et bien limitée. Leur diagnostic est difficile.

B.5-Tumeurs stromales : Développées à partir de cellules conjonctives. Les tumeurs conjonctives gastriques regroupent un ensemble disparate de tumeurs pour lesquelles il est souvent difficile de trancher entre la bénignité et la malignité (Marcaton, 2005).

B.6-Les lymphomes gastriques : Ce sont en règle des lymphomes non-hodgkiniens, développés à partir de cellules lympho ides B. (Figure 15)

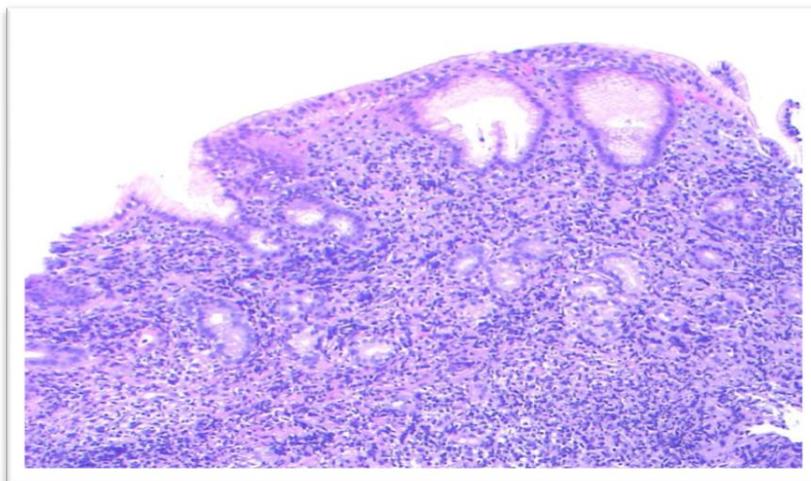


Figure 15: Les lymphomes gastriques GR 20X (Pan H.M, 2004)

On distingue : (Pan H.M, 2004)

- Les lymphomes de haut grade de malignité.
- Les lymphomes de type MALT de bas grade de malignité : L'infection à *Helicobacter pylori* serait à l'origine de ces lymphomes. Ils évoluent lentement et restent longtemps localisés à l'estomac.

II.4.3-Stades du cancer de l'estomac (Greene FL, 2003)

La classification est une façon de décrire ou de classer un cancer selon l'étendue de la maladie dans l'organisme. Le système le plus fréquemment utilisé pour le cancer de l'estomac est la classification TNM. L'Union internationale contre le cancer (UICC) utilise la classification TNM pour décrire l'étendue de nombreuses tumeurs cancéreuses solides

TNM signifie Tumeur, Nodes (terme anglais pour les ganglions lymphatiques) et Métastases. La classification TNM prend en compte :

- la taille de la tumeur primitive
- le nombre de ganglions lymphatiques régionaux qui contiennent des cellules cancéreuses et leur emplacement
- la propagation du cancer, ou métastases, vers une autre partie du corps

Tableau 02 : Classification TNM (Hamilton SR, 2000)

TX	Impossible d'évaluer la tumeur primitive
T0	Aucun signe de tumeur primitive
Tis	Carcinome in situ Carcinome in situ Cancer à un stade très précoce : les cellules tumorales n'ont pas encore envahi les tissus voisins. – La tumeur se trouve seulement dans le revêtement interne de l'estomac (muqueuse). On l'appelle également dysplasie épithéliale gastrique de haut grade.
T1	La tumeur s'est étendue jusque dans la muqueuse, la couche musculaire de la muqueuse (musculaire musculieuse) ou bien la sous-muqueuse.
	T1a – La tumeur a envahi la muqueuse ou la musculaire muqueuse.
	T1b – La tumeur a envahi la sous-muqueuse.

T2 La tumeur s'est étendue jusque dans le muscle principal de l'estomac (muscleuse).

La tumeur a envahi les tissus situés juste en-dessous du revêtement de l'estomac (sous-séreuse).

Ou

T3 La tumeur s'est étendue jusque dans les ligaments de l'estomac ou dans l'**épiploon** Repli du péritoine (membrane tapissant les parois de l'abdomen et du bassin) qui recouvre et soutient les organes et les vaisseaux sanguins situés dans l'abdomen., sans atteindre le péritoine, **péritoine** Membrane qui tapisse les parois internes de la cavité abdominale et pelvienne (péritoine pariétal) et qui recouvre et soutient la plupart des organes abdominaux (péritoine viscéral).

La tumeur a traversé le revêtement de l'estomac (séreuse) ou a envahi les organes situés près de l'estomac.

T4a – La tumeur a traversé la séreuse.

T4 T4b – La tumeur s'est propagée à n'importe quel organe situé près de l'estomac, dont la rate, le colon, le foie, le diaphragme, le pancréas, le rein, la glande surrénale, l'intestin grêle, la paroi abdominale, la région derrière le péritoine (rétropéritoine) ou l'oesophage.

N Adénopathies régionales

Nx Renseignements insuffisants pour classer les adénopathies.

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

N1 Envahissement de 1 à 2 ganglions lymphatiques régionaux.

N2 Envahissement de 3 à 6 ganglions lymphatiques régionaux.

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

N3b : Envahissement de 16 ou plus ganglions lymphatiques régionaux.

M Métastases à distance

M0 Pas de métastases à distance.

M1 Présence de métastase(s) à distance.

II.4.5-Métastases gastriques : Les métastases les plus fréquentes sont celles des cancers du sein, des bronches et du mélanome. Ces métastases peuvent avoir un développement sérieux, avec une extension à toute la paroi, ou se présenter sous forme de métastases intra muqueuses. (Marcaton, 2005 ; Sissoko .I, 2014) (Figure 16)

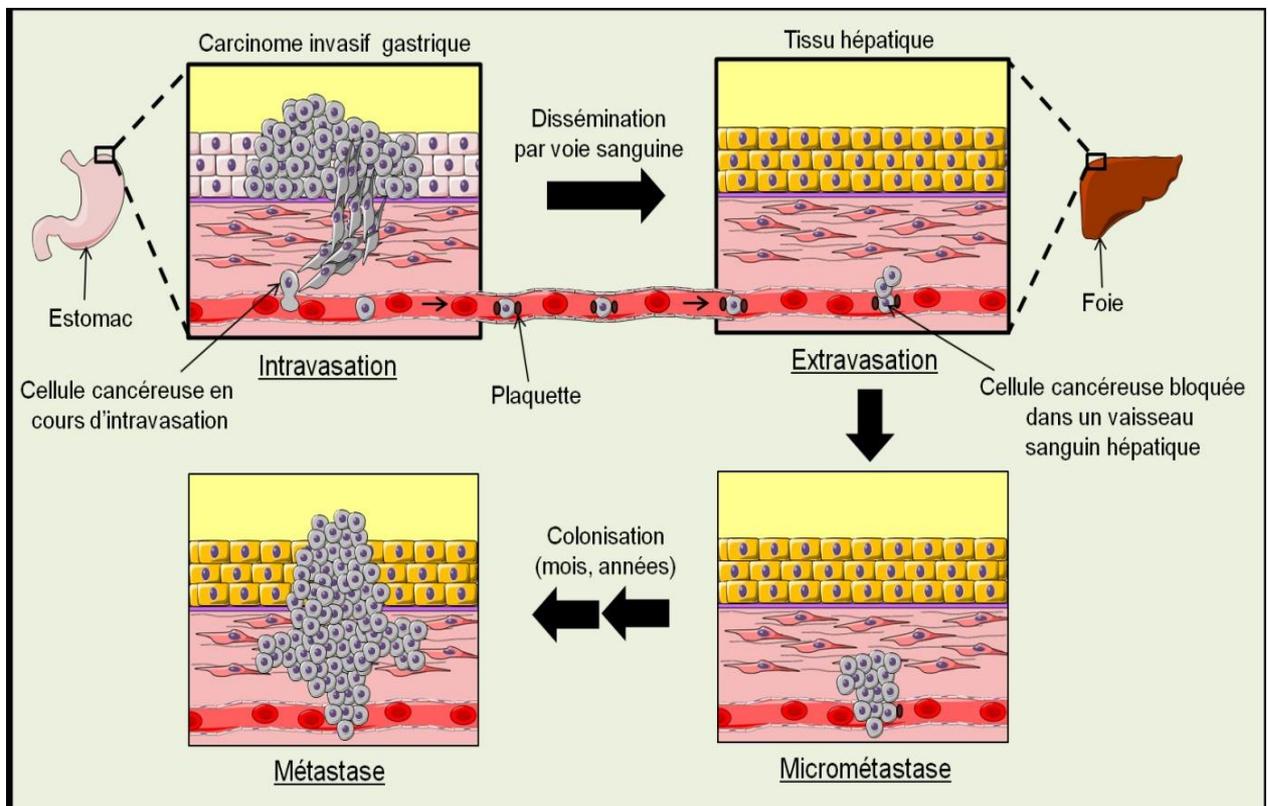


Figure 16: Métastase gastrique (Greene FL, 2003)

5. Etude clinique :

5-1 Circonstances de découverte : (Maconi G , 2008)

Les cancers de l'estomac sont habituellement asymptomatiques et rarement détectés au stade précoce de la maladie, en dehors d'une politique de dépistage ciblée.

Les cancers de l'estomac sont en général diagnostiqués chez des patients présentant des formes évoluées.

5-2 Signes fonctionnels : (Layke JC, 2004)

Les épigastralgies, les vomissements post-prandiaux tardifs (syndrome orificiel) et une perte de poids sont les principaux symptômes qui amènent les malades en consultation. L'anorexie, l'hématémèse, le méléna, la sensation de satiété précoce et la plénitude gastrique permanente sont parfois associés. La dysphagie est un symptôme des cancers du cardia alors que les vomissements témoignent un envahissement du pylore. Un syndrome de pseudo achalasie par envahissement des plexus d'Auerbach est possible.

5-3 Signes généraux : (Aparicio T, 2004)

Une altération de l'état général (Indice de Karnofsky $<$ ou $=$ 70 %), une anémie, une fièvre inexplicable et une asthénie sont fréquentes. Des manifestations cutanées (kératose séborrhéique diffuse, acanthosis nigricans), des microangiopathies, des néphropathies membranoprolifératives, de syndromes d'hypercoagulation (syndrome de Trousseau) sont rares.

5-4 Signes physiques: (Aparicio T, 2004)

L'examen physique est en général normal : La présence d'une masse abdominale palpable, d'un ganglion de Troisier (ganglion sus-claviculaire gauche), d'une ascite avec ou sans carcinose péritonéale palpable, d'une hépatomégalie due à une localisation secondaire et d'une tumeur ovarienne (tumeur de Krükenberg) suggère une forme évoluée de la maladie.

6. Examens paracliniques :

6-1- Bilan du diagnostic :

_ Fibroscopie oeso-gastro-duodénale (FOGD): (Layke JC, 2004)

La fibroscopie oeso-gastro-duodénale est l'examen fondamental. Elle doit être systématique et associée à des biopsies multiples.

L'examen anatomopathologique des biopsies pose le diagnostic positif. Elle permet de préciser la taille, la localisation et l'extension superficielle de la tumeur.

_ Le Transit oeso-gastro-duodéal (TOGD): (Layke JC, 2004)

Il peut identifier une lésion infiltrante évocatrice d'une limite gastrique ou préciser les données de l'endoscopie sur l'étendue de la lésion contribuant ainsi au choix de la technique chirurgicale.

Les marqueurs tumoraux sérologiques : (Aparicio T, 2004)

Ils n'ont pas d'intérêt à visée diagnostique. L'Antigène Carcinome Embryonnaire (ACE) et le CA 19-9 sont élevés respectivement chez 40 et 30 % des patients atteints de cancers métastatiques. En revanche, ils peuvent être utiles dans le suivi après traitement curateur ou l'évaluation de l'efficacité d'une chimiothérapie.

6-2 Bilan d'extension : (Layke JC, 2004)

_ Scanner abdomino-pelvien :

C'est l'examen de référence pour le bilan d'extension.

L'envahissement des organes de voisinage est suspecté par la perte du liseré graisseux. Les ganglions sont considérés comme envahis s'ils mesurent 1,5cm.

_ Echoendoscopie :

Elle est performante pour la détermination de l'envahissement pariétal et de l'extension ganglionnaire périgastrique. L'ascite est détectée avec une sensibilité de 100 %.

L'échoendoscopie ne fait cependant pas partie du bilan d'extension systématique de tous les cancers gastriques ; en revanche, il s'agit d'un examen indispensable avant une tentative de résection endoscopique d'une lésion superficielle.

_ Imagerie par résonance magnétique (IRM) :

Elle est légèrement plus sensible que le scanner pour préciser l'extension pariétale, mais moins précise que celui-ci pour déterminer l'envahissement ganglionnaire. L'IRM peut être une alternative au scanner en cas de contreindication de celui-ci.

_ Radiographie pulmonaire :

Elle recherche les métastases pulmonaires.

7-Le pronostic du cancer de l'estomac :

Le pronostic de l'adénocarcinome gastrique est sombre et dépend de l'extension pariétale, ganglionnaire, du type histologique et métastatique :

- Survie à 5 ans de 90% en cas de tumeur superficielle ne franchissant pas la sous-muqueuse.
- Survie à 5 ans de 20% en cas d'envahissement ganglionnaire sans autres métastases.
- Survie à 5 ans de 0% en cas de métastases, avec une survie moyenne d'environ un an.

Le pronostic est meilleur dans les tumeurs différenciées que dans les formes peu différenciées ou dans la limite.

Le cancer de l'estomac est le plus souvent un adénocarcinome et reste une affection grave car le diagnostic est le plus souvent fait à un stade tardif ne permettant à un bon nombre de cas une résection curative qui en est la solution radicale. Son pronostic est sombre, la survie globale après résection chirurgicale curative est de 35 à 40%. **(Maiga A. 2008)**

8. Aspects thérapeutiques :

8-1.Traitement préventif : (Van, 2007)

L'éradication de l'*Helicobacter pylori*, l'alimentation équilibrée, le dépistage systématique en masse et le traitement des affections à risque peuvent être utiles à la prévention du cancer de l'estomac.

8-2.Traitement curatif : (Correa P ,2008)

_ Buts :

- Guérir le patient si possible

-Et/ou améliorer la qualité de vie des patients

- Soulager les symptômes

_ Moyens et Méthodes: (Ballian A, 2009)

_ la chirurgie :

La chirurgie est le seul traitement curatif du cancer de l'estomac, comprenant l'exérèse complète de la tumeur associée à un curage ganglionnaire. La chirurgie n'est possible que dans 50% des cas.

- Une gastrectomie totale avec anastomose oeso-jejunale par anse en Y
- Gastrectomie totale avec anastomose gastro-jéjunale .La marge de sécurité macroscopique in situ doit être d'au moins 5 cm.
- Une gastrectomie subtotale (des 2/ 3 ou des 4/5)

La continuité digestive peut être rétablie avec :

- le duodénum : anastomose gastroduodénale (Billroth I ou Péan).
- le jéjunum : anastomose gastrojejunale (selon Finsterer plutôt que Péan).
- Exérèse monobloc sans dissection, ni rupture, ni biopsie de la pièce opératoire.
- Les dérivations : gastro-jéjunostomie ; gastro-entéro anastomose Une stomie d'alimentation (gastrostomie ou jéjunostomie)

Les complications de la chirurgie digestive : (Correa P ,2008)

_ Les complications postopératoires immédiates :

- mortalité opératoire 5-10% en fonction du type de chirurgie.
- Les fistules anastomotique et duodénale.
- Les péritonites, les médiastinites.
- Les compressions de voisinage.
- Les sténoses anastomotiques.

_ Les complications tardives :

- Le syndrome de l'anse afférente : Il est en rapport avec une gêne à l'évacuation des liquides bilio-pancréatiques, entraînant une distension duodénale. Le signe caractéristique est marqué par les vomissements survenant 10 à 20 minutes après les repas, soulageant le malade.
- Le syndrome de l'anse borgne.
- Le syndrome de l'anse efférente.

Chapitre II: Cancer Gastrique

- Le syndrome du « petit estomac » : observé après gastrectomie polaire inférieure étendue ; il est dû à l'atonie et à la réduction de volume du réservoir gastrique. Il se traduit par une sensation de plénitude gastrique douloureuse pendant le repas.

- Le « Dumping syndrome » : Il se voit le plus souvent après anastomose gastro-jéjunale. Il comprend deux entités. Le syndrome postprandial précoce survient 5 minutes à 1 heure après le repas. Le tableau clinique est marqué par une impression de faiblesse, une sensation de chaleur, une tachycardie, une plénitude gastrique et une hypotension.

Dans les formes sévères on note des nausées, des vomissements, une diarrhée, une lipothymie avec sueur, une confusion mentale pouvant conduire à une perte de connaissance. Il est en rapport avec l'hypoglycémie. L'absorption rapide des sucres au niveau de l'anse efférente entraîne une hypersécrétion insulinaire et une hypoglycémie secondaire importante. (**Gérard T. 2005**)

- L'anémie.

- L'amaigrissement quasi constant avec perte de 10% du poids corporel.

- La carence en vitamine B12.

- La stéatorrhée par malabsorption des graisses.

- L'occlusion intestinale sur bride

Le traitement médicamenteux : (Michel P, 2014)

• Chimiothérapie:

Les chimiothérapies adjuvantes et néoadjuvantes ont une durée limitée dans le temps (en général pendant 3 à 6 mois).

Chaque produit a un mode d'administration qui lui est propre :

- 5FU en perfusion continue pendant 48 heures.

- Taxotère en perfusion d'une heure.

- l'oxaliplatine en perfusion de 2 heures.

Autres molécules :

- FAMTX (5FU ; adriamycine ; méthoxane).

- FAM (5FU ; adriamycine ; mitomycine).

- ECF (Epi-adriamycine ; cisplatine ; et 5FU).

- FUP (5FU ; cisplatine).

- 5FU+acide folonique.

II.5- La relation entre les Protéines Cbl et EGFR dans le cancer gastrique :

Des études initiales sur la localisation de la protéine Cbl ont montré que Cbl est principalement une protéine cytotogique, ce qui suggère que la Cbl se trouve aussi bien au niveau de la membrane et du cytosquelette, cette la localisation est importante pour la médiation des effets biologiques de cette protéine (**Gayathri S, 2006**), Ainsi, les protéines Cbl se sont révélés / interagir avec les récepteurs membranaires activés, tels que EGFR (**Dong Q, 2010**) ; Plusieurs rapports ont montré que c-Cbl régule négativement l'EGFR par un mécanisme dépendant d'ubiquitylation. Les études actuelles ont suggéré que le système récepteur / ligand EGF a été impliqué dans la prolifération de la muqueuse gastrique et le développement de survenue d'un cancer gastrique et que la surexpression ou une activation accrue de l'EGFR a été étroitement liée à l'apparition et le pronostic du cancer de l'estomac (**Celikel C, 2007**).

Les études actuellement nationaux et étrangers en ce qui concerne la coexpression de Cbl, EGFR et leur corrélation dans la carcinogenèse sont rares. En fait, dans un seul rapport pertinent, des scientifiques japonais **Ito et al** , **Qian et al** ont mesuré la co-expression de CBL et EGFR dans le cancer gastrique.

Ito et al, 2004 a examiné l'expression de Cbl dans les carcinomes gastriques et a étudié la corrélation d'expression de Cbl avec des caractéristiques clinicopathologique dans 122 adénocarcinomes gastriques. Une expression diffuse de Cbl était significativement plus élevée dans les cas avancés que dans les cas précoces. Cbl se trouvait co-exprimé avec la protéine EGFR. Ainsi, l'expression de Cbl a été étroitement associée à la progression de la tumeur ainsi que l'expression de l'EGFR. (**Figure 17**)

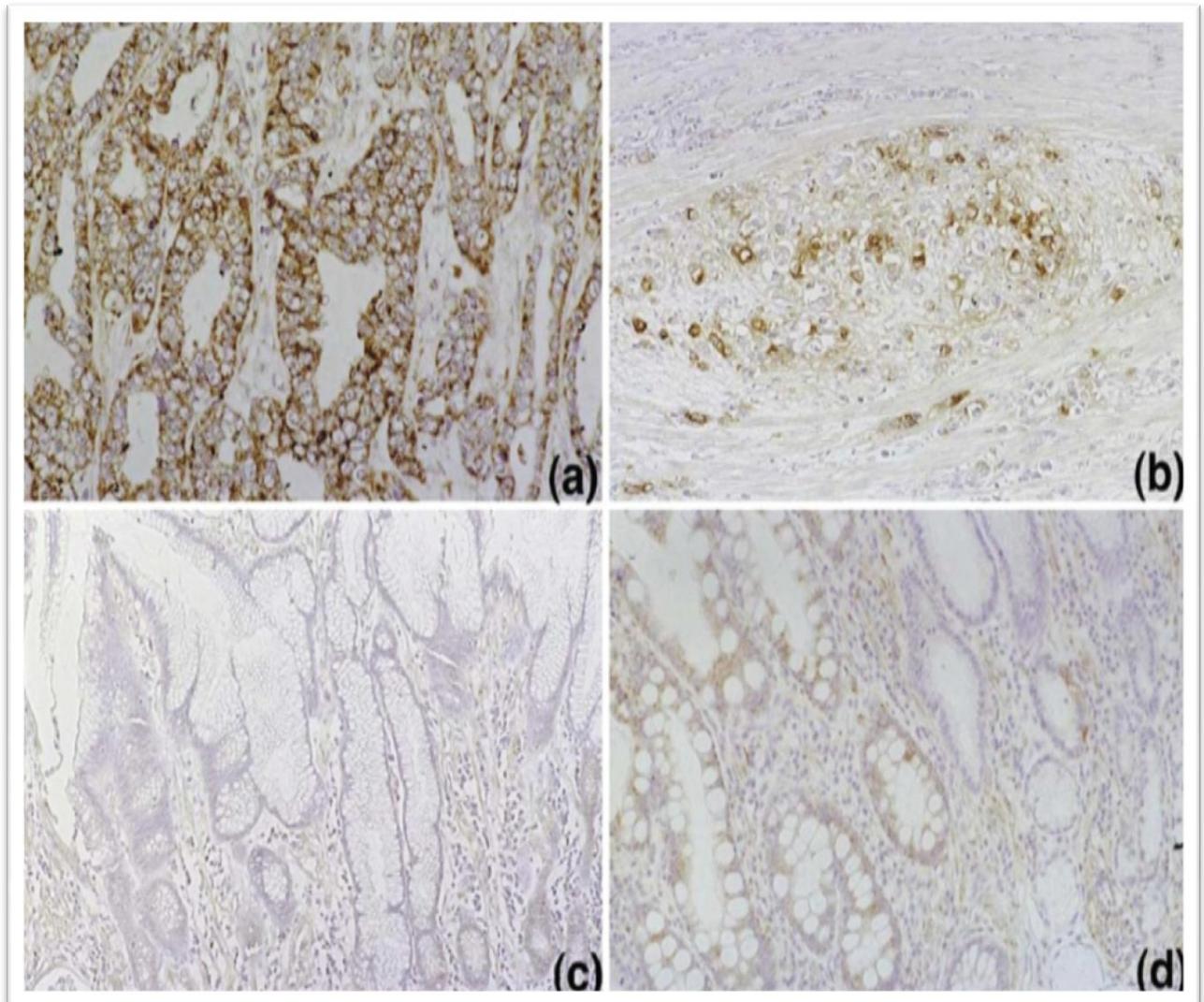


Figure 17: Expression de la Cbl dans les tissus du carcinome gastrique et de la muqueuse non néoplasique.

(a) adénocarcinome bien différencié tubulaire; (B) adénocarcinome peu différentie; (C) de l'épithélium fovéolaire normale; (D) de la métaplasie intestinale. L'expression Cbl a été trouvée à différents niveaux dans les tissus de carcinome gastrique. (Ito. R et al, 2004)

Qian et al, 2010 avec 124 cas d'adénocarcinome gastrique, la co-détection de c-Cbl et Cbl-b et EGFR était important dans la détermination du niveau de malignité du cancer gastrique. Ils concluent en déclarant que «surexpression de c-Cbl et Cbl-b sont étroitement liées à l'invasion à la progression de l'adénocarcinome gastrique. (**Figure 18**)

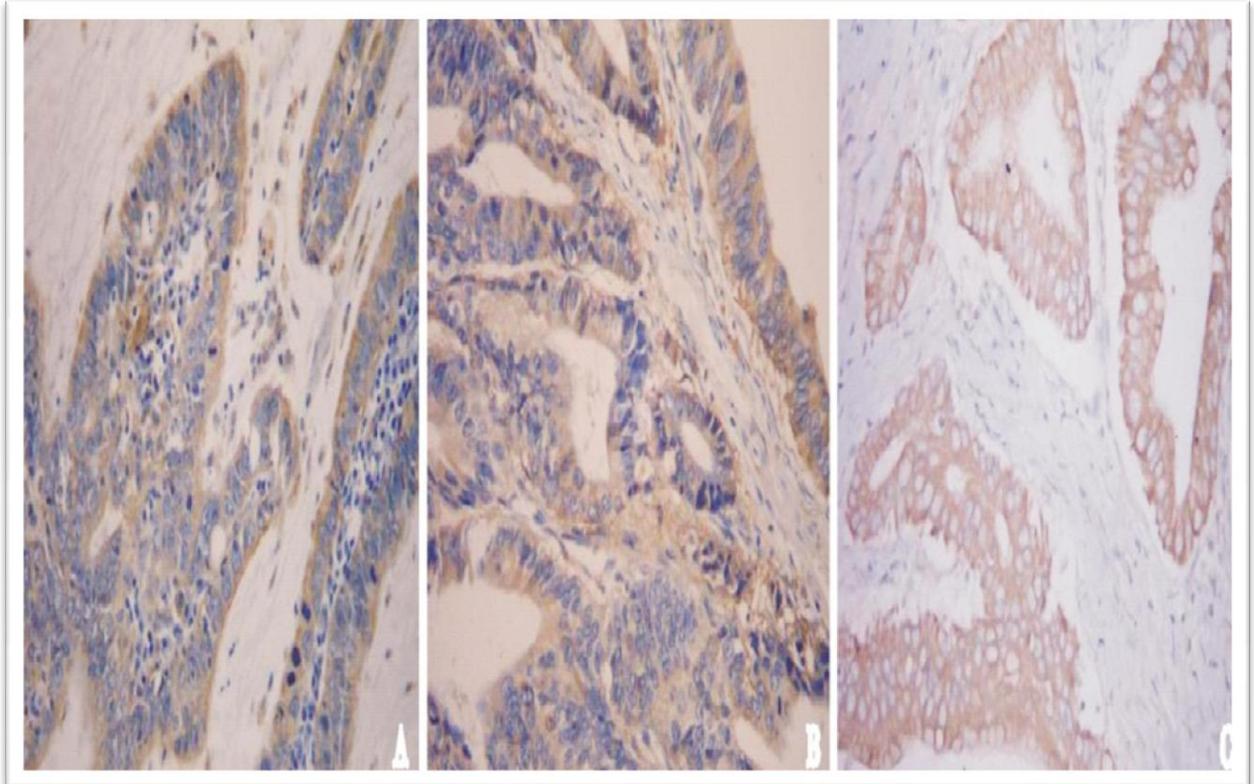


Figure 18: Expressions de c-Cbl et Cbl-b, dans le carcinome gastrique

- A. forte coloration positive de c-Cbl dans le carcinome gastrique**
- B. forte coloration positive de Cbl-b dans le carcinome gastrique**
- C. forte coloration positive EGFR dans le carcinome gastrique**

Partie II:

*C*hapitre III

Matériels & Méthodes

III.1-Objectif du travail:

Au cours des dernières années, nous avons commencé à apprécier la complexité des réseaux de signalisation par lequel les récepteurs de surface des cellules convertissent les signaux externes à des réponses biologiques. Dans le même temps, il devient clair que des questions biologiques importantes s'imposent, telles que la façon dont les cellules se développent, se déplacent, se divisent et meurent. Ainsi il faudra des idées moléculaires détaillées à l'intérieur de la cellule, où les voies de signalisation transmettent des messages qui contrôlent éventuellement différents processus physiologiques ou pathologiques.

Dans ce projet de thèse, nous analyseront le niveau d'expression de certaines protéines membranaire ou intracellulaire, à savoir les protéines de la famille CBL « C-Cbl, Cbl-b » et le récepteur membranaire EGFR dans les tissus des patients atteints de cancer gastrique par comparaison avec des tissus de patients non cancéreux. L'intérêt particulier porté pour ces protéines dans notre étude est lié au fait de leur rôle important dans la transduction du signal au niveau des cellules normal et les cellules en état pathologique comme les cellules cancéreuses. Ainsi pour étudier l'état de l'expression de ces oncoprotéines nous avons utilisé un protocole d'immunohistochimie par lequel nous avons analysé l'immuno-distribution ainsi que le niveau d'expression de ces protéines dans les tissus gastriques cancéreux et les tissus ne présentant pas de tumeurs gastriques

III.2-Etudes expérimentale

III.2.1-Cadre d'étude :

Notre étude s'est déroulée dans le service d'anatomie et de cytologie pathologique du CHU de l'hôpital militaire de l'Ouest Algérien à Oran.

III.2.2-Type d'étude :

Il s'agissait d'une étude expérimentale sur deux groupes

Premier groupe : cas pathologiques : présente le cancer gastrique

Deuxième groupe : présente des cas témoins

III.2.3-Population d'étude :

- L'étude a concerné l'ensemble des patients (tout âge et sexe confondus) hospitalisés au cours de la période d'étude 2006 à 2013 et dont les examens cliniques et pathologiques confirmaient leur souffrance de pathologies gastriques cancéreuses et cas témoins. Patients ne souffrant pas de cancers de l'estomac mais ils sont admis pour d'autres pathologies.

III.2.4-Critères d'inclusion :

-Cas pathologiques : la sélection des blocs des pièces opératoires et des biopsies qui présente des cancers gastriques diagnostiqués par l'examen histologique et reconfirmés par la coloration à l'hématoxyline et à l'éosine (HE).

-Cas-Témoins : la sélection des cas témoins. Ils sont constitués par des patients ne souffrant pas de cancers de l'estomac, mais qui ont été admis pour d'autres pathologies gastriques (ulcère gastrique, gastrite).

III.2.5-Liste des produits:

- Xylène, C₈H₁₀, laboratoire: SIGMA ALDRICH, product of Germany, 2, 5 LITRE.
- Ethanol Absolu PA-ACS-ISO: CH₃CH₂OH, M=46, 07, laboratoire Panreac 2, 5 LITRE.
- Vitro-Clud: mounting medium laboratoire panreac, 20 C⁰, 500ml.
- Target Retrieval solution, PH=09, DAKO, 2C⁰-8C⁰, 500ml.
- Antibody diluents with back ground, DAKO, 2C-8C, 125ml.

- LABELLED Polymer-HRP Anti –mouse, Dako, 2C-8C, 110 ml.
- Monoclonal mouse anti Human CD 79 alpha, B cell clone JCB 117, DAKO, 2C-8C, 7 ml.
- Solution lavage tris biffer saline « TBS », DAKO.
- Anticorps primaire c-Cbl : BD Transduction laboratories TM Purified mouses anti c-Cbl, cat : 610442, 150ug.0, 6 ml, 250mg/ml, 20 C⁰.BD Bioscienas.
- Anticorps primaire Cbl-b: Cbl-b (G-1) sc-800, mouse monocloal IgG1, 4C, 200 ug/ml, Santa Gruz.
- Mayer's Hematoxylin Solution PC, laboratoire panreac, 1000ml.
- Les lames silanizés et les lamelles.
- DAKO pen
- Abcam mAb to EGFR/ EP38Y/ 40 ul (0,038 mg/ml) **ab529894** Abcam laboratoire

III.3-Etude Immunohistochimique

Les quatre vingt seize (96) blocs de tumeur gastrique ont été recueillis à partir du service de pathologie, de l'Hôpital Militaire Régional d'Oran (HMRUO) pour la période de 2006-2013. Ces échantillons tissulaires ont été conservés dans de la paraffine. Ces sections ont été colorés avec de l'hématoxyline et l'éosine (H&E) pour l'examen histologique. Une confidentialité absolue des informations des patients était maintenue.

III.3.1-Protocole de l'immunohistochimie :

Nous avons utilisé le protocole du fournisseur Abcam (EXPOSE IHC detection kit ; Abcam, Cambridge, MA, USA) pour la manipulation immunohistochimique: les spécimens fixés au formol et conservés a la paraffine étaient déparaffinées et réhydratées. A la suite suite quelques gouttes (2 à 3) de peroxyde d'hydrogène ont été ajoutés pour couvrir les sections. Nos échantillons étaient incubés pendant 10 minutes, lavés deux fois dans une solution tampon de phosphate saline (PBS) 10X PBS (0,1 M de PBS, pH 7,4) ; prétraiter ; et ensuite lavés trois fois avec la solution tampon.

Les sections étaient couvertes par une protéine bloque puis incubées durant 10 minutes à la température ambiante pour bloquer la coloration de fond. Les coupes étaient, par la suite, lavées une fois avec une solution tampon.

L'application de l'anticorps primaire :

1/ On mit quelque goutte en couvrant l'échantillon par anticorps primaire anti-C-Cbl (1:100 dilution mouse monocloal; BD Biosciences, CA pour la première manipulation) avec un temps d'incubation de 16h (toutes la nuit dans une chambre humide)

2/ On mit quelque goutte en couvrant l'échantillon par anticorps primaire anticorps anti-Cbl-b (1:100 dilution mouse monocloal; BD Biosciences, CA) (pour la seconde manipulation) avec un temps d'incubation de 16h (toutes la nuit dans une chambre humide)

3/ On mit quelque goutte en couvrant l'échantillon par anticorps primaire anticorps anti-EGFR (1:200 dilution mouse monocloal; Abcam, Cambridge, UK). Les coupes étaient incubées durant 40 minutes dans une chambre humide (pour la troisième manipulation)

Après inculcation avec les différents anticorps primaire, les coupes ont subi 3 lavages avec une solution tampon; et par la suite un complément était appliqué pendant 10 minutes à une température ambiante. Les sections étaient lavées encore deux fois ; ensuite recouvertes de l'HRP conjugué ; incubée pendant 15 minutes à une température ambiante; et rincées 4 fois avec la solution tampon, ensuite 30 μ l (1 goutte) de DAB chromogène était ajoutés à 1,5 ml (50 gouttes) de substrat DAB ; puis appliqués sur les tissus préalablement incubés durant 10 minutes. Les tissus étaient rincés 4 fois ; puis une contre coloration était appliqué sur les échantillons avant d'être déshydraté.

III.3.2 Évaluation morpho métrique :

Pour la lecture ou l'évaluation des résultats de l'étude immunohistochimique, nous avons suivi le protocole établi par Dong et al. (**Dong Q, 2010**) La coloration positive des protéines C-CBL, CBL-b et EGFR a été indiquée sous forme de granules brunes jaunâtres dans la cytomembrane, le cytoplasme ou les deux. Les coupes ont été observées par l'examen microscopique (x40) par deux pathologistes. De chaque section, cinq champs visuels ont été choisis au hasard et le score pour chaque champ visuel dépendait du pourcentage des cellules positives et de l'intensité de la coloration. Pour le pourcentage de cellules positives, inférieures ou égales à 5%, 6% -25%, 26% -50%, 51% -75% et plus de 76% ont été enregistrées en tant que 0, 1, 2, 3 et 4 points, respectivement. Pour l'intensité de coloration, non teinté, jaune, brune jaunâtre clair, et brune ont été enregistrées en tant que 0, 1, 2, et 3 points respectivement. Le produit arithmétique de ces deux scores (score pour cent et score d'intensité) a été considéré comme le score pour ce champ visuel, et le score moyen de ces

cinq champs visuels ont été considérés comme le score final pour cette section. Enfin, 01 points a été enregistré comme (-), ce qui indique une coloration négative; 2-4 points ont été enregistrés comme (+), ce qui indique une faible coloration positive, 5 points ont été enregistrés en tant que (++) et inférieure ou égale à 8 points (comme + ++), ce qui indique une forte coloration positive. Les notes finales ont été affectées par un pathologiste.

III.4-Analyse statistique:

Le traitement et l'analyse statistique des données ont été réalisés à l'aide du logiciel SPSS version 20. La corrélation de l'expression des protéines C-CBL, CBL-b et EGFR avec les paramètres clinico-pathologiques ont été effectuées par test de chi². Les différences étaient considérées comme significatives à $P < 0,05$.

Chapitre IV:

Résultats

&

Discussions

Notre enquête de la partie expérimentale a été réalisée sur un échantillon de 113 cas : 96 blocs présentant un cancer gastrique, dont 32 étaient des blocs de biopsies et 64 des blocs de pièces opératoires. Ces blocs ont été recueillis à partir du service d'anatomopathologie de l'hôpital militaire d'Oran. 17 échantillons portant des muqueuses gastriques normales ou d'autres pathologies gastriques non cancéreuses ont été utilisés comme témoins.

IV.1-Répartition des patients selon le sexe et l'âge :

Les résultats de notre étude ont montré que l'ensemble des 96 sujets souffrant du cancer gastrique étaient âgés entre 27 et 87 ans avec un âge médian de 60 ans. Le sexe féminin n'atteignait que 26 des cas, alors que le sexe masculin représentait la valeur la plus élevée de 70 cas, avec un sex ratio hommes/femmes d'environ 2,7 (**Figure 19**). Les groupes d'âge les plus touchés étaient [50-70] ans chez les femmes et ceux de [30-40] et [70-80] ans chez les hommes. La tranche d'âge la moins touchée était celle de plus de 80 ans (**Figure 20**). Les sujets contrôles (dont les échantillons étaient utilisés comme témoin) étaient âgés entre 21 à 84 ans avec un âge médian de 60 ans. Il s'agissait de 11 hommes et 6 femmes, ainsi, nous avons souligné une prédominance masculine avec un sex ratio hommes/femme de 1.83.

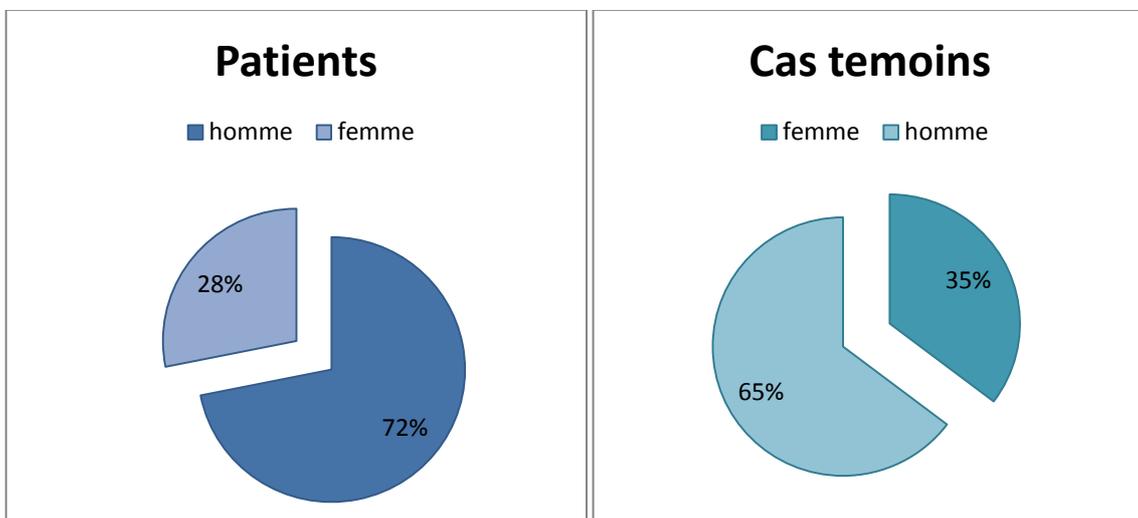


Figure 19 : Répartition des cas selon le Sexe

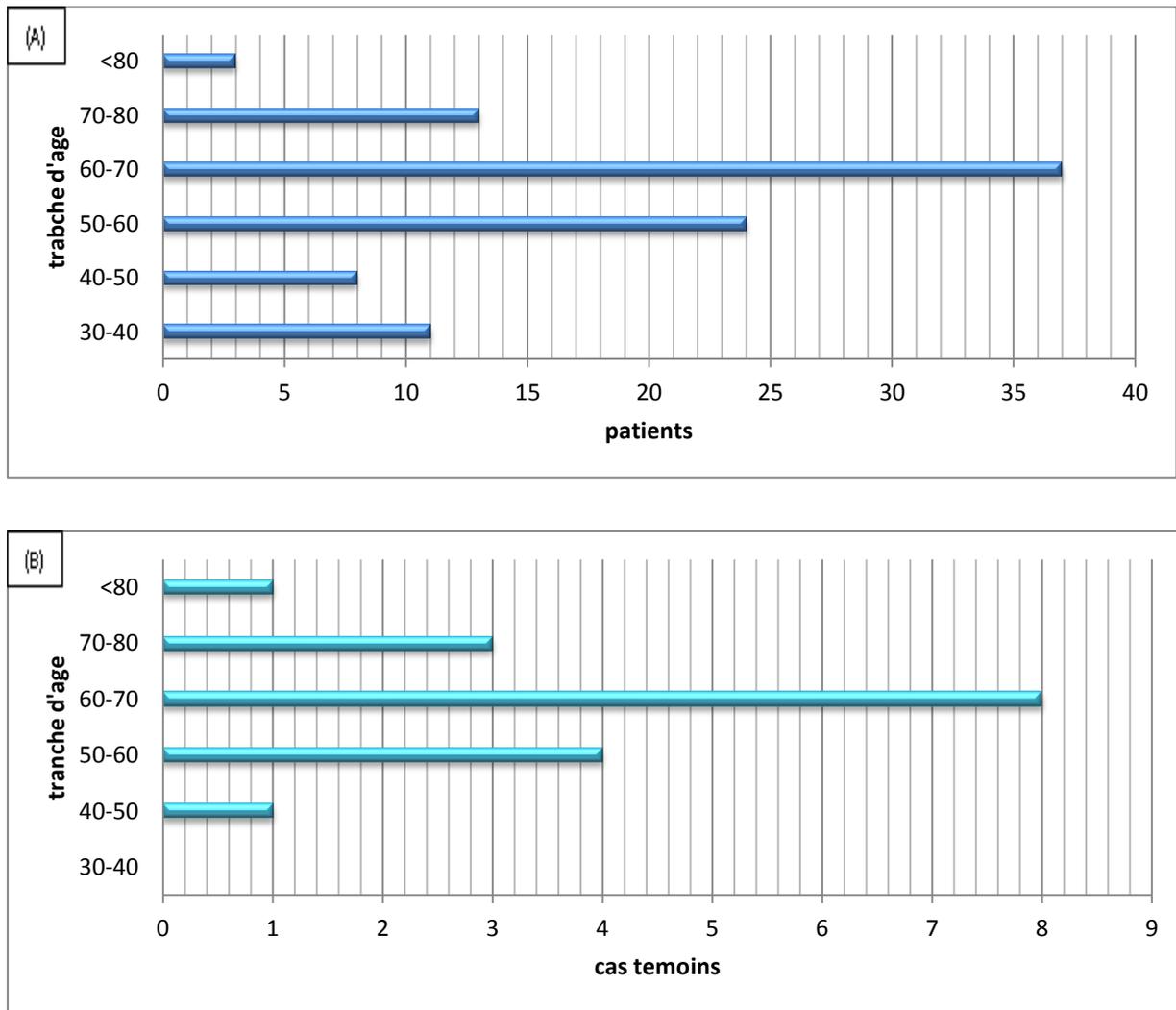


Figure 20: Répartition selon les tranches d'Age

(A) : Cas présente tumeur gastrique

(B) : Cas Témoins

IV.2- Aspects anatomo-pathologiques :

IV.2.1-Localisation de la tumeur :

La localisation antrale dans notre population d'étude était la plus fréquente avec 41.66% des cas suivi par la localisation antropylorique chez 29.16% des cas. **(Figure 21)**

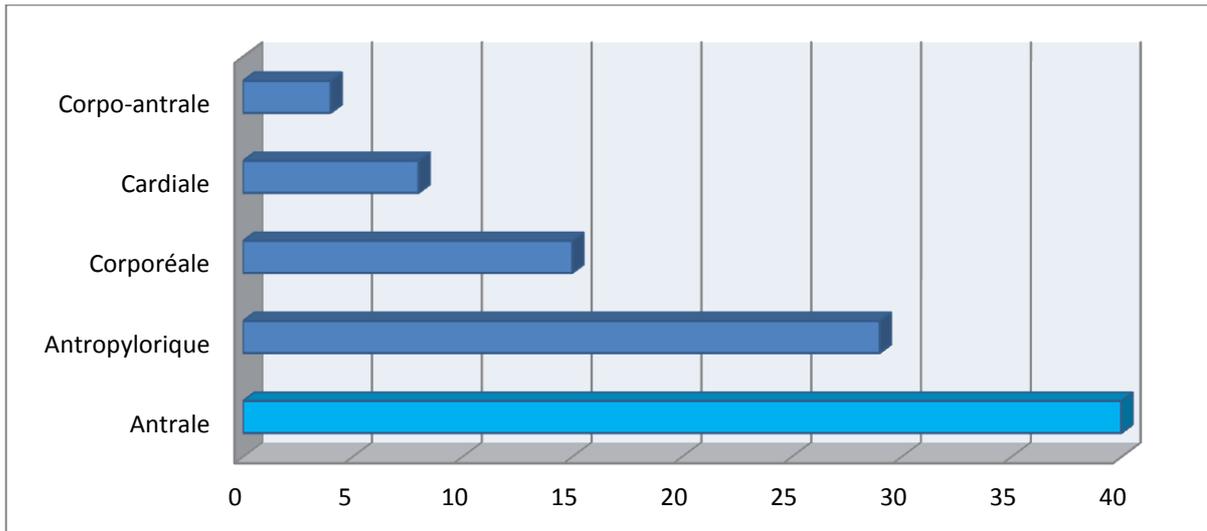


Figure 21: Répartition des cas selon la localisation de la tumeur

IV.2.2- La macroscopie de la tumeur : (Figure 22)

A la macroscopie, l'aspect ulcéro-bourgeonnant était le plus fréquent chez 77% des cas

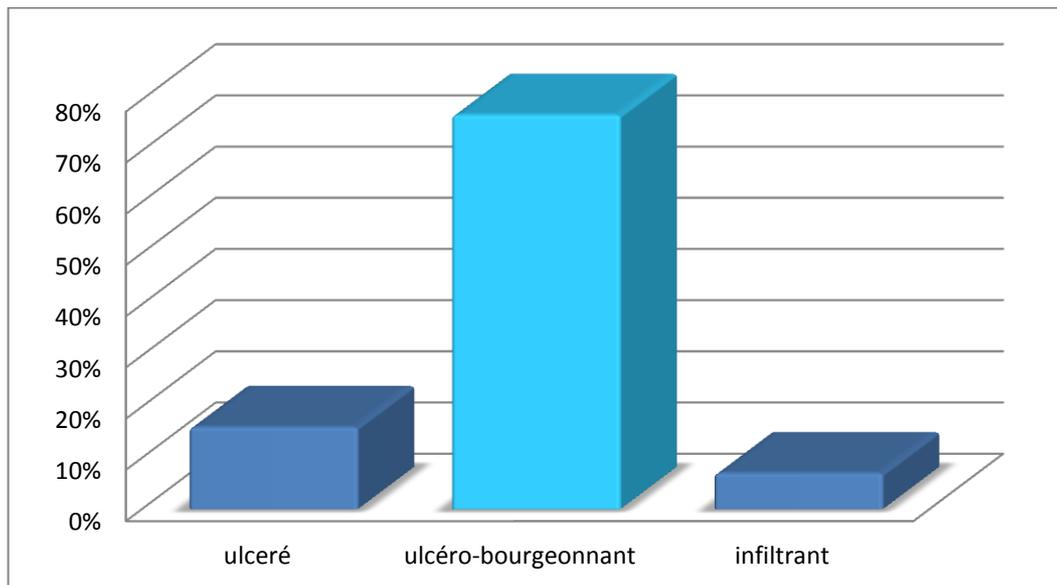


Figure 22 : Répartition des cas selon les aspects macroscopiques du cancer gastrique

IV.2.3-La microscopie de la tumeur :

L'analyse histopathologique a révélé que les types les plus fréquents étaient les adénocarcinomes gastriques soulignés chez 72 cas, carcinomes colloïde chez 4 cas et 20 carcinomes a cellule indépendante en bague a chatant. La confirmation histologique des adénocarcinomes gastrique a permet de classer les adénocarcinomes en les sous-types

suivants : 33 cas d'adénocarcinomes moyennement différencie, 24 cas d'adénocarcinome bien différencie et 15 cas d'adénocarcinome peu différencie (**Figure 23**)

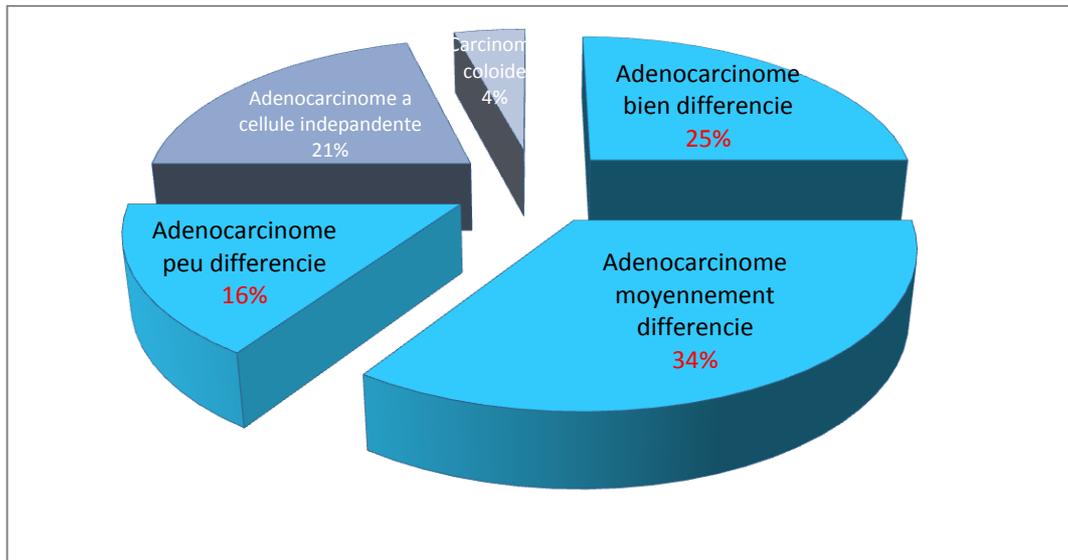


Figure 23 : Répartition des cas selon les aspects microscopiques

La présence des ganglions lymphatiques a été notée chez 24 cas soit à 25% et 53 cas soit 55.20% ont présenté une tumeur infiltrant contre 44.79% des cas non infiltrant. Selon leur extension anatomique et en fonction de la classification TNM (Tumor, Node, Metastase), la majorité des cas soit à 53% été soulignés au stade T1 suivi du stade T3 dans 24% des cas (**Figures 24,25**).

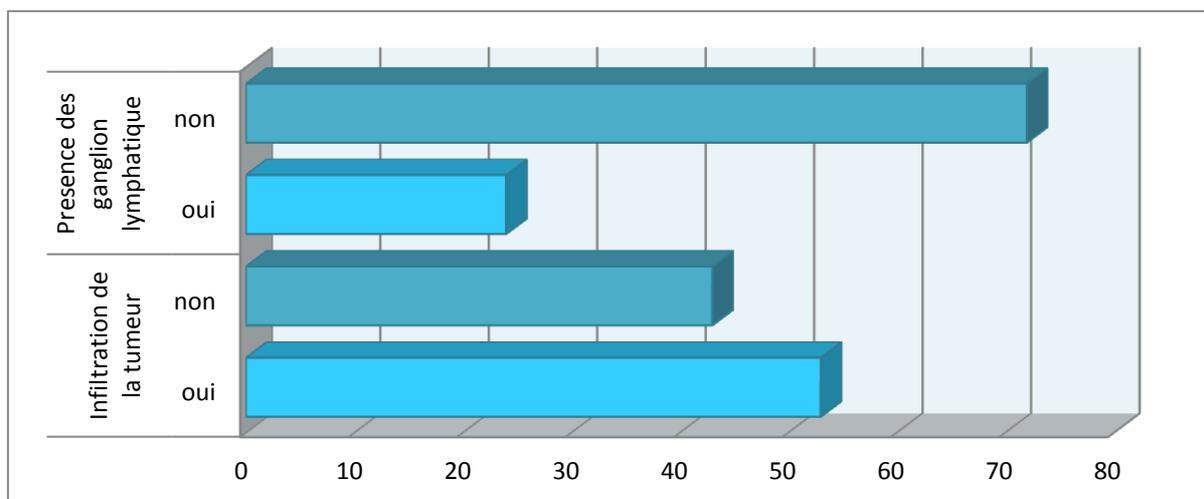


Figure 24: Répartition des patients selon les ganglions lymphatiques et l'infiltration gastrique

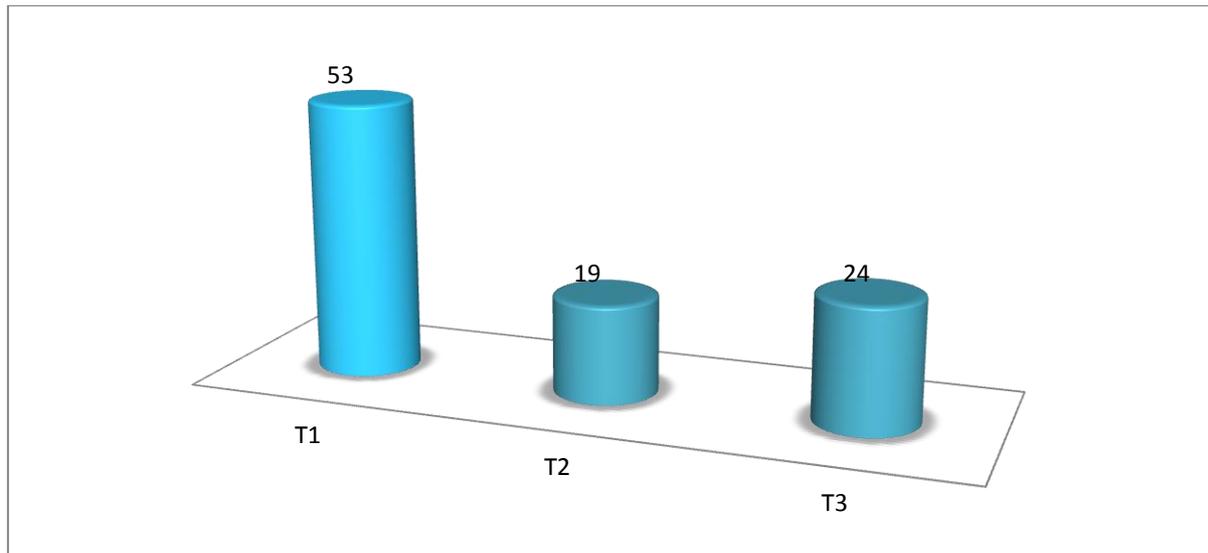


Figure 25 : Répartition des patients selon la classification TNM

IV.3- Résultats de l'Etude Immunohistochimique :

Les résultats de l'immuno-marquage des protéines C-Cbl et la Cbl-b dans les tissus des cancers gastriques sont réparties comme suite :

-21 cas ne présentaient aucune immuno-réactivité pour l'anticorps C-Cbl; tandis que pour l'anticorps Cbl-b , 52 cas ne présentaient aucun marquage

-La positivité de l'immuno-marquage a été observée dans 75 cas pour la protéine C-Cbl et dans 44 cas pour la protéine Cbl-b

IV.3.1-Protéine c-Cbl :

a-Relation entre la positivité de l'expression des protéines c-Cbl et les différents paramètres clinico-pathologique : Tableau 03

Une coloration positive de c-Cbl a été détectée dans la région cytoplasmique et / ou membranaire des cellules cancéreuses gastriques avec une coloration homogène de granules en brun jaunâtre (**Figure 23**). Le taux de coloration positive pour C- Cbl dans les tissus gastriques cancéreux était de 78,12 %. Cependant, aucune coloration n'a été observée dans la série des cas témoins qui représente les tissus gastriques non cancéreux (**Figures 26,27**)

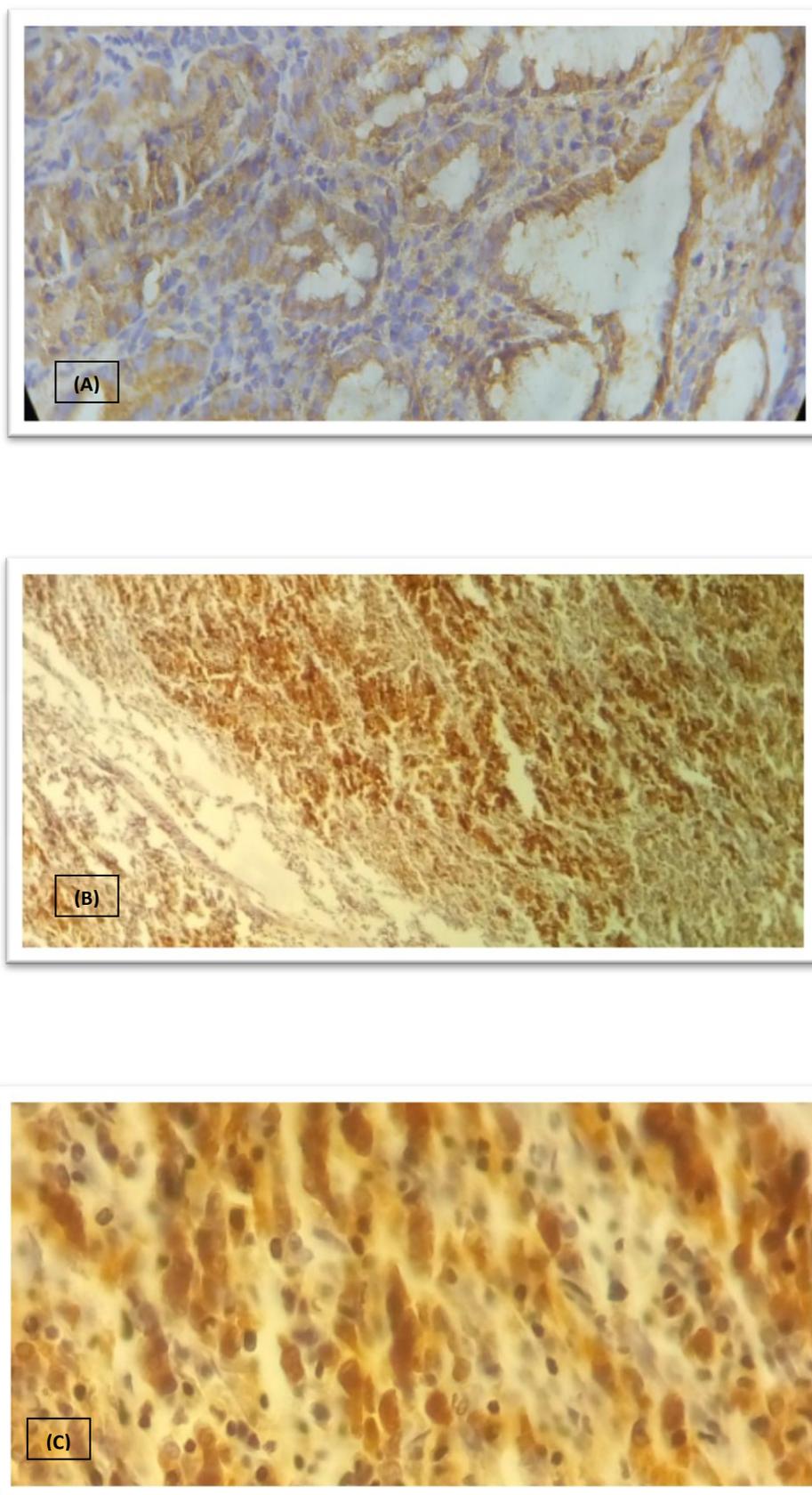


Figure 26 : Expressions de c-Cbl dans le cancer gastrique

(A): Expression de c-Cbl dans un adénocarcinome bien différenciée Gr 40X (B) : Expression de c-Cbl dans un adénocarcinome moyennement différenciée Gr 20X (C) : Expression de c-Cbl dans un adénocarcinome moyennement différenciée Gr 40X

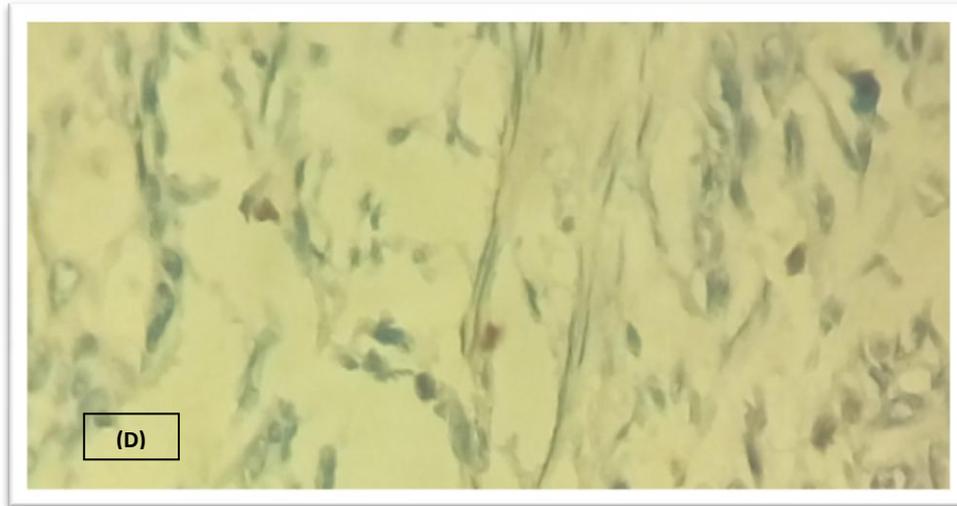


Figure 27 : Marquage négative de c- Cbl dans un tissu non cancéreux « cas témoin » Gr 40X

La protéine c-Cbl a été retrouvée surexprimée dans les tissus des cancers gastriques, 34 cas infiltrant et 43 cas non infiltrant, en outre la protéine c-Cbl a été exprimée dans les stades avancés comme dans les stades précoces ($p = 0,5$).

En fonction du type histopathologique, nous avons observé une expression différentielle de c-Cbl dans les différents tissus pathologiques, néanmoins, l'expression de cette protéine a été plus notée dans le cancer différencié que dans les cas des cancers indifférenciés : 29 cas des adénocarcinomes moyennement différencié ont été marquée positivement suivi par 19 cas pour les adénocarcinomes bien différencié. (**Tableau 04**)

b-Score de distribution de la protéine c-Cbl :

L'analyse immunohistochimique a révélé que la protéine c-Cbl a été exprimée dans les cellules cancéreuses gastriques avec des scores différents et une intensité de coloration différente.

Le score observé le plus prédominant était le score 2 dans 20 cas (20,8%), suivie par le score 4 dans 16 cas (16,7%), puis les scores 3, 6 et 7 dans le même nombre de 12 cas. Les scores les moins importants étaient notés pour le score 0 dans 11 cas (11,5%); le score 5 dans 7 cas (7,3%) et enfin le score 1 dans 6 cas.

En ce qui concerne les niveaux de l'immuno-coloration; nous avons souligné une coloration intense dans 17 cas (17,7%); une coloration modérée dans 31 cas (32,3%); une faible coloration dans 27 cas (28,1%) et aucune coloration dans 21 cas (21,9%). (**Tableau 05,06**)

Tableau 04 : Etude de l'expression de c-Cbl en fonction des paramètres histopathologique et cliniques

Caractères clinicopathologique	Expression de C-Cbl [Patient No.%]			P
	(-)	(+)	(++)	
Sexe				
Homme	15(20,3)	31(44,9)	24(34,8)	0,6
Femme	3(14,8)	15(55,6)	8(29,6)	
Age				
≤ 60	6(14)	22(51,2)	15(34,9)	0,5
>60	12(22,6)	24(45,3)	17(32,1)	
Nature des échantillons				
Biopsie	10(15,6)	36(56,2)	18(28,1)	0,06
Opératoire	8(25)	10(31,2)	14(43,8)	
Infiltration				
Oui	9(20,9)	21(48,8)	13(30,2)	0,8
Non	9(17)	25(47,2)	19(35,8)	
TNM				
T1	9(17)	25(47,2)	19(35,8)	0,5
T2	2(10,5)	10(52,6)	7(36,8)	
T3	7(29,2)	11(45,8)	6(25)	
GG				
Oui	6(25)	12(50)	6(25)	0,5
Non	12(16,7)	34(47,2)	26(36,1)	
Type Histopathologique				
Adénocarcinome bien différencie	5(19)	10(42,9)	9(38,1)	0,4
Adénocarcinome moyennement différencie	4(12,1)	17(51,5)	12(36,4)	
Adénocarcinome peu différencie	3(23,5)	9(58,8)	3(17,6)	
carcinome à cellule indépendante	6(30)	9(45)	5(25)	
Carcinome colloïde	0	1(25)	3(75)	

Tableau 05: Le score de la c-Cbl

Score de la protéine	nombre	Pourcentage %
0	11	11.5
1	6	6.3
2	20	20.8
3	12	12.5
4	16	16.7
5	7	7.3
6	12	12.5
7	12	12.5
Total	96	100

Tableau 06: Intensité du marquage de la c-Cbl

Immunomarquage	nombre	Pourcentage %
Pas de marquage	21	21.9
Marquage faible	27	28.1
Marquage modéré	31	32.3
Marquage intense	17	17.7
Total	96	100

IV.3.2-Protéine Cbl-b :

Des 96 de cancer gastrique, 51 cas ont exprimé la protéine Cbl-b à des degrés divers. Le taux de coloration positif pour cbl-b dans les tissus gastrique cancéreux était de 53,1%. Cependant aucune coloration n'a été observée dans la série des cas témoins (**Figure 28,29**).

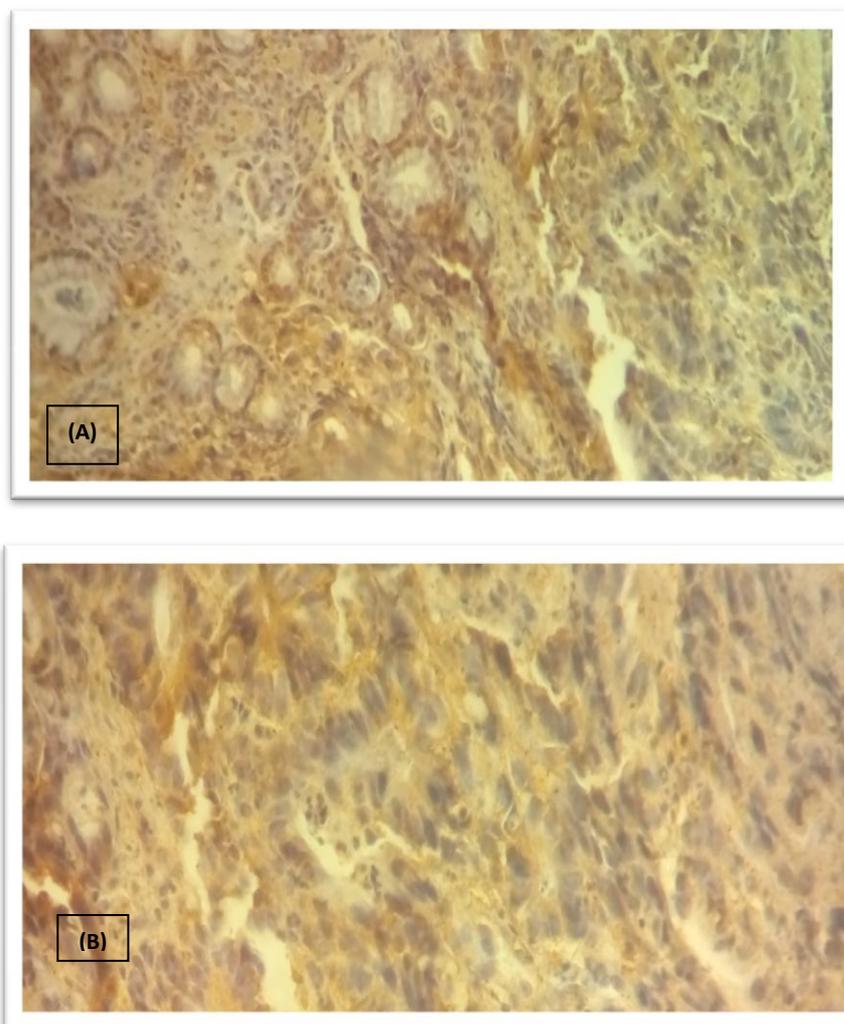


Figure 28 : Expressions de Cbl-b dans le cancer gastrique

(A): Expression de Cbl-b dans un carcinome à cellule indépendante différenciée Gr 20X

(B) : Expression de Cbl-b dans un carcinome à cellule indépendante différenciée Gr 40X

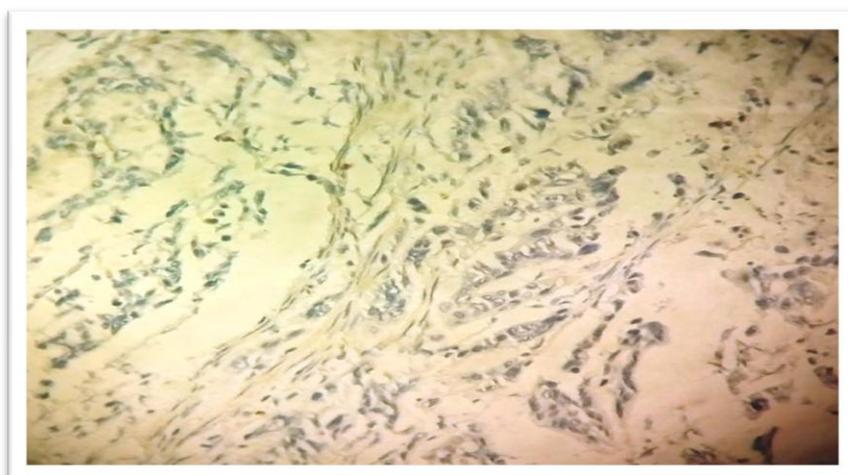


Figure 29 : Marquage négative de c- Cbl dans un tissu normal « cas témoin » GR 40X

a-Relation entre la positivité de l'expression des protéines Cbl-b et les différents paramètres clinicopathologique: Tableau 06

En ce qui concerne les niveaux de immunocoloration de CBL-b, nous avons rapporté une intense coloration dans 14 cas (14,6%); une coloration modérée dans 16 cas (16,7%); une faible coloration dans 14 cas (14,6%) et aucune coloration dans 52 cas (54,2%) (**Figure 28,29**).

L'étude de l'expression de protéines CBL-b n'a pas démontré une corrélation entre le niveau d'expression de cette protéine et la présence de métastases ganglionnaires dans les tissus cancéreux. De même aucune corrélation n'a été retrouvée avec les différents stades pathologiques du cancer gastrique ($p > 0,05$). D'un autre côté, les protéines CBL-b ont été retrouvées exprimées au même degré dans les tissus cancéreux infiltrant et non infiltrant. (**Tableau 07**)

Tableau 07 : Etude de l'expression de Cbl-b en fonction des paramètres histopathologiques et cliniques

Caracteristiques clinicopathologiques	expression Cbl-B [Patient No.%]			P
	-	+	++	
Total	45(46,9)	32(33,3)	19(19,8)	
Sexe				
Homme	31(43,5)	24(34,8)	15(21,7)	0,5
Femme	14(55,6)	8(29,6)	4(14,8)	
Age (years)				
≤60	17(39,5)	14(32,6)	12(27,9)	0,1
>60	28(52,8)	18(34)	7(13,2)	
Nature des échantillons				
Biopsie	28(43,8)	23(35,9)	13(20,3)	0,6
Pièces opératoires	17(53,1)	9(28,1)	6(18,8)	
Infiltration				
Oui	20(46,5)	14(32,6)	9(20,9)	0,9
Non	25(47,2)	18(34)	10(18,9)	
Stade TNM				
T1	25(47,2)	18(34)	10(18,9)	0,7
T2	7 (36,8)	8(42,1)	4 (21,1)	
T3	13(54,2)	6 (25)	5(20,8)	

GG				
Oui	14(58,3)	6(25)	4(16,7)	0,4
Non	31(43,1)	26(36,1)	15(20,8)	
Type Histologique				
Adénocarcinome bien différencié	13(47,6)	7 (33,3)	4 (19)	
Adénocarcinome moyennement différencié	12(36,4)	13(39,4)	8 (24,2)	0,04
Adénocarcinome peu différencié	11(76,5)	02 (176)	1 (5,9)	
carcinome à cellule indépendante	6(30)	9(4)	5(25)	
Carcinome colloïde	4(100)	0	0	

b- Score de distribution de la protéine Cbl-b :

Le score observé le plus prédominant était le score 0 dans 20 cas (38,5%), suivie par le score 2 dans 13 cas (13.5%), puis les scores 3, 4 et 5. Les scores les moins importants notés étaient le score 1, 6 dans même nombre 11 cas (11,5%). (**Tableau 07**)

En ce qui concerne les niveaux de l'immuno-coloration; nous avons souligné une coloration faible et intense dans 14 cas (14,6%); une coloration modérée dans 16 cas (16.7%). (**Tableau 08**)

Tableau 08 : Distribution du score immunologique de la protéine Cbl-b

Score de la protéine	nombre	Pourcentage %
0	37	38.5
1	6	6.3
2	13	13.5
3	12	12.5
4	11	11.5
5	7	7.3
6	7	7.3
7	6	6.3
Total	96	100

Tableau 09 : Distribution immunomarquage de la protéine Cbl-b

Immunomarquage	nombre	Pourcentage %
Pas de marquage	52	54.2
Marquage faible	14	14.6
Marquage modéré	16	16.7
Marquage intense	14	14.6
Total	96	100

IV.3.3-Le récepteur membranaire EGFR :

a-Relation entre la positivité de l'expression des protéines EGFR et les différents paramètres clinicopathologique : (Tableau 10)

EGFR a été détectée dans la région cytoplasmique et / ou membranaire des cellules cancéreuses gastriques avec une coloration en granules brunes jaunâtre homogène. (**Figure 30**). Cependant, aucune coloration n'a été observée pour EGFR dans les tissus gastriques non cancéreux.

Le marquage positif de l'EGFR (dans 50 cas) a été démontré corrélé à la présence de métastases et des ganglions lymphatiques et aux stages pathologiques avancés du cancer gastrique, $p = 0,001$.

D'un autre côté, la coloration positive de l'EGFR a été très remarquable dans les cas de cancer infiltrant que dans les cancers non infiltrant, $P = 0.001$ (**Tableau 10**).

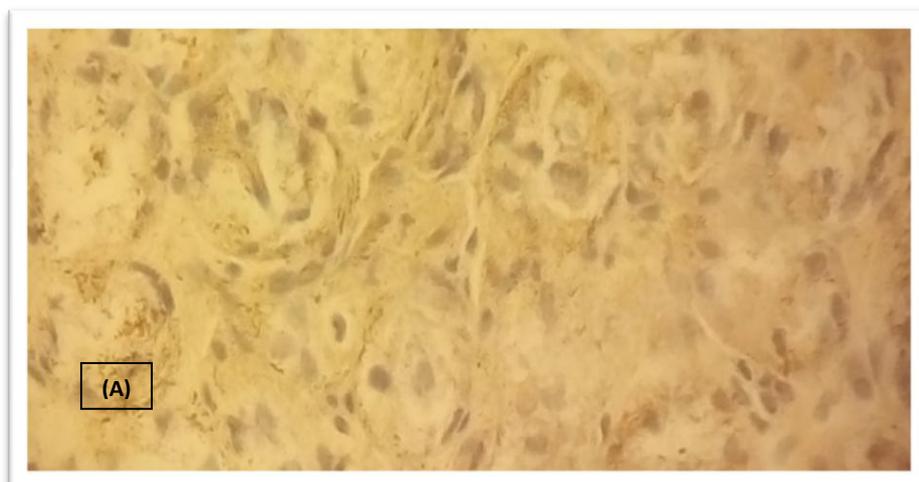


Figure 30 : Expressions EGFR dans le cancer gastrique

A : Expression d'EGFR dans un carcinome à cellule indépendante différenciée Gr 40

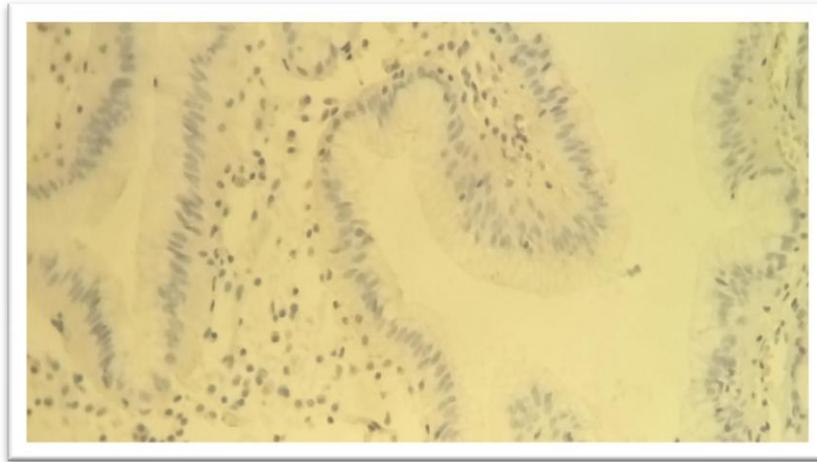


Figure 31 : Expressions EGFR dans un tissu normal Gr 20X « cas témoin » immunomarquage négative

Tableau 11 : Etude de l'expression de l'EGFR en fonction des paramètres histopathologiques et cliniques

Caracteristiques clinicopathologique & EGFR	EGFR			P
	(-)	(+)	(++)	
Total	46(47,9)	23(24)	27(28,1)	
Sexe				
Homme	34(47,8)	15(21,7)	21(30,4)	0,6
Femme	12(48,1)	8(29,6)	6(22,2)	
Age				
≤ 60	22(51,2)	12(27,9)	9(20,9)	0,3
>60	24(45,3)	11(20,8)	18(34)	
Nature des lames				
Biopsie	34(53,1)	13(20,3)	17(26,6)	0,3
Opératoire	12(37,5)	10(31,2)	10(31,2)	
Infiltration				
Oui	8(18,6)	19(44,2)	16(37,2)	0,00
Non	38(71,7)	4(7,5)	11(20,8)	1
TNM				
T1	38(71,7)	4(7,5)	11(20,8)	
T2	4(21,1)	9(47,4)	6(31,6)	0,00
T3	4(16,7)	10(41,7)	10(41,7)	1
GG				
Oui	3(12,5)	11(45,8)	10(41,7)	0,00
Non	43(59,7)	12(16,7)	17(23,6)	1

Type Histologique				
Adénocarcinome bien différencié	7(33,3)	5(19)	12(47,6)	
Adénocarcinome moyennement différencié	15(45,5)	9(27,3)	9(27,3)	
Adénocarcinome peu différencié	10(58,8)	2(17,6)	3(23,5)	0,2
Adénocarcinome à cellule indépendante	14(65)	5(25)	1(100)	
Carcinome colloïde	1(25)	1(25)	2(50)	

b-Etudes de la corrélation d'expression entre l'EGFR, c-CBL et CBL-b

Après l'analyse et l'étude statistique de nos résultats, nous avons observé une expression différentielle de c-Cbl et EGFR dans les différents tissus du cancer gastrique, néanmoins, l'expression de ces deux protéines a été plus notée dans le cancer différencié que dans les cas indifférenciés. Les résultats de l'association de Cbl et EGFR sont résumés dans le (Tableau 11)

La Co-expression des deux protéines EGFR et CBL-b a été observée dans 27 cas parmi les 96 cas étudié et a été plus notée dans les cas de cancer différenciés que dans les cas indifférenciées (Tableau 12).

Tableau 12 : relation entre l'expression de l'EGFR et la protéine c-Cbl

Expression d'EGFR	patients	expression de c-Cbl			P
		(-)	(+)	(++)	
Pas de marquage (-)	46	11 (23,9)	22(47,8)	13 (28,3)	
Marquage modérée (+)	23	3 (13)	9 (39,1)	11(47,8)	0,4
Marquage intense (++)	27	4 (14,8)	15(55,6)	8(29,6)	

Tableau 13: relation entre l'expression de l'EGFR et la protéine Cbl-b

EGFR expression	patients	expression Cbl-b			P
		(-)	(+)	(++)	
Pas de marquage (-)	46	22 (47,8)	16(34,8)	8 (17,4)	0,2
Marquage modérée (+)	23	10 (43,5)	5 (39,1)	8 (34,8)	
Marquage intense (++)	27	13 (48,1)	11(40,7)	3(11,1)	

IV.4-Discussion:

La collecte des données a été effectuée sur une période de 3 ans avec un effectif total de 113 patients dont 96 cas de cancer gastrique et les 17 autres considérés comme témoins présentant d'autres pathologies gastriques non cancéreuses. Les fiches de collecte pré établies étaient remplies manuellement. Les variables épidémiologiques, histologiques et l'étude immunohistochimique des protéines Cbl et du récepteur membranaire EGFR étaient concernés. Les difficultés rencontrées lors de la collecte des données étaient : la délocalisation de certains patients et le décès d'autres.

IV.4.1-Epidémiologie :

Le cancer de l'estomac reste fréquent et représente la deuxième cause de mortalité par cancer dans le monde après le cancer du poumon avec une estimation de 880000 nouveaux cas et 650000 décès par an. (Canedo P, 2007) Il s'agit d'un cancer extrêmement fréquent dans certains pays comme le Japon (incidence d'environ 70 pour 100000 habitants) ou certaines parties de l'Amérique centrale et du sud. Il est, en revanche, en diminution constante depuis les vingt dernières années dans les pays européens; ce cancer est rare en Afrique. (Fuchs CS, 1995; Crew KD, 2004) Le nombre de nouveaux cas est estimé à environ 7000 par an et celui de décès à 5000 par an en France, où il se situe au troisième rang des cancers digestifs chez l'homme après le cancer colorectal et le cancer de l'œsophage et au deuxième rang chez la femme après le cancer colorectal. Au Maroc sa prévalence est estimée à 24.8% (Alhilal M., 2005). La fréquence évolue différemment en fonction des types de cancer

IV.4.2-Sexe :

Le sexe masculin était le plus représenté dans notre étude avec un sex ratio de 2.7. Ce résultat est comparable à plusieurs études aussi bien en Afrique que dans les autres continents (**Toukara I M, 2012 ; Afuwape O, 2011 ; Kim jong Gwang, 2010**) où le cancer gastrique touche plus les hommes que les femmes respectivement avec comme valeurs : 1,62 ; 1,45 ; 1,26.

IV.4.3-Age :

La tranche d'âge la plus touchée dans notre étude était celle de 50-70 ans. Les âges variaient de 27 à 87 ans. La moyenne d'âge était de 60 ans. Nos résultats sont proches de ceux trouvés par étude de **Toukara M en 2012** avec une moyenne d'âge de 57 ans et de étude de **Coulibaly W en 2010** avec une moyenne d'âge de 55,90 ans au Mali (**Coulibaly W, 2010 ; Toukara I M, 2012**).

Nos résultats également se rapprochent de ceux obtenus par **Ouattara et al** avec 58 ans au Burkina Faso (**Ouattara H, 2004**) mais supérieur à ceux notés par **Afuwape** qui a noté 52,6 ans au Nigéria (**Afuwape O, 2011**).

Par ailleurs, notre moyenne d'âge est inférieure à celles d'autres auteurs : **Saito** avec 62 ans au Japon en 2008 (**Saito H, 2009**); **David D** a trouvé une moyenne d'âge de 71ans aux USA en 2005 ; (**David D, 2005**). En 2009 **Pinto** en Italie à noté respectivement 68 ans et 63,5 ans (**Pinto C, 2009**).

Cette différence entre les continents pourrait s'expliquer par :

- Une moindre exposition aux facteurs de risques et favorisants dans les pays développés ; cela par une meilleure prise en charge des gastrites et une bonne conservation des aliments au froid.

- La jeunesse de la population africaine en général par exemple.

En effet, selon une étude démographique réalisée en 2002 (EDSM IV) : 50% de la population malienne avait moins de 25 ans (**Samaké S, 2006**).

IV.4.4-Aspects anatomo-pathologiques :

a-Localisation de la tumeur :

Dans notre étude, l'antrale était prédominant dans 40 des cas. Ce résultat est inférieur à celui de Coulibaly W avec 46% (**Coulibaly W, 2010**), mais supérieur à celui de Koné Y avec 31,2% (**Koné Y, 2006**).

Par contre au Mali (**Ouattara H, 2004**) et Sawadogo A et al au Burkina-Faso (**Sawadogo A, 2000**) ont trouvé une prédominance de la localisation antro-pylorique avec respectivement 84,04 % et 77%.

En Afrique, nous constatons une prédominance de la localisation distale (antrale et antro-pylorique) de ces cancers à été constaté. Cette prédominance de la localisation distale serait liée à la prévalence de l'infection à H. pylori (**Faik M, 2000**).

Nous avons trouvé une proportion de 8 cas de la localisation cardiaque. Ce résultat est comparable à celui de Tounkara M avec 9% (**Tounkara I M, 2012**), mais il est différent de ceux des séries américaines qui ont trouvées en 2009 une prédominance cardiaque avec 47% par Gill S au Canada (**Gill S, 2003**) et 43% par Heise H au Chili (**Heise H, 2009**).

L'incidence du cancer du cardia est en augmentation dans les pays développés depuis 1970 (**Gill S, 2003**).

b-Aspects macroscopiques :

Dans notre étude, l'aspect ulcéro-bourgeonnant était prédominant avec 77 des cas. Ce résultat est comparable à celui de DIARRA M (**Diarra M, 2005**) au Mali en 2005 avec 83,5%. Mais il est supérieur à ceux d'AYITE et al. (**Ayite Ae, 2004**) au Togo en 2004 avec 49,2% et de Koff et al (**Koffi E, 1999**) en Côte d'Ivoire en 1999 avec 44%.

c-Aspects microscopiques :

L'adénocarcinome plus dominant dans les formes histologiques dans notre étude, ce résultat est comparable à ceux des séries maliennes DIARRA (**Diarra M, 2005**) avec 97,1% en 2005 et de SISSOKO (**Sissoko D, 2009**) avec 99,2% en 2009 ; de Glehen et al (**Glehen O, 2000**) en France en 2000 avec 100%. Notre taux est supérieur à ceux des auteurs africains (**Coulibaly B, 2007 ; Koné Y, 2006, Ayite Ae, 2004**) respectivement : 83,9% ; 84,4% et 87%.

IV.4-Immunohistochimie :

IV.4.1-La protéine c-Cbl et EGFR :

Des études initiales sur la localisation de c-Cbl a montré que c-Cbl est principalement une protéine cytosolique, ce qui suggère que Cbl se trouve aussi bien au niveau de la membrane et du cytosquelette, et que cette localisation est importante pour la médiation des effets biologiques de c- Cbl. Les protéines Cbl sont composées de différents sites leur permettant l'interaction avec d'autres molécules de signalisations.

Ainsi, les protéines Cbl se sont révélés / interagir avec les récepteurs membranaires activés, tels que EGFR (**Reiko I, 2004 ; Dong Q, 2010**).

Plusieurs rapports ont montré que c-Cbl par son activité d'ubiquitylation regule négativement le recepneur EGFR. Des études récentes ont suggéré que le système récepteur / ligand EGF a été impliqué dans la prolifération de la muqueuse gastrique et la mise au point de survenue d'un cancer gastrique, et que la surexpression ou l'activation de l'EGFR a été fortement lié à au mauvais pronostic du cancer de l'estomac (**Dong Q, 2010; CelikelC,2007**).

Les mutations au sein de c-Cbl ou au niveau de ces domaines d'interaction, peuvent conduire à la conversion de c-Cbl en un oncogène modifiant, ainsi, ses fonctions (**Sehat B, 2008**).

La plupart des formes oncogéniques de Cbl sont soupçonnés d'agir d'une manière négative dominante en concurrence avec la forme sauvage c-Cbl pour la liaison, ce qui interfère avec la réponse cellulaire physiologique (**Holmqvista K, 2005**).

La dérégulation de l'activité de l'EGFR est un facteur clé dans la transformation cellulaire et le cancer (**Celikel C, 2007**).

La régulation négative correcte de l'EGFR et l'atténuation de la signalisation de l'EGFR sont donc essentiels dans le maintien de l'homéostasie. Il devient évident que Cbl joue un rôle de premier plan dans la régulation a la baisse de l'EGFR et ceci en raison de son activité E3 Ub ligase (après stimulation par EGF, Cbl est recruté par EGFR activé, en s'associant directement via domaine de liaison TKB avec phosphotyrosine 1045 (pY1045) sur EGFR) (**Pennock S, 2008 ; Hien, C. B, 2001**).

L'étude de Qian Dong a montré des niveaux d'expression élevés de C-CBL et EGFR dans les cancers gastriques. En outre, l'expression de C-CBL est liée à la profondeur de l'infiltration et aux stades pathologiques avancés du cancer de l'estomac (**Dong Q, 2010**).

Les études actuellement nationales et étrangères en ce qui concerne la coexpression de Cbl, d'EGFR et leur corrélation dans la carcinogenèse sont rares.

En fait, dans un seul rapport pertinent, des scientifiques japonais **Ito et al** ont mesuré la co-expression de c-CBL et EGFR dans le cancer gastrique (**Reiko I, 2004**). Leur étude a révélé que l'expression de c-Cbl était positive dans 67% des cas et a été corrélée avec la profondeur d'infiltration de la tumeur et la présence de métastases ganglionnaires.

En outre, elle a été positivement corrélée à l'expression de l'EGFR, et les patients avec une coexpression c-Cbl et EGFR avaient un mauvais pronostic (**Davies, G. C, 2004 ; Li, 2014**).

Dans notre étude, la protéine c-Cbl a été exprimée dans les stades avancés comme dans les premiers stades ($p = 0, 5$) à la différence d'expression de l'EGFR qui est très significative aux stades avancés ($p = 0,001$) et en corrélation avec la profondeur de l'invasion et les métastases ganglionnaires. Nos résultats ont été différents de ceux rapportés antérieurement par la littérature; cette différence pourrait être expliquée par la différence de méthodologie ou de population. De manière très intéressante, l'étude de Reiko Ito suggère que Cbl dans le cadre d'un système d'EGFR peut être associé à la carcinogenèse de l'estomac, l'invasion et métastasi (**Reiko I, 2004**).

En résumé c-Cbl joue un rôle dans la régulation à la baisse des PTK, peut-être grâce à sa capacité d'ubiquitinylation (**Thien CB, 2005, Thien CB, 2010**), ce qui permet la survie de des cellules malignes sur exprimant c-Cbl en les rendant tolérant aux composés oxydants, en outre, c-Cbl pourrait promouvoir le renouvellement de ces composés comme suggéré par Yacoub et al. (**Yakoub S, 2014**) et les rapports de Molero et al. (**Thien CB, 2010 ; Molero JC, 2006**) augmentant ainsi la mutation dans les cellules cancéreuses ainsi que les cellules cancéreuses gastriques (**Yakoub S, 2014 ; Sproul AA, 2009**).

D'autres études avec grande cohorte et l'utilisation d'autres méthodes sont nécessaires pour fournir de plus amples explications sur la façon dont le niveau élevé d'expression de la protéine CBL pourrait jouer un rôle dans la carcinogenèse gastrique.

IV.4.2-Protéine Cbl-b et EGFR

Les protéines Cbl-b en tant que des E3 ubiquitine ligases peuvent contrôler négativement plusieurs signaux conduisant, ainsi, à la dégradation des récepteurs tyrosine-kinase (TKR) (**Gayathri S, 2006; Levkowitz, G, 1998; Ota, Y, 1997**) ou le trafic d'endocytose (**Steven Pennock, 2008 ; Kristina Holmqvista , 2005**) et ont donc un rôle important dans le maintien de l'homéostasie dans le corps (**Marion M, 2003**). Bien qu'il soit un rôle important dans le maintien de l'hémostase, l'état de l'expression immuno-histochemique des protéines Cbl-b est rarement rapporté dans les tissus de cancers. Ici, nous essayons de mettre l'accent sur le statut de l'expression de l'onco-protéines Cbl-b et EGFR dans le cancer gastrique par un protocole immunohistochimique. L'expression de la protéine Cbl-b a été détectée dans 53,1% des carcinomes gastriques, ce qui était beaucoup plus faible que 82,3% rapporté par Dong et al (**Qian Dong, 2010**).

En outre, le statut d'expression de cbl-b n'a pas été lié à la profondeur de l'infiltration et des stades pathologiques avancés du cancer gastrique. Par contre dans une autre étude, il a été souligné que l'expression de Cbl-b présente une corrélation positive avec la présence de métastases ganglionnaires dans le cancer gastrique (**Qian Dong, 2010**) et que l'expression diffuse de Cbl était significativement associée aux métastases ganglionnaires des cellules tumorales.

De plus, certaines études ont également suggéré que les protéines CBL ont été impliquées dans la promotion de l'infiltration de cellules tumorales (**Nam JM, 2007**). L'inhibition des effets CBL en utilisant des petites molécules d'ARN interférant ou des du gène *CBL* a confirmé que cette protéine a été impliquée dans l'infiltration du cancer du sein (**Nam JM, 2007**).

Cependant, une autre étude a révélé que la Cbl-b réprime la transition dans les cellules épithéliales et les cellules mésenchymateuses induite par le facteur de croissance 1 analogue à l'insuline (IGF-1). Ceci probablement en ciblant le récepteur de l'IGF-1, entraînant une dégradation et une inhibition supplémentaire des voies de signalisation Akt / ERK-miR200c ZEB2 dans des cellules de cancers gastriques et une diminution du risque de développer des métastases ganglionnaires chez les patients atteints de cancers gastriques (**Li H, 2014**).

D'autre part, différentes études ont montré que Cbl-b est impliqué dans l'apoptose des cellules de cancer gastrique induite par bufaline (**Li, D, 2009**), et que ce Cbl-b était hyper-régulée au

cours de l'apoptose induite par DNR et EPI dans les cellules de leucémie RBL-2H3. Ainsi, il semblerait que la la surexpression de Cbl-b favorise l'inhibition de la viabilité et des effets induisant l'apoptose des inhibiteurs de certains tumeur et leucémie (ubiquitine ligase Cbl-b sensibilisent les cellules leucémiques et les cellules du cancer gastrique aux anthracyclines en activant la voie mitochondriale et la modulation de signaux de survie d'Akt et d'ERK **(Xiujuan Qua, 2009)**)

Conclusion

Conclusion :

Ce projet a été centré sur l'étude de la signification pathologique et pronostique du niveau d'expression des protéines de la famille CBL « C-Cbl, Cbl-b » et le récepteur membranaire EGFR dans les tissus des patients atteints de cancer gastrique.

En résumé, les résultats de notre étude ont montré que les protéines Cbl et EGFR sont histochimiquement exprimés à des niveaux importants dans le cancer gastrique humain et ainsi peuvent avoir des implications importantes dans le développement de ce type de pathologie. Surtout que divers récentes études ont souligné le rôle des protéines Cbl en tant que molécule adaptatrice qui peut agir comme une oncoprotéine modulant différentes voies de signalisation. En particulier celles qui assurent le maintien des processus de la survie et la prolifération cellulaire et même l'angiogenèse telle que les voies : MEK / ERK et PI3K / Akt. Par conséquent, il est très important d'étudier les différentes activités biologiques de cette oncoprotéine.

Ainsi notre étude avec les travaux internationaux suggèrent que les protéines Cbl et EGFR peuvent être considérés comme des indicateurs de pronostic dans le cancer gastrique. De même, Cbl est soupçonné d'être un nouveau marqueur de dérèglement moléculaire dans les tumeurs malignes humaines associés à la surexpression des récepteur de facteurs de croissance. De ce fait, il peut être vu comme une opportunité thérapeutique dans les tumeurs malignes humaines: néoplasmes myéloïdes avec des mutations Cbl, le cancer du poumon, le cancer gastrique, cancer de l'ovaire et le cancer du sein Etc.

Enfin, des études plus détaillées relatives à la structure et la fonction des protéines Cbl dans les tissus cancéreux sont nécessaires afin d'être utilisé comme cible thérapeutique spécifique et ou comme bio marqueur spécifique de diagnostic clinique.

Références
Bibliographiques

A

Acconcia, F., Sigismund S., and Polo S. (2009). Ubiquitin in trafficking: the network at work. *Exp Cell Res.* **315**(9): p. 1610-8.

Afuwape OO, Irabor Do, Ladipo J K, Ayandipo B. (2011). A Review of the Current Profile of Gastric Cancer Presentation in the University College Hospital Ibadan, a Tertiary Health Care Institution in the Tropics. *J Gastro in test cancer,*

Alhilal M. (2005). Epidémiologie du cancer (malades de l'INO entre 1985-2002). *Le cancer au Maroc.*

Amin DN, Campbell MR, Moasser MM. 2010 The role of HER3, the unpretentious member of the HER family, in cancer biology and cancer therapeutics. *Semin Cell De Biol.*;21(9):944-50.

Andoniou C. E, Thien C. B, and Langdon W. Y. (1994) .Tumour induction by activated abl involves tyrosine phosphorylation of the product of the cbl oncogene. *EMBO J.*13: 4515–4523

Aparicio T, Yacoub M, Karila-Cohen P, René E. 2004. Adénocarcinome gastrique : notions fondamentales, diagnostic et traitement. *Encyclopédie Médico-chirurgicale* 9-027-A-10 1(1) :1-84.

Ayite Ae, Adodo K, Dosseh E, Abita T, Ocloo A. (2004). Prise en charge du cancer primitif de l'estomac au CHU de Lomé : A propos de 63 cas. *Tunis;* 82 (8):747-52.

Azria D, Spano J. 2006 *Thérapies ciblées en cancérologie: Libbey Eurotext;*

B

Ballian A, Sorensen B, Barri-Ova N, Sitruk V, Asmacios A, MII K. 2009. Tumeurs de l'estomac. *Hépatogastro-entérologie.*: 385-400.

Bisson S. A., Ujack E. E. and Robbins S. M. (2002). Isolation and characterization of a novel, transforming allele of the c-Cbl proto-oncogene from a murine macrophage cellline. *Oncogene* **21**: 3677–3687

Bonita D. P., Miyake S., Lupper M. L. Jr, Langdon W. Y. and Band H. (1997). Phosphotyrosine binding domain-dependent upregulation of the platelet-derived growth factor receptor alpha signaling cascade by transforming mutants of Cbl: implications for Cbl's function and oncogenicity. *Mol. Cell. Biol.* **17**: 4597–4610.

C

Camilo A, Thomas P. (2010). Memento de pathologie. 3ème édition. Paris:Vermazobres Grego: 76-83.

Canedo P, Machado J.C.(2007). Prédiposipion génétique au cancer gastrique. Acta endoscopia, Springer; 37 :22 , 239-247

Cai W, Niu G, Chen X. Multimodality imaging of the HER-kinase axis in cancer. Eur J Nucl Med Mol Imaging. 2008 Jan;35(1):186-208.

Celikel C, Eren F, Gulluoglu B, et al. (2007). Relation of neuroendocrine cells to transforming growth factor -alpha and epidermal growth factor receptor expression in gastric adenocarcinomas: prognostic implications. Pathol Oncol Res, 13 (3):215-226

Coulibaly B.(2007). Cancer de l'estomac, type de résection et survie : expérience de service de la chirurgie «A» de l'Hôpital du Point du « G » de 2004 à 2006 Mali [Thèse : Med]. Bamako : Université de Bamako: 07M35.

CoulibalyY W. (2010). Aspects épidémiologiques, cliniques et thérapeutiques des cancers de l'estomac à Bamako [Thèse : méd]. Bamako : Université de Bamako. 10M560.

Crew KD, Neugut Al. (2004). Epidemiology of upper gastrointestinal malignancies. Semin Oncol ; 31 :450-464.

Correa P, Piazuolo MB. 2008. Natural history of Helicobacter pylori infection. Dig Liver Is; 40(7):490-6.

D

Dalley M. (2007). Anatomie médicale : aspects fondamentaux et applications cliniques 2e éd. Boeck, Paris: 395-396.

Davies, G. C., S. A. Ettenberg, A. O. Coats, M. Mussante, S. Ravichandran, J. Collins, M. M. and Nau, S. (2004). LipkowitzCbl-b interacts with ubiquitinated proteins; differential functions of the UBA domains of c-Cbl and Cbl-b. Oncogene. 23:7104–7115.

David D, Rebecca R, Roderich E. 2005. Impact of lymph node count on staging and survival after gastrectomy for gastric cancer: data from a large US-population database. Journal of Clinical Oncology. 23:7114-7124.

Diarra M, Diarra A, Dolo M, Kamaté B, D' Horpock A.F.(2005). Etude clinique, endoscopique, anatomo-pathologique et pronostic des cancers de l'estomac en milieu rural. Acta endoscopica; 2 (35): 233-38.

Dong Q, Liu Y, Qu X, et al. (2010). Expression and clinical significance of c-Cbl, Cbl-b, and epidermal growth factor receptor in gastric carcinoma ; Chinese Journal of Cancer ; Vol.29 Issue 1

Dong J, Opresko LK, Dempsey PJ, Lauffenburger DA, Coffey RJ, Wiley HS. 1999 Metalloprotease-mediated ligand release regulates autocrine signaling through the epidermal growth factor receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.*;96(11):6235-40.

E

Edge S, Byrd D, Compton C. (2010). *AJCC Cancer Staging Manual*, 7th Ed. New York: Springer.

F

Faik M. (2000). Mise au point sur l'infestation gastrique à l'*Helicobacter pylori*. *Médecine du Maghreb*;79 : 17-19

Fiore F., Ollendorff V. and Birnbaum D.(2001). Characterization of the mouse *Cblc/Cbl3* gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **280**: 182–187

Fuchs CS, Mayer RJ. (1995). Gastric carcinoma. *New England journal of medicine.* 333; 32-41.

G

Galisteo M. L., Dikic I., Batzer A. G., Langdon W. Y. and Schlessinger J.(1995).Tyrosine phosphorylation of the c-cbl proto-oncogene protein product and association with epidermal growth factor (EGF) receptor upon EGF stimulation. *J.Biol. Chem.* **270**: 20242–20245.

Gayathri S and Alexander Y.T. (2006). The Cbl Family Proteins: Ring Leaders in Regulation of Cell Signaling. *Journal of cellular physiology.* 209:21–43

Gérard T. 2005.Evaluation de nouvelles associations d'agents antinéoplasiques dans le traitement des cancers gastriques [Thèse : Med]. Reims : Université de Reims Champagne – Ardenne.

Gilman A. G., Simon M. I., Bourne H. R., Harris B. A., Long R., Ross E. M. et al.(2002). Overview of the Alliance for Cellular Signaling. *Nature* **420**: 703–706

Gill S, Shah A, Le N, Cook EF, Yosida EM.(2003). Asian Ethnicity Related Differences in Gastric Cancer Presentation and Outcome Among Patients Treated at a Canadian Cancer Center. *Journal of clinical oncology*; 21(11): 2070-76

Glehen O, Traverse A, Peyrat P. (2000). L'adénocarcinome de l'estomac : Evolution du traitement chirurgical dans une série de 350 cas. *Ann Chir*; 125:744-51.

Globocan. (2000). Cancer Incidence, Mortality and Pervallence Worldwide. *Cancer Base* N°5.

H

- Hamilton SR, Aaltonen LA. (2000). Histological classification of gastric tumours. In: S. R. Hamilton and L.A. Aaltonen (eds), World Health Organization Classification of Tumours of the Digestive System. Lyon, France: IARC Press,
- Hamilton E., Miller K. M., Helm K. M., Langdon W. Y. and Anderson S. M. (2001). Suppression of apoptosis induced by growth factor withdrawal by an oncogenic form of c-Cbl. *J. Biol. Chem.* **276**: 9028–9037
- Hien, C. B. and Langdon W. Y. (2001). Cbl: many adaptations to regulate protein tyrosine kinases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* . 2:294–307
- Heise H, Bertran E, Marcelo E, Andia ME, Ferreccio C. (2009). Incidence and survival of stomach cancer in a high-risk population of Chile. *World Gastroenterol*; 15:1854-62.
- Holmqvist K, Welsha M, Lub L. (2005). A role of the protein Cbl in FGF-2-induced angiogenesis in murine brain endothelial cells *Cellular Signalling*. 17: 1433 – 14
- Holbro T, Civenni G, Hynes NE. (2003). The ErbB receptors and their role in cancer progression. *Exp Cell Res.*;284 (1):99-110.
- Holbro T, Hynes NE. 2004. ErbB receptors: directing key signaling networks throughout life. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.*;44:195-217.
- Hubert P. 2007 [Growth factors of the EGF family and their receptors]. *Bull Cancer.*;94(7 Suppl):F137-45.

J

- Joazeiro C. A., Wing S. S., Huang H., Levenson J. D., Hunter T. and Liu Y. C. (1999). The tyrosine kinase negative regulator c-Cbl as a RING-type, E2- dependent ubiquitin-protein ligase. *Science* **286**: 309–312

K

- Kataoka H. 2009. EGFR ligands and their signaling scissors, ADAMs, as new molecular targets for anticancer treatments. *J Dermatol Sci.*;56(3):148-53.
- Keane, M.M; Rivero-Lezcano, O.M; Mitchell, J.A; Robbins, K.C & Lipkowitz, S. (1995). Cloning and characterization of cbl-b: a SH3 binding protein with homology to the c-cbl proto-oncogene. *Oncogene* 10: 2367-2377.
- Keane MM, Ettenberg SA, Nau MM, Banerjee P, Cuello M, Penninger J, Lipkowitz S. (1999). Cbl-3: A new mammalian cbl family protein. *Oncogene* 18(22):3365–3375.
- Kim M., Tezuka T., Suzuki Y., Sugano S., Hirai M. and Yamamoto T. (1999). Molecular cloning and characterization of a novel cbl-family gene, cbl- c. *Gene* **239**: 145–154

Kim jong Gwang, Ho chung, yu wansik. (1999). Les progrès récents de la chimiothérapie pour cancer gastrique avancé. *World J Oncol* , 15: 287-294.

Koffi E, Kouassi Jc.(1999). Le cancer gastrique : aspect épidémiologique et prise en charge en milieu tropical. *Médecine d'Afrique Noire*;46(1):52-55.

Koné Y. (2006). Cancer de l'estomac: Aspects épidémiologiques, cliniques et thérapeutiques [Thèse : Med]. Bamako : Université de Bamako:252.

Krall JA, Beyer EM, MacBeath G. 2011. High- and low-affinity epidermal growth factor receptor-ligand interactions activate distinct signaling pathways. *PLoS One*.;6(1):e15945.

L

Langdon, W.Y., Hartley, J.W., Klinken, S.P., Ruscetti, S.K. & Morse, H.C.d. (1989). v-cbl, an oncogene from a dual-recombinant murine retrovirus that induces early B-lineage lymphomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86: 1168-1172.

Langdon, W.Y, Hyland, C.D, Grumont, R.J. & Morse, H.C.D. (1989). The c-cbl proto-oncogene is preferentially expressed in thymus and testis tissue and encodes a nuclear protein. *J. Virol.* 63: 5420-5424

Langdon WY, Heath KG, Blake TJ. (1992). The localization of the products of the c-Cbl and v-cbl oncogenes during mitosis and transformation. *Curr Top Microbiol Immunol* 182:467–474.

Langdon, W.Y. (1995). The cbl oncogene: a novel substrate of protein tyrosine kinases. *Aust. N.Z. J. Med.* 25: 859-864.

Layke JC, Lopez PP. 2004 . Gastric cancer: Diagnosis and Treatment Options. *American Family Physician*; 69(5):1133-40.

Levkowitz, G., et al. (1996). Coupling of the c-Cbl protooncogene product to ErbB-1/EGF receptor but not to other ErbB proteins. *Oncogene*, **12**(5): p. 1117-25.

Levkowitz, G., H. Waterman, E. Zamir, Z. Kam, S. Oved, W. Y. Langdon, L. Beguinot, B. Geiger, and Y. Yarden.(1998). c-Cbl/Sli-1 regulates endocytic.

Li, D., Qu, X., Hou, K., Zhang, Y., Dong, Q., Teng, Y., Zhang, J. and Liu, Y. (2009). PI3K/Akt is involved in bufalin-induced apoptosis in gastric cancer cells. *Anticancer Drugs*. 20, 59–64.

Li H , Xu L, Li C, Zhao L, Ma Y, Zheng H, Li Z, Zhang Y, Wang R, Liu Y, Qu X. (2014). Ubiquitin ligase Cbl-b represses IGF-I-induced epithelial mesenchymal transition via ZEB2 and microRNA-200c regulation in gastric cancer cells. *Mol Cancer*; 13: 136 [PMID: 24885194 DOI: 10.1186/1476-45 98-13-136].

Liu J., Kimura A., Baumann C. A. and Saltiel A. R. (2002). APS facilitates c-Cbl tyrosine phosphorylation and GLUT4translocation in response to insulin in 3T3-L1 adipocytes. *Mol. Cell. Biol.* **22**: 3599–3609

Lo HW. 2010. Nuclear mode of the EGFR signaling network: biology, prognostic value, and therapeutic implications. *Discov Med.* 10(50):44-51.

M

Maconi G, Manes G, Porro GB. 2008. Role of symptoms in diagnosis and outcome of gastric cancer. *World J Gastroenterol*; 14(8):1149-55.

Martun L, Forest M. 2009. Anatomie et de physiologie humaine. Boeck ; Paris ; 555-557.

Marion M. Naua, Stan Lipkowitz. Comparative genomic organization of the cbl genes. *Gene* 308 (2003) 103–113

Maiga A. 2008. Aspect thérapeutique du cancer de l'estomac au service de chirurgie générale CHU Gabriel Touré.[Mémoire de fin de cycle CES chirurgie: med]. Bamako:université de Bamako; 42p

Meisner H., Daga A., Buxton J., Fernandez B., Chawla A.,Banerjee U. et al.(1997). Interactions of Drosophila Cbl with epidermal growth factor receptors and role of Cbl in R7 photoreceptor cell development. *Mol. Cell. Biol.* **17**: 2217–2225

Meng W., Sawasdikosol S., Burakoff S. J. and Eck M. J. (1999). Structure of the amino-terminal domain of Cbl complexed to its binding site on ZAP-70 kinase. *Nature* **398**: 84–90

Michel P, Carrère N, Lefort C, Pezet D, Rebischung C, Vendrely V, Y chou M. 2014 . «Cancer de l'estomac». Thésaurus National de Cancérologie Digestive.[en ligne],. [Cité le 11/06/2014]

Molero JC, Waring SG, Cooper A, Turner N, Laybutt R, et al. (2006). Casitas b-lineage lymphoma-deficient mice are protected against high-fat diet-induced obesity and insulin resistance. *Diabetes*.55:708-715.

Moon C, Chae YK, Lee J. 2010. Targeting epidermal growth factor receptor in head and neck cancer: lessons learned from cetuximab. *Exp Biol Med (Maywood)*.;235(8):907-20.

Mutter D, Marescaux J.(2006). Les gastrectomies pour cancer : principes généraux, anatomie vasculaire, anatomie lymphatique, curages. *Encyclopédie Médico-chirurgicale* 40-330-A

N

Nam JM, Onodera Y, Mazaki Y, et al. (2007). CIN85,a Cbl interacting protein,is a component of AMAP1 mediated breast cancer invasion machinery. *EMBO J* ,26 (3):647-656.

Nau, M. M. and S. Lipkowitz (2003). Comparative genomic organization of the cbl genes. *Gene*. 308: p. 103-13.

O

Odai H., Sasaki K., Iwamatsu A., Hanazono Y., Tanaka T., Mitani K. et al. (1995). The proto-oncogene product c-Cbl becomes tyrosine phosphorylated by stimulation with GM-CSF or Epo and constitutively binds to the SH3 domain of Grb2/Ash in human hematopoietic cells. *J. Biol. Chem.* **270**:10800–10805

Ota, Y., and L. E. Samelson. (1997). The product of the proto-oncogene c-cbl: a negative regulator of the Syk tyrosine kinase. *Science* 276:418–420.

Ouattara H, Sawadogo A, Ilboudo P.D et Al. (2004). Le cancer de l'estomac au centre national Sanou Souro (CHNSS) de Bobo Dioulasso: Aspects épidémiologiques. A propos de 58 cas de janvier 1996 à juin 1999. *Med d'Afrique Noire*;51(7):423-425.

Ozcan F, Klein P, Lemmon MA, Lax I, Schlessinger J. 2006. On the nature of low- and high-affinity EGF receptors on living cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.*;103(15):5735-40.

P

Penault-Llorca F, Bibeau F, Arnould L, Bralet MP, Rochaix P, Sabourin JC. 2005. [EGFR expression in colorectal cancer and role in tumorigenesis]. *Bull Cancer*. 92(Spec):S5-11.

Pennock S and Wang Z .(2008). A Tale of Two Cbls: Interplay of c-Cbl and Cbl-b in Epidermal Growth Factor Receptor Downregulation *MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY*. p. 3020–3037

Peschard P., Fournier T. M., Lamorte L., Naujokas M. A., Band H., Langdon W. Y. et al. (2001) Mutation of the c-Cbl TKB domain binding site on the Met receptor tyrosine kinase converts it into a transforming protein. *Mol. Cell*. 8: 995–1004

Pinto C, F Di Fabio, C Barone, S Siena, A Falcone, S Cascinu et al. (2009). Phase II Study of cefuximab in combination with cisplatin and docetaxel in patients with untreated advanced gastric or gastro-oesophageal junction adenocarcinoma. *British Journal of Cancer*. ;101 :1261-1268.

Pines G, Kostler WJ, Yarden Y. 2010 .Oncogenic mutant forms of EGFR: lessons in signal transduction and targets for cancer therapy. *FEBS Lett.* ;584(12):2699-706.

Q

Qian Dong, Yun-Peng Liu, Xiu-Juan Qu, Ke-Zuo Hou, Lin-Lin Li. (2010). Expression and clinical significance of c-Cbl, Cbl-b, and epidermal growth factor receptor in gastric carcinoma. *Chinese Journal of Cancer* ; 29(1).

R

Reiko Ito, Hirofumi Nakayama, Kazuhiro Yoshida, Shunji Matsumura, Noriko Oda, Wataru Yasui. (2004). Expression of Cbl linking with the epidermal growth factor receptor system is associated with tumor progression and poor prognosis of human gastric carcinoma. *Virchows Arch.* 444:324–331.

Rejchrt S, Tycovaver A, Bures J. (2005). Tumeurs stromales gastro-intestinales (GIST). *Acta Andosopica* ; 35 (2) : 195 – 203.

Robert J. *Signalisation cellulaire et cancer*: Springer; 2010.

Robertson H., Hime G. R., Lada H. and Bowtell D. D. (2000). A Drosophila analogue of v-Cbl is a dominant-negative oncoprotein in vivo. *Oncogene* 19: 3299–3308

Rubin C., Litvak V., Medvedovsky H., Zwang Y., Lev S. and Yarden Y. (2003). Sprouty fine-tunes EGF signaling through interlinked positive and negative feedback loops. *Curr. Biol.* **13**: 297–307

Rubib BP. (2006). Gastrointestinal stromal tumors : an update. *Histopathology* ; 48 : 83-96.

S

Saito H, Yoshinori Y, Shunichi T. (2009). Clinicopathologic characteristics of gastric cancer patients who underwent gastrectomy with long-term survival. *Langenbecks Arch Surg*; 394: 99-103

Samaké S, Traoré SM, Ba S, Dembélé E, Diop M, Mariko S et al.(2007). Enquête Démographique et de Santé du Mali 2006. Maryland : Macro International Inc., 373p.

Sawadogo A, Ilboudo P D, Durand G, Peghini M, Branquet D, Ouedrago I. (2000). Epidémiologie des cancers du tube digestif au Burkina Faso, apport de 8000 endoscopies effectuées au Centre Hospitalier National SANOU SOURO de Bobo Dioulasso. *Medicine d’Afrique Noire*; 79 : 17 – 19

Sehat B, Andersson S, Girnita L, Larsson O. (2008). Identification of c-Cbl as a new ligase for Insulin-like growth factor-I receptor with distinct roles from Mdm2 in receptor ubiquitination and endocytosis. *Cancer Res*; 68:5669–5677.

Schlessinger J. 2002. Ligand-induced, receptor-mediated dimerization and activation of EGF receptor. *Cell.*110(6):669-72.

Singh AB, Harris RC. 2005. Autocrine, paracrine and juxtacrine signaling by EGFR ligands. *Cell Signal.*;17 (10):1183-93.

Sergina NV, Moasser MM. 2007. The HER family and cancer: emerging molecular mechanisms and therapeutic targets. *Trends Mol Med.* 13(12):527-34.

Sissoko Issiaka (2014). MODE DE VIE ET CANCER DE L'ESTOMAC AU MALI, ETUDE CAS TEMOIN. THESE Pour obtenir le Grade de Docteur en Médecine.

Spindler KL, Olsen DA, Nielsen JN, Brandslund I, Poulsen HS, Villingshoj M, et al. 2006. Lack of the type III epidermal growth factor receptor mutation in colorectal cancer. *Anticancer Res.*;26(6C):4889-93

Sproul AA, Xu Z, Wilhelm M, Gire S, Greene LA. (2009). Cbl negatively regulates JNK activation and cell death. *Cell Res.*; 19:950-961.

Songun I, Putter H, Kranenbarg EM, Sasako M et al. (2010). Surgical treatment of gastric cancer: 15-year follow-up results of the randomised nationwide Dutch D1D2 trial. *Lancet Oncol.*; 11 (5):439-49.

Steven Pennock and Zhixiang Wang. 2008. Cbl-b in Epidermal Growth Factor Receptor A Tale of Two Cbls: Interplay of c-Cbl and Downregulation. *Mol. Cell. Biol.*, 28(9):3020.

T

Thien CB, Walker F, Langdon WY. (2001). RING finger mutations that abolish c- Cbl-directed polyubiquitination and downregulation of the EGF receptor are insufficient for cell transformation. *Mol Cell* 7(2):355–365.

Thien CB, Langdon WY .(2005). c-Cbl and Cbl-b ubiquitin ligases: substrate diversity and the negative regulation of signalling responses. *Biochem J* 391: 153-166.

Thien CB, Dagger SA, Steer JH, Koentgen F, Jansen ES, et al. (2010). c-Cbl promotes T cell receptor-induced thymocyte apoptosis by activating the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. *J Biol Chem.*; 285: 10969-10981

Toukara I M. (2012).Cancer avancé de l'estomac dans le service de chirurgie générale du CHU-Gabriel Touré [Thèse : méd]. Bamako : Université de Bamako ; 12M226.

Tsygankov, A.Y., et al., (2001). Beyond the RING: CBL proteins as multivalent adapters. *Oncogene.*, **20**(44): p. 6382-402.

V

Van de Velde CJH, Benson IIIAI B. 2007. Accomplishments in 2007 in the Management of localized gastric cancer *Gastrointestinal cancer Research*; 2 (3):42-6.

W

Waterman H., Levkowitz G., Alroy I. and Yarden Y. (1999) The RING finger of c-Cbl mediates desensitization of the epidermal growth factor receptor. *J. Biol. Chem.* **274**: 22151–22154

Wieduwilt MJ, Moasser MM. 2008 .The epidermal growth factor receptor family: biology driving targeted therapeutics. *Cell Mol Life Sci.* May;65(10):1566-84.

Wong E. S., Lim J., Low B. C., Chen Q. and Guy G. R. (2001) Evidence for direct interaction between Sprouty and Cbl. *J.Biol. Chem.* **276**: 5866–5875

Wong E. S., Fong C. W., Lim J., Yusoff P., Low B. C., Langdon W. Y. et al. (2002) Sprouty2 attenuates epidermal growth factor receptor ubiquitylation and endocytosis, and consequently enhances Ras/ERK signalling. *EMBO J.* **21**: 4796–4808

X

Xiujuan Qua, 1, Ye Zhanga, 1, Yingchun Lia, Xuejun Hub, Yingying Xua, Ling Xua, Kezou Houa, Kiyonao Sadac, Yunpeng Liua, , (2009). Ubiquitin ligase Cbl-b sensitizes leukemia and gastric cancer cells to anthracyclines by activating the mitochondrial pathway and modulating Akt and ERK survival signals, *FEBS letters*, Volume 583, Issue 13, Pages 2255–2262

Y

Yakoub S, El-Chami N, Kaszas K, Malek M, El Sirkasi M, et al. (2014). The proto-oncoprotein c-Cbl protects cells against oxidative stress by down-regulating apoptosis and is highly expressed in several cancers. *J Cancer Sci Ther*;6:122-135

Yasuda T., Maeda A., Kurosaki M., Tezuka T., Hironaka K., Yamamoto T. et al. (2000) Cbl suppresses B cell receptor-mediated phospholipase C (PLC)-gamma2 activation by regulating B cell linker protein-PLC-gamma2 binding. *J. Exp. Med.* **191**: 641–650

Yoon C. H., Lee J., Jongeward G. D. and Sternberg P. W. (1995) Similarity of sli-1, a regulator of vulval development in *C. elegans*, to the mammalian proto-oncogene c-cbl. *Science* **269**: 1102–1105

Annexe

Annexe 01

Fiche d'enquête

Fiche d'enquête NO /__/_/_/

Date : /__/_/ 201...

A. Identification du malade :

1. Nom et prénom du malade :

.....

2. Age(en année)..... __/__/__

3. Sexe...../__/

1=Masculin 2=Féminin

4. Région de provenance...../__/__

4. Profession /__/__

1=Militaire, 2=Autre

Si autre à préciser.....

B. Habitudes alimentaires :

.....

1=Oui 0=Non

C.L'examen anatomopathologique :

1. Aspect macroscopique de la tumeur :/__/

1=Ulcéreux, 2=Ulcerobourgeonnant, 3=Infiltrant

4=Autre

2. Aspect microscopique de la tumeur :/__/

1=Adénocarcinome bien différencié

2= Adénocarcinome moyennement différencié

3= Adénocarcinome peu différencié

4= carcinome a cellule indépendante

5= carcinome colloïde

* Autre à préciser.....

17. La localisation anatomique de la tumeur :/__/

1=Cardiale, 2=Corporéale, 3=Corpo-antrale, 4=Antrale, 5=Antropylorique,

6=Indéterminée.

Annexe 02

Les techniques histologiques usuelles (standard)

La qualité des prélèvements conditionne la qualité de l'étude anatomopathologique, en s'assurant de la bonne réalisation des techniques histologiques des prélèvements.

I. 1. Enregistrement :

Les prélèvements sont acheminés au service de pathologie (anatomie et de cytologie pathologiques) et accompagnés d'une fiche de renseignements remplie par le médecin prescripteur, qui doit mentionner :

- L'identité du patient : nom
- La date (jour, mois, année)
- Le siège - clinique
- La nature du prélèvement (biopsie ou pièce chirurgicales).
- Les hypothèses
- L'aspect macroscopique ou endoscopique (si applicable) - rendu opératoire peut être utilement joint) ; éventuellement l'aspect d'imagerie.
- Les antécédents médicaux du patient, en particulier, dans la mesure du possible, les antécédents d'examen anatomopathologiques effectués dans un autre laboratoire. La nature des traitements éventuellement administrés au malade.
- le nom et coordonnées de l'auteur et du préleveur et des autres médecins correspondants.

Le prélèvement est codifié par un numéro d'identification qui sera retranscrit sur les blocs et les lames.

I. 2. Fixation des prélèvements

Le prélèvement doit être rapidement conditionné (pour éviter les phénomènes de putréfaction) soit par fixation, soit par congélation.

Dans le cas de nos échantillons, il s'agit d'une fixation permettant la conservation de la morphologie des tissus et des cellules en assurant l'immobilisation des constituants cellulaires ou tissulaires dans un état aussi proche que possible de l'état vivant, en utilisant le liquide fixateur le plus utilisé pour l'examen en microscopie photonique est le formaldéhyde « formol » tamponné à 10% dans un volume de fixateur suffisant (au moins 10 fois le volume de la pièce), dans un récipient assez grand pour ne pas déformer le prélèvement pendant 4 à 6 h pour les biopsies, 24 h au moins pour les pièces opératoires.

I. 3. Étude macroscopique (description et mise en cassettes)

L'examen macroscopique a une importance capitale pour l'examen histologique et le diagnostic.

Il permet de sélectionner les territoires à prélever pour l'étude microscopique (zones lésées, zones d'aspect macroscopique sain et limites d'exérèse) en se basant sur la science descriptive à l'œil nu.

La description de nos pièces opératoires (les gastrectomies totale ou partielle ou biopsie,...) doit porter sur les éléments suivants :

- Longueur et circonférence
- Aspect externe (ulcération, rétrécissement, conglomérat d'anses, adhérences de segments d'organes voisins, etc.) ;
- Aspect de la paroi : épaisseur, anomalie
- Aspect de l'aspect macroscopique (hémorragie, ulcération (nombre, dimensions et situation, distance par rapport aux bords de résection chirurgicale); dans nos échantillons tumorales, insisté sur l'aspect macroscopique.
- Présence de métastases (métastases -végétants, taille, extension par rapport à la circonférence, profondeur d'invasion (mésentère, séreuse), perforation, infiltration de structures adjacentes (structure pelviennes, etc), infiltration tumorale
- Ganglions : leur situation en cas de tumeur. Le nombre doit aussi être précisé étant donné que celui-ci est requis dans la classification (carcinomes gastriques).

Après la précision de l'aspect macroscopique, on pratiquera des coupes et elles sont mises en cassettes.

Les biopsies (biopsies gastriques) sont comptées et déposés dans un filtre pour empêcher leurs pertes, puis sont mises en cassettes en totalité

Après le choix des coupes destinées à l'analyse microscopique, les restes de la pièce opératoire sont conservés pendant quelques jours ou semaines afin de pouvoir en cas de nécessité effectuer des prélèvements complémentaires ou reprise de macroscopie.

I.4. Inclusion (déshydratation et imprégnation)

Après l'étape d'examen macroscopique, les tissus contenus dans les cassettes sont déshydratés par le passage dans un automate d'inclusion, dans une série de solvants organiques, qui assure

o Déshydratation

La déshydratation est nécessaire pour faire sortir l'eau présente dans les tissus, elle se fait par immersion d'échantillons dans des bains successifs d'alcool à différents degrés par ordre croissant 75°, 95°, 100° suivi par trois bains d'acétone résidu et trois bains de xylène.

o Imprégnation

Se fait par immersion d'échantillons dans deux bains de paraffine fondue à 65°C pendant deux heures afin de préparer le tissu à la coupe.

I. 5. L'enrobage

Grâce à un appareil (EG) 1160, groupe thermoélectrique, qui a pour but à inclure le tissu imprégné dans un bloc de paraffine, nous avons pu avoir une forme rigide prête à la coupe.

I. 6. Réalisation des coupes

À l'aide d'un microtome rotatif de type RM 2235, nous avons réalisé des coupes de 3 à 5 μm d'épaisseur. Cette épaisseur permet aux rayons lumineux du microscope de traverser le prélèvement et d'éviter les superpositions cellulaires. La coupe est déposée et collée sur une lame en verre, De multiples coupes peuvent être faites pour les autres techniques complémentaires.

I. 7. Coloration « HE »

Pour que les colorants (des solutions aqueuses) pénètrent à l'intérieur du tissu et pour mieux reconnaître et visualiser les différents éléments tissulaires, nous avons procédé à un déparaffinage en mettant les lames dans une étuve à 250°C ensuite placer dans un portoir émergé dans un bain de xylème pendant 2 min ou par le toluène, puis les lames sont colorée grâce à un automate par le passage dans des bains successifs. La coloration associe un colorant basique nucléaire (Hématoxyline) et un colorant acide cytoplasmique (Éosine).

I. 8. Montage

Les lames colorées **doivent** être protégées pour rendre possible leur examen microscopique et leur conservation sans aucune altération, par une colle de verre EUKITT. Puis nous avons laissé les lames séchées soit à l'air libre ou dans une étuve pour quelque minute.

I. 9. Lecture microscopique

La lecture dans cette étape de techniques a été faite par un microscope optique de type LEICA DM 1000 multiple têtes de grossissement, en commençant par le faible grossissement (X10), puis aux (X20) et (X40).

Publication



IMMUNO-DISTRIBUTION AND EXPRESSION OF C-CBL PROTO-ONCOGENE IN HUMAN GASTRIC CANCEROUS TISSUES FROM WESTERN ALGERIA

**RACHIDA SALAH¹, NORIA HARIR^{1,2*}, FERIEL SELLAM¹, MALIKA AIDOUNI³,
MILOUD MEDJAMIA³, NESRINE MRABENT¹, SOUMIA ZEGGAI¹
AND MUSTAPHA DIAF¹**

¹Department of Biology, Djillali Liabes University, Sidi bel Abbes, Algeria.

²Laboratory of Molecular Microbiology, Proteomics and Health, Sidi bel Abbes, Algeria.

³Department of Pathology, Oran Military Hospital (HMRUO), Algeria.

AUTHORS' CONTRIBUTIONS

This work was carried out in collaboration between all authors. Author RS designed the study, wrote the protocol and interpreted the data. Author NH anchored the field study. Author FS managed the literature searches and produced the initial draft. Authors MA and MM performed the pathological analysis and study. Authors NM, SZ and MD gathered the initial data, performed preliminary data analysis and the statistical analysis. All authors read and approved the final manuscript.

Received: 22nd March 2016

Accepted: 27th May 2016

Published: 10th June 2016

Original Research Article

ABSTRACT

Background: Gastric cancer is one of the most common causes of cancer death worldwide.

Aim: The aim of our study was to assess the immunohistochemical expression and distribution as well as the status of c-Cbl protein in human gastric cancerous cells.

Materials and Methods: Ninety six paraffin blocks of cancerous gastric tissues sections were collected from the Department of Pathology, of Oran Military Hospital (Western Algeria) for the period of 2006-2015. We performed an immunohistochemical protocol for c-Cbl detection and a statistical analysis for patients' clinical-pathological parameters.

Results: 96 patients with gastric cancer were included in the current study. Median age of the patients with gastric cancer was 60 years (range, 27-87). There were 70 (72.9 %) males and 26 (27.1%) females; male to female ratio was about 2.7. The most common histological type was moderately differentiated adenocarcinoma 33 cases (34.4%). Our immunohistochemical analysis revealed that c-CBL protein was expressed in gastric cancerous cells but with different of immune-scoring and different immunostaining intensity. The most predominant observed score was score 2 in 20 cases (20.8%) followed by score 4 in 16 cases (16.7%); then score 3, 6 and 7. Concerning immunostaining levels; we reported an intense staining in 17 cases (17.7%); a moderate staining in 31 cases (32.3%); a poor staining in 27 cases (28.1%) and no staining in 21 cases (21.9%).

Conclusion: Our findings revealed that cCbl protein is expressed with important levels in human gastric cancer cells; which could be a good biomarker for gastric cancer diagnosis.

Keywords: c-Cbl protein; gastric cancer; immunohistochemistry; expression.

1. INTRODUCTION

Gastric cancer is one of the most common causes of cancer death worldwide [1]. Furthermore, the majority of patients are diagnosed with advanced metastatic disease and the 5-year survival rate is approximately 10–15% [2].

One of the most important characteristics of a cancer cell is the ability to express multiple growth factors and their receptors, which confer growth autonomy by autocrine mechanisms and contribute to tumor progression, invasion and metastasis [3].

c-Cbl and b-Cbl are two important members of the Casitas Blineage lymphoma (Cbl) family; acting as bridge molecules and E3 ubiquitin ligases, they can target a series of receptor proteins with TK activity, representatively EGFR, and induce the degeneration of these receptors, and thus have important roles in maintaining homeostasis in the body [4].

The proto-oncoprotein c-Cbl controls several down-regulation signals leading to degradation of tyrosine-kinase receptors (TKR) [5,6,7] or endocytic trafficking. c-CBL and b-CBL encode multifunctional proteins engaged in the regulation of intracellular signaling pathways as they are able to regulate diverse signaling networks, hence, CBL expression alteration may cause unbalances in several signaling pathway which may lead to cancer appearance [5,7,8,9]. It interacts with numerous signaling proteins through their Src homology-2 or -3 (SH2 or SH3) domains [9,10,11].

Some previous surveys have reported an association between down-regulation of apoptosis and c-Cbl due to its anti-apoptotic forms using PCR western blotting and immunoblotting [12,13]. Nonetheless, the immunohistochemical expression of Cbl-c receptors status in gastric cancer cells is rarely reported in foreign and domestic literature.

The aim of our study was to assess the immunohistochemical expression and distribution as well as the status of c-Cbl protein in human gastric cancerous cells.

2. MATERIALS AND METHODS

Ninety six (96) paraffin blocks of cancerous gastric tissues sections were collected from the Department of pathology, of Oran Military Hospital (Western Algeria) for the period of 2006-2015. All the cases were identified histologically as malignant gastric cells. These specimens were paraffin embedded in the same center. The cases were stained with hemotoxyline and eosin (H&E) for routine

histological examination, and quality control (positive and negative control) was performed in our experiment. An absolute confidentiality of the patients' vital information was maintained for ethical purposes and an ethical approval was obtained from the institution in which the study was carried out.

2.1 Immunohistochemical Protocol

We used the following Abcam protocol of immunohistochemistry (IHC): Formalin-fixed paraffin-embedded tissue sections were deparaffinized and rehydrated then enough drops of Hydrogen Peroxide Block were added to cover the sections, they were incubated for 10 minutes then washed twice in buffer Phosphate Buffered Saline (PBS) (10X PBS) (0.1M PBS, pH 7.4).

A pretreatment was performed then the sections were washed 3 times in buffer. Protein Block was applied and the sections were incubated for 10 minutes at room temperature to block nonspecific background staining then washed once in buffer. Anti-cCBL antibody was applied (1:100 dilution mouse monoclonal; BD Biosciences, CA) then incubated overnight. Tissues were washed 3 times in buffer then complement was applied and incubated for 10 minutes at room temperature. Sections were washed twice in buffer then HRP conjugate was applied and incubated for 15 minutes at room temperature; they were rinsed 4 times in buffer, then 30 µl (1 drop) DAB Chromogen were added to 1.5 ml (50 drops) of DAB Substrate and were applied to tissue and were incubated for 1-10 minutes then rinsed 4 times in buffer. Counterstain was applied then the tissues were dehydrated.

2.2 Morphometric Evaluation

Concerning IHC control; we followed Dong et al. [4] scale for the assessment: Positive staining of cCbl, was indicated as yellowish brown granules in the cytomembrane, the cytoplasm, or both. Sections were observed through microscopic examination (x400) by a pathologist. From each section, five visual fields were randomly selected and the score for each visual field depended on its percent of positive cells and their staining intensity. For the percent of positive cells, less or equal to 5%, 6%25%, 26% 50%, 51%75% and more than 76% were recorded as 0, 1, 2, 3, and 4 points, respectively. For staining intensity, non stained, light yellow, yellowish brown, and brown were recorded as 0, 1, 2, and 3 points, respectively. The arithmetic product of these two scores (percent score and intensity score) was regarded as the score for that visual field, and the average score of those five visual fields were regarded as the final score for that section. Finally, 01 point was recorded as (-),

which indicated negative staining; 24 points were recorded as (+), which indicated weak positive staining; 57 points were recorded as (++) and less or equal to 8 points as (+++), which indicated strong positive staining. Final scores were assigned by a pathologist.

2.3 Statistical Analysis

Statistical analyses were done using SPSS 20.0 (Statistical Package for the Social Sciences, IBM Corporation; Chicago, IL. August 2011).

3. RESULTS

96 patients with gastric cancer were included in the current study. Median age of the patients with gastric cancer was 60 years (range, 27-87). There were 70 (72.9 %) males and 26 (27.1%) females; male to female ratio was about 2.7 (Table 1).

Table 1. Patients’ clinical and histological characteristics

Characteristics	Cancerous samples	
	Number	Percentage
Sex (n= 96)	96	100
Male	70	72.9
Female	26	27.1
Sex ratio	-	2.7
Median Age	60	-
Histo-pathology		
Moderately differentiated adenocarcinoma	33	34.4
Well differentiated adenocarcinoma	24	25
Signet-ring cell carcinoma	20	20.8
Poorly differentiated adenocarcinoma	15	15.6
Colloids mucosal carcinoma	4	4.2

As shown in Table 1 the most common histological type was moderately differentiated adenocarcinoma 33 cases (34.4%) (Figs. 1 and 2); well differentiated adenocarcinoma 24 cases (25%) (Fig. 3); signet-ring cell carcinoma 20 (20.8%); poorly differentiated adenocarcinoma 15 cases (15.6%); and colloids mucosal carcinoma 4 (4.2%).

Our immunohistochemical analysis revealed that c-CBL protein was expressed in gastric cancerous cells but with different of immune-scoring and different immunostaining intensity. The most predominant observed score was score 2 in 20 cases (20.8%) (Fig. 3) followed by score 4 in 16 cases (16.7%) (Fig. 2); then score 3, 6 and 7 (Fig. 1) with the same number of cases 12 (12.5%). The least predominant scores were score 0 in 11cases (11.5%); score 5 in 7 cases (7.3%) and finally score 1 in 6 cases (6.3%) (Table 2).

Table 2. Immuno-scoring distribution

Immuno-scoring	Number	Percentage
0	11	11,5
1	6	6,3
2	20	20,8
3	12	12,5
4	16	16,7
5	7	7,3
6	12	12,5
7	12	12,5
Total	96	100,0

Concerning immunostaining levels; we reported an intense staining in 17 cases (17.7%); a moderate staining in 31 cases (32.3%); a poor staining in 27 cases (28.1%) and no staining in 21 cases (21.9%) (Fig. 1, Table 3).

Table 3. Immuno-staining distribution

Immuno-staining	Effectifs	Pourcentage
No staining	21	21,9
Poor staining	27	28,1
Moderate staining	31	32,3
Intense staining	17	17,7
Total	96	100,0

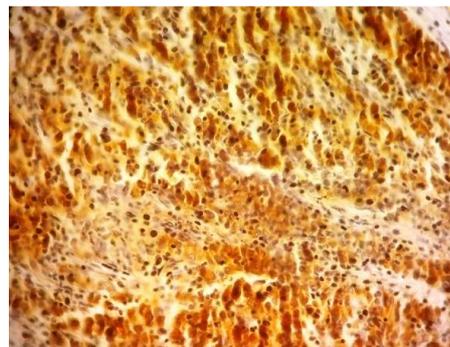


Fig. 1. Moderately differentiated gastric adenocarcinoma; intense staining; score 7 (40X)



Fig. 2. Moderately differentiated gastric adenocarcinoma; moderate staining; score 4 (40X)

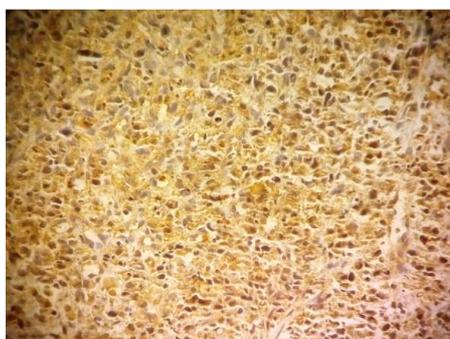


Fig. 3. Well differentiated gastric adenocarcinoma low staining score 2 (40X)

4. DISCUSSION

In the present study, we examined the immunoexpression as well as the immunodistribution of the proto-oncogene c-Cbl in human gastric carcinoma using an immunohistochemical protocol. The expression of Cbl protein was detected in 78 % of gastric carcinomas, and overexpressed in 17% of our samples and the most predominant scores were score 2 and 4 in 37.5% which could be associated with depth of tumor invasion and nodal metastasis [3].

Previous studies identified c-Cbl protein as key player in several signaling pathways. c-Cbl has donned the role of a multivalent adaptor protein, capable of interacting with a plethora of proteins, and has been shown to positively influence certain biological processes. The identity of c-Cbl as an E3 ubiquitin ligase unveiled the existence of an important negative regulatory pathway involved in maintaining homeostasis in protein tyrosine kinase (PTK) signaling [14,15,16,17,18].

On the other hand some findings have shown that the misregulation of c-Cbl protein is implicated in the negative regulation of PTK receptors as it ubiquitylate and downregulate EGFR [14,15]. This protein was also formally established as a RING finger-type E3 ubiquitin ligase [16,17]. Multiple reports have shown that c-Cbl-dependent ubiquitylation and downregulation of EGFR requires the intact RING and TKB domains of c-Cbl [18].

In addition, the expression of cCbl was related to the depth of infiltration and pathologic staging of gastric cancer, the expression of Cblb related to lymph node metastasis and pathologic staging, and EGFR expression related to the depth of infiltration and pathologic staging [4].

One of the important aspects of human carcinogenesis is the activation of tyrosine phosphorylation of cellular proteins. Activation of c-Src kinase was found

frequently in carcinoma of the breast, colorectum and stomach [19,20,21]. In various tumor tissues, cCbl was tyrosine phosphorylated in a tumor-specific manner [22], suggesting that Cbl signaling may play an important role not only in tumorigenesis of gastric cancer but in various human cancers as well [3].

Additionally; a recent study has reported that c-Cbl combines with IGF-IR and mediates receptor polyubiquitination in response to IGF-I ligand in human cancerous cells [23], and surprisingly; the expression of IGF-IR was negatively correlated with the expression of Cbl-b. Cbl-b positive expression was associated with early-stage pTNM and negative lymph node metastasis. These newly reported results further strengthened the possibility that Cbl-b could repress IGF-IR and decrease the risk of developing lymph node metastasis in patients with gastric cancer [24].

In summary c-Cbl plays a role in down-regulating TPK, possibly through its ubiquitinylation ability [25,26], allowing survival of over-expressing c-Cbl malignant cells by rendering it tolerant to oxidative compounds, furthermore, c-Cbl could also promote the renewal of these compounds as suggested by Yacoub et al. [13] and the reports of Molero et al. [27,28], thereby increasing mutation in cancer cells as well as gastric cancer cells [13,29].

5. CONCLUSION

Our findings revealed that cCbl protein is expressed with important levels in human gastric cancer cells its expression levels could be tightly bound to the invasion and the tumorigenesis of gastric cancer due to its role of a multivalent adaptor protein, its regulations of different signaling pathways as well as its influence of certain biological processes.

PATIENTS' CONSENT

All authors declare that 'written informed consent was obtained from the patient (or other approved parties) for publication of this paper and accompanying images.

ETHICAL APPROVAL

All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional and/or national research committee and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards.

COMPETING INTERESTS

Authors have declared that no competing interests exist.

REFERENCES

1. Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics. *CA Cancer J Clin.* 2009; 59:225–249.
2. Wagner AD, Grothe W, Haerting J, Kleber G, Grothey A, Fleig WE. Chemotherapy in advanced gastric cancer: A systematic review and meta-analysis based on aggregate data. *J Clin Oncol.* 2006;24:2903–2909.
3. Reiko Ito, Hirofumi Nakayama, Kazuhiro Yoshida, Shunji Matsumura, Noriko Oda, Wataru Yasui. Expression of Cbl linking with the epidermal growth factor receptor system is associated with tumor progression and poor prognosis of human gastric carcinoma. *Virchows Arch.* 2004;444:324–331.
4. Qian Dong, Yun-Peng Liu, Xiu-Juan Qu, Ke-Zuo Hou, Lin-Lin Li. Expression and clinical significance of c-Cbl, Cbl-b, and epidermal growth factor receptor in gastric carcinoma. *Chinese Journal of Cancer.* 2010; 29(1).
5. Schmidt MH, Dikic I. The Cbl interactome and its functions. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005;6:907-918.
6. Thien CB, Langdon WY. c-Cbl and Cbl-b ubiquitin ligases: substrate diversity and the negative regulation of signalling responses. *Biochem J.* 2005;391:153-166.
7. Thien CB, Langdon WY. Negative regulation of PTK signalling by Cbl proteins. *Growth Factors.* 2005;23:161-167.
8. Jiang X, Huang F, Marusyk A, Sorkin A. Grb2 regulates internalization of EGF receptors through clathrin-coated pits. *Mol Biol Cell.* 2003;14:858-870.
9. Stern KA, Place TL, Lill NL. EGF and amphiregulin differentially regulate Cbl recruitment to endosomes and EGF receptor fate. *Biochem J.* 2008;410:585-594.
10. Donovan JA, Wange RL, Langdon WY, Samelson LE. The protein product of the c-cbl protooncogene is the 120-kDa tyrosine-phosphorylated protein in Jurkat cells activated via the T cell antigen receptor. *J Biol Chem.* 1994;269:22921-22924.
11. Rivero-Lezcano OM, Sameshima JH, Marcilla A, Robbins KC. Physical association between Src homology 3 elements and the protein product of the c-cbl proto-oncogene. *J Biol Chem.* 1994;269:17363-17366.
12. Hamilton E, Miller KM, Helm KM, Langdon WY, Anderson SM. Suppression of apoptosis induced by growth factor withdrawal by an oncogenic form of c-Cbl. *J Biol Chem.* 2001;276: 9028-9037
13. Yakoub S, El-Chami N, Kaszas K, Malek M, El Sirkasi M, et al. The proto-oncoprotein c-Cbl protects cells against oxidative stress by down-regulating apoptosis and is highly expressed in several cancers. *J Cancer Sci Ther.* 2014;6:122-135.
14. Levkowitz G, Waterman H, Zamir E, Kam Z, Oved S, Langdon WY, Beguinot L, Geiger B, Yarden Y. c-Cbl/Sli-1 regulates endocytic sorting and ubiquitination of the epidermal growth factor receptor. *Genes Dev.* 1998; 12(23): 3663–3674.
15. Levkowitz G, Waterman H, Ettenberg SA, Katz M, Tsygankov AY, Alroy I, Lavi S, Iwai K, Reiss Y, Ciechanover A, Lipkowitz S, Yarden Y. Ubiquitin ligase activity and tyrosine phosphorylation underlie suppression of growth factor signaling by c-Cbl/Sli-1. *Mol Cell.* 1999;4(6):1029–1040.
16. Joazeiro CA, Wing SS, Huang H, Levenson JD, Hunter T, Liu YC. The tyrosine kinase negative regulator c-Cbl as a RING-type, E2-dependent ubiquitin-protein ligase. *Science.* 1999; 286(5438):309–312
17. Waterman H, Levkowitz G, Alroy I, Yarden Y. The Ring finger of c-Cbl mediates desensitization of the epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem.* 1999;274(32):22151–22154.
18. Gayathri Swaminathan, Alexander Y. Tsygankov. The Cbl family proteins: Ring leaders in regulation of cell signaling. *Journal of Cellular Physiology.* 2006;209:21–43.
19. Bolen JB, Veillette A, Schwartz AM, De Seau V, Rosen N. Activation of pp60c-src protein kinase activity in human colon carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;84:2251–2255.
20. Ottenhoff-Kalff AE, Rijiksen G, van Bewrden EA, Hennipman A, Michels AA, Staal GE. Characterization of protein tyrosine kinases from human breast cancer. *Cancer Res.* 1992;52:4773–4778.
21. Takekura N, Yasui W, Yoshida K, Tsujino T, Nakayama H, Kameda T, Yokozaki H, Nishimura Y, Ito H, Tahara E. pp60c-src protein kinase activity in human gastric carcinomas. *Int J Cancer.* 1990;45:847–851.
22. Kamei T, Machida K, Nimura Y, Senga T, Yamada I, Yoshii S, Matsuda S, Hamaguchi M. C-Cbl protein in human cancer tissues is frequently tyrosine phosphorylated in a tumorspecific manner. *Int J Oncol.* 2000; 17:335–339.
23. Sehat B, Andersson S, Girnita L, Larsson O. Identification of c-Cbl as a new ligase for Insulin-like growth factor-I receptor with distinct roles from Mdm2 in receptor

- ubiquitination and endocytosis. *Cancer Res.* 2008; 68:5669–5677.
24. Li et al. Ubiquitin ligase Cbl-b represses IGF-I-induced epithelial mesenchymal transition via ZEB2 and microRNA-200c regulation in gastric cancer cells. *Molecular Cancer.* 2014; 13:136.
 25. Thien CB, Blystad FD, Zhan Y, Lew AM, Voigt V, et al. Loss of c-Cbl RING finger function results in high-intensity TCR signaling and thymic deletion. *EMBO J.* 2005;24: 3807-3819.
 26. Thien CB, Dagger SA, Steer JH, Koentgen F, Jansen ES, et al. c-Cbl promotes T cell receptor-induced thymocyte apoptosis by activating the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. *J Biol Chem.* 2010;285: 10969-10981.
 27. Molero JC, Jensen TE, Withers PC, Couzens M, Herzog H, et al. c-Cbl-deficient mice have reduced adiposity, higher energy expenditure, and improved peripheral insulin action. *J Clin Invest.* 2004;114:1326-1333.
 28. Molero JC, Waring SG, Cooper A, Turner N, Laybutt R, et al. Casitas b-lineage lymphoma-deficient mice are protected against high-fat diet-induced obesity and insulin resistance. *Diabetes.* 2006;55:708-715.
 29. Sproul AA, Xu Z, Wilhelm M, Gire S, Greene LA. Cbl negatively regulates JNK activation and cell death. *Cell Res.* 2009;19:950-961.

Rachida Salah¹, Noria Harir^{1, 2*}, Ferial Sellam¹, Malika Aidouni³, Miloud Medjamia³, Nesrine Mrabent¹, Soumia Zeggai¹ and Mustapha Diaf¹

¹Department of Biology, Djillali Liabes University of Sidi bel Abbes, Algeria

²Laboratory of Molecular Microbiology, Proteomics and Health; Sidi bel Abbes, Algeria

³Department of Pathology; Oran Military Hospital (HMRUO), Algeria

Dates: Received: 08 April, 2016; Accepted: 24 August, 2016; Published: 26 August, 2016

***Corresponding author:** Noria Harir, PhD, Department of Biology, Djillali Liabes, University of Sidi bel Abbes, Algeria, Tel: 00213698913103; E-mail: harimouria@yahoo.fr

www.peertechz.com

Keywords: Cbl-b; Gastric cancer; Immunohistochemistry; Oncoprotein

Research Article

Immunohistochemical Analysis and Pathological Assessment of B-Cbl Proto-Oncogene in Gastric Carcinoma Cells

Abstract

Objective: In order to study the status and the expression of Cbl-b onco-protein in gastric carcinoma we underwent an immunohistochemical protocol by which we analyzed the immunodistribution as well as the level of Cbl-b expression on gastric cancerous tissues.

Material and method: Ninety-six (96) paraffin blocks of cancerous gastric tissues sections were collected from the Department of pathology, of Oran Military Hospital (Western Algeria) for the period of 2006-2015. All the cases were identified histologically as malignant gastric cells. An immunohistochemical protocol to analyze the expression of Cbl-b in gastric cancerous tissues.

Results: Our immunohistochemical analysis revealed that Cbl-b protein was expressed in gastric cancerous cells with different immune-scoring and different immunostaining intensity. The most predominant observed score was score 0 in 37 cases (38.5%) followed by score 2 in 13 cases (13.5%); then score 4 in 11 cases (11.5%). The least predominant scores were score 6 in 7 cases (7.3%), then score 1, 5 and 7 with the same number of cases 6 (6.3%). Concerning immunostaining levels; we reported an intense staining in 14 cases (14.6%); a moderate staining in 16 cases (16.7%); a poor staining in 14 cases (14.6%) and no staining in 52 cases (54.2%).

Conclusion: Cbl-b oncoprotein is immunohistochemically expressed in human gastric carcinoma. More surveys are required to determine the role of Cbl-b in non-hematopoietic cell systems.

Introduction

Gastric cancer is becoming a major health problem worldwide because of the lack of effective biomarkers for metastasis prediction [1].

The mammalian Cbl protein down regulation was implicated in gastric cancer development [2]. Cbl family consists of the three homologues c-Cbl, Cbl-b, and Cbl-3, all of which associate with a wide variety of signaling proteins [3].

Through these many associations, Cbl is able to regulate diverse signaling networks; one of the most extensively studied roles of Cbl is its function as a negative regulator of receptor tyrosine kinase (RTK) signaling [4-6].

Cbl-b is a second member of the E3 ubiquitin ligase Cbl family, some studies have revealed that Cbl-b regulates gastric cancer cell proliferation, drug sensitivity and also migration [1,7,8]. In addition, Cbl-b can degrade as well IGF-I signaling intermediate IRS-1 and decrease protein synthesis in unloading-induced muscle atrophy [9]. Some surveys showed that the p85 regulatory subunit of PI3 kinase (PI3K) serves a substrate for Cbl-b during activation of T cells and Cbl-b functions as a negative regulator of p85 in a ubiquitin-dependent but proteolysis-independent manner [10,11]. Cbl-b-deficient inhibited Akt and ERK phosphorylation and deregulation of T cell proliferation [12,14].

In order to study the status and expression of Cbl-b oncoprotein in gastric carcinoma we underwent an immunohistochemical protocol by which we analyzed the immunodistribution as well as the level of Cbl-b expression on gastric cancerous tissues.

Material and Methods

Ninety-six (96) paraffin blocks of cancerous gastric tissues sections were collected from the Department of pathology of Oran Military Hospital (Western Algeria) for the period of 2006-2015. All the cases were identified histologically as malignant gastric cells. These specimens were paraffin embedded in the same center. The cases were stained with hemotoxyline and eosin (H&E) for routine histological examination. An absolute confidentiality of the patients' vital information was maintained for ethical purposes and an ethical approval was obtained from the institution in which the study was carried out.

Immunohistochemical protocol

We used the following Abcam protocol of immunohistochemistry (IHC): formalin-fixed paraffin-embedded tissue sections were deparaffinized and rehydrated then enough drops of Hydrogen Peroxide Block were added to cover the sections, they were incubated for 10 minutes then washed twice in buffer Phosphate Buffered Saline (PBS) (10X PBS) (0.1M PBS, pH 7.4).

A pretreatment was performed then the sections were washed 3 times in buffer.

Protein Block was applied and the sections were incubated for 10 minutes at room temperature to block nonspecific background staining then washed once in buffer. Anti-Cbl-b antibody was applied (1:100 dilution mouse monocloal; BD Biosciences, CA) then incubated overnight. Tissues were washed 3 times in buffer then complement was applied and incubated for 10 minutes at room temperature. Sections were washed twice in buffer then HRP conjugate was applied and incubated for 15 minutes at room temperature; they were rinsed 4 times in buffer, then 30 µl (1 drop) DAB Chromogen were added to 1.5 ml (50 drops) of DAB Substrate and were applied to tissue and were incubated for 1-10 minutes then rinsed 4 times in buffer. Counterstain was applied then the tissues were dehydrated.

Morphometric evaluation

Concerning IHC control; we followed Dong et al. [4], scale for the assessment: positive staining of cCbl, was indicated as yellowish brown granules in the cytomembrane, the cytoplasm, or both. A pathologist observed sections through microscopic examination (x400). From each section, five visual fields were randomly selected and the score for each visual field depended on its percent of positive cells and their staining intensity. For the percent of positive cells, less or equal to 5%, 6%25%, 26% 50%, 51%75% and more than 76% were recorded as 0, 1, 2, 3, and 4 points, respectively. For staining intensity, non-stained, light yellow, yellowish brown, and brown were recorded as 0, 1, 2, and 3 points, respectively. The arithmetic product of these two scores (percent score and intensity score) was regarded as the score for that visual field, and the average score of those five visual fields were regarded as the final score for that section. Finally, 01 point was recorded as (-), which indicated negative staining; 24 points were recorded as (+), which indicated weak positive staining; 57 points were recorded as (++) and less or equal to 8 points as (+++), which indicated strong positive staining. Final scores were assigned by a pathologist.

Statistical analysis

Statistical analyses were done using SPSS 20.0 (Statistical Package for the Social Sciences, IBM Corporation; Chicago, IL. August 2011).

Results

96 patients with gastric cancer were included in the current study. Median age of the patients with gastric cancer was 60 years (range, 27-87). There were 70 (72.9 %) males and 26 (27.1%) females; male to female ratio was about 2.7 (Table 1).

As shown in Table 1 the most common histological type was moderately differentiated adenocarcinoma 33 cases (34.4%) (Figure 1), well differentiated adenocarcinoma 24 cases (25%) (Figure 2), signet-ring cell carcinoma 20 (20.8%); poorly differentiated adenocarcinoma 15 cases (15.6%) (Figure 3), and colloids mucosal carcinoma 4 (4.2%).

Our immunohistochemical analysis revealed that Cbl-b protein was expressed in gastric cancerous cells but with different of immunescoring and different immunostaining intensity.

The most predominant observed score was score 0 in 37 cases (38.5%) followed by score 2 in 13 cases (13.5%) (Figure 3), then score

Table 1: Patients' clinical and histological characteristics.

Characteristics	Cancerous	
	Number	Percentage (%)
Sex (n= 96)	96	100
Male	70	72.9
Female	26	27.1
Sex ratio	-	2.7
Median Age	60	-
Histo-pathology		
Moderately differentiated adenocarcinoma	33	34.4
Well differentiated adenocarcinoma	24	25
Signet-ring cell carcinoma	20	20.8
Poorly differentiated adenocarcinoma	15	15.6
Colloids mucosal carcinoma	4	4.2

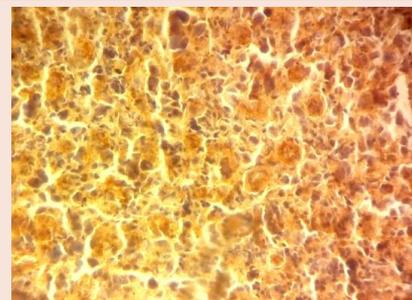


Figure 1: Moderately differentiated gastric adenocarcinoma, moderate staining score 5 (X40).

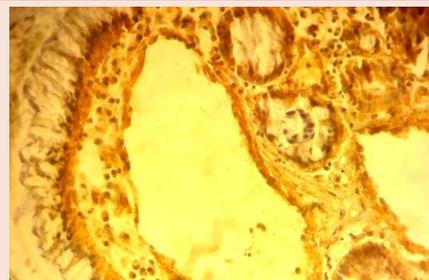


Figure 2: Well differentiated gastric adenocarcinoma, intense staining.

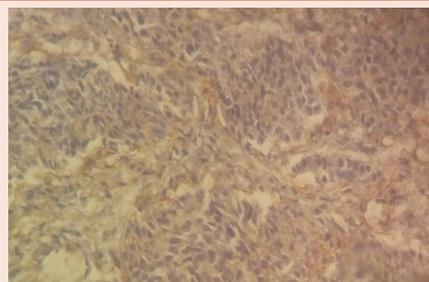


Figure 3: Poorly differentiated gastric adenocarcinoma, poor staining score 2 (X40).

4 in 11 cases (11.5%). The least predominant scores were score 6 in 7 cases (7.3%) (Figure 2), than score 1, 5 (Figure 1) and 7 with the same number of cases 6 (6.3%) (Table 2).

Concerning immunostaining levels, we reported an intense staining in 14 cases (14.6%); a moderate staining in 16 cases (16.7%); a poor staining in 14 cases (14.6%) and no staining in 52 cases (54.2%) (Table 3).

Discussion

In the present study, we examined the immuno-expression as well as the immunodistribution of the proto-oncogene b-Cbl in human gastric carcinoma using an immunohistochemical protocol. The expression of b-Cbl protein was detected in 45.8 % of gastric carcinomas, and overexpressed in 19 cases (score 5, 6, 7) with a rate of 19.7% which is a prominent rate.

As we stated before; Cbl-b can be an important regulator of several signaling pathways. This oncoprotein might act also as a negative regulator of growth factor receptor signaling and receptor tyrosine kinase (RTK) signaling, which make the ubiquitin ligase Cbl-b play an important role in the suppression of gastric cancer cell proliferation [4-6].

Two highly conserved amino-terminal domains contribute strongly to this regulatory function. First, Cbl's tyrosine kinase binding (TKB) domain recognizes phosphotyrosine residues and allows Cbl to interact directly with activated RTKs on the plasma membrane [14-16].

The loss of Cbl-b in T cells was demonstrated to trigger antigen-induced receptor clustering and lipid raft aggregation [17]. Some previous surveys showed that Cbl-b sequestered signalling molecules from lipid rafts, which resulted in ineffective lipid raft aggregation in mast cells [18,19].

Furthermore, down-regulation of Cbl-b by oxaliplatin was shown to facilitate death receptor aggregation in lipid rafts in gastric cancer

cells [20]. Therefore, since lipid rafts are essential participants in the regulation of receptor-mediated signal transduction and cross-talk in membrane microdomains [21,22].

Some authors stated that knock-down of Cbl-b enhances epidermal growth factor-induced disruption of human epithelial cell adherens junctions (AJs) and cell motility [22]. The inducible up-regulation of c-Cbl and Cbl-b affects cell adhesion through regulation of the adhesion-related kinases Pyk2 and Paxillin in HL-60 cell differentiation [23]. Moreover, Cbl-b can also degrade the IGF-I signaling intermediate IRS-1 and reduce protein synthesis in unloading-induced muscle atrophy [24-26].

Feng et al. [13], suggested that Cbl-b functions together with EGFR/ERK/Akt pathway regulating the balance between chemosensitivity and chemoresistance to 5-Fluorouracil (5-FU), have shown that the chemotherapeutic agent, oxaliplatin, can sensitize gastric cancer cells to TRAIL by regulating components of the apoptotic/survival machinery such as caspase-3, caspase-8, Bax, and Bcl-2 protein expression [13,23]. These studies support an involvement of Cbl-b and its potential regulation of EGFR signaling in determining chemosensitivity of gastric cancer cells. The knockdown studies of Cbl-b and biochemical analyses of EGFR signaling in the present study directly support this idea [13].

Conclusion

The present study has shown that Cbl-b oncoprotein is immunohistochemically expressed in human gastric carcinoma. More surveys are required to determine the role of Cbl-b in non-hematopoietic cell systems using several molecular techniques such as RT-PCR and western blotting.

Acknowledgments

The authors would like to thank the members of pathology department of Sidi bel Abbes hospital for their invaluable support, guidance, and educational insight.

References

- Li H, Xu L, Li C, Zhao L, Ma Y, et al. (2014) Ubiquitin ligase Cbl-b represses IGF-I-induced epithelial mesenchymal transition via ZEB2 and microRNA-200c regulation in gastric cancer cells. *Molecular Cancer* 13: 136.
- Schmidt MH, Dikic I (2005) The Cbl interactome and its functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6: 907-918.
- Thien CB, Langdon WY (2001) Cbl: many adaptations to regulate protein tyrosine kinases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2: 294-307.
- Miyake S, Lupher ML Jr, Druker B, Band H (1988) The tyrosine kinase regulator Cbl enhances the ubiquitination and degradation of the platelet-derived growth factor receptor alpha. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 7927-7932.
- Ota Y, Samelson LE (1997) The product of the proto-oncogene c-cbl: a negative regulator of the Syk tyrosine kinase. *Science* 276: 418-420.
- Waterman H, Levkowitz G, Alroy I, Yarden Y (1999) The RING finger of c-Cbl mediates desensitization of the epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem* 274: 22151-22154.
- Yingchun L, Xiujuan Q, Jinglei Q, Ye Z, Jing L, et al. (2011) E3 ubiquitin ligase Cbl-b potentiates the apoptotic action of arsenic trioxide by inhibiting the PI3K/Akt pathway. *Braz J Med Biol Res* 44: 105-111.
- Xu L, Zhang Y, Liu J, Qu J, Hu X, et al. (2012) TRAIL-activated EGFR by Cbl-b-regulated EGFR redistribution in lipid rafts antagonizes TRAIL-induced apoptosis in gastric cancer cells. *Eur J Cancer* 48: 3288-3299.

Table 2: Immuno-scoring distribution.

Immuno-scoring	Number	Rate (%)
0	37	38.5
1	6	6,3
2	13	13.5
3	12	12,5
4	11	11.5
5	7	7,3
6	7	7.3
7	6	6.3
Total	96	100,0

Table 3: Immuno-staining distribution.

Immuno-staining	number	Rate (%)
No staining	52	54.2
Poor staining	14	14.6
Moderate staining	16	16.7
Intense staining	14	14.6
Total	96	100,0



9. Nakao R, Hirasaka K, Goto J, Ishidoh K, Yamada C, et al. (2009) Ubiquitin ligase Cbl-b is a negative regulator for insulin-like growth factor 1 signaling during muscle atrophy caused by unloading. *Mol Cell Biol* 29: 4798–4811.
10. Fang D, Wang HY, Fang N, Altman Y, Elly C, et al. (2001) Cbl-b, a RING-type E3 ubiquitin ligase, targets phosphatidylinositol 3-kinase for ubiquitination in T cells. *J Biol Chem* 276: 4872–4878.
11. Fang D, Liu YC (2001) Proteolysis-independent regulation of PI3K by Cbl-b-mediated ubiquitination in T cells. *Nat Immunol* 2: 870–875.
12. Zhang R, Zhang N, Mueller DL (2008) Casitas B-lineage lymphoma b inhibits antigen recognition and slows cell cycle progression at late times during CD4+ T cell clonal expansion. *J Immunol* 181: 5331–5339.
13. Feng D, Ma Y, Liu J, Xu L, Zhang Y, et al. (2013) Cbl-b Enhances Sensitivity to 5-Fluorouracil via EGFR- and Mitochondria-Mediated Pathways in Gastric Cancer Cells. *Int J Mol Sci* 14: 24399–24411.
14. Galisteo ML, Dikic I, Batzer AG, Langdon WY, Schlessinger J (1995) Tyrosine phosphorylation of the c-cbl proto-oncogene protein product and association with epidermal growth factor (EGF) receptor upon EGF stimulation. *J Biol Chem* 270: 20242–20245.
15. Lupher ML Jr, Reedquist KA, Miyake S, Langdon WY, Band H (1996) A novel phosphotyrosine-binding domain in the N-terminal transforming region of Cbl interacts directly and selectively with ZAP-70 in T cells. *J Biol Chem* 271: 24063–24068.
16. Wang Y, Yeung YG, Langdon WY, Stanley ER (1996) c-Cbl is transiently tyrosine-phosphorylated, ubiquitinated, and membrane-targeted following CSF-1 stimulation of macrophages. *J Biol Chem* 271: 17–20.
17. Krawczyk C, Bachmaier K, Sasaki T, Jones RG, Snapper SB, et al. (2000) Cbl-b is a negative regulator of receptor clustering and raft aggregation in T cells. *Immunity* 13: 463–473.
18. Qu X, Miah SM, Hatani T, Okazaki M, Hori-Tamura N, et al. (2005) Selective inhibition of FcRI-mediated mast cell activation by a truncated variant of Cbl-b related to the rat model of type 1 diabetes mellitus. *J Biochem* 137: 711–720.
19. Qu X, Sada K, Kyo S, Maeno K, Shahjahan Miah SM, et al. (2004) Negative regulation of Fcepsilon RI-mediated mast cell activation by a ubiquitin-protein ligase Cbl-b. *Blood* 103: 1779–1786.
20. Xu L, Qu X, Zhang Y, Hu X, Yang X, et al. (2009) Oxaliplatin enhances TRAIL-induced apoptosis in gastric cancer cells by CBL-regulated death receptor redistribution in lipid rafts. *FEBS Lett* 583: 943–948.
21. Hur EM, Park YS, Lee BD, Jang IH, Kim HS, et al. (2004) Sensitization of epidermal growth factor-induced signaling by bradykinin is mediated by c-Src. Implications for a role of lipid microdomains. *J Biol Chem* 279: 5852–5860.
22. Xu L, Zhang Y, Liu J, Qu J, Hu X, et al. (2012) TRAIL-activated EGFR by Cbl-b-regulated EGFR redistribution in lipid rafts antagonises TRAIL-induced apoptosis in gastric cancer cells. *European Journal of Cancer* 48: 3288–3299.
23. Duan L, Raja SM, Chen G, Virmani S, Williams SH, et al. (2011) Negative regulation of EGFR-Vav2 signaling axis by Cbl ubiquitin ligase controls EGF receptor-mediated epithelial cell adherens junction dynamics and cell migration. *J Biol Chem* 286: 620–633.
24. Qu X, Liu Y, Ma Y, Zhang Y, Li Y, et al. (2008) Up-regulation of the Cbl family of ubiquitin ligases is involved in ATRA and bufalin-induced cell adhesion but not cell differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 367:183–189.
25. Nakao R, Hirasaka K, Goto J, Ishidoh K, Yamada C, et al. (2009) Ubiquitin ligase Cbl-b is a negative regulator for insulin-like growth factor 1 signaling during muscle atrophy caused by unloading. *Mol Cell Biol* 29: 4798–4811.
26. Xu L, Qu X, Zhang Y, Hu X, Yang X, et al. (2009) Oxaliplatin enhances TRAIL-induced apoptosis in gastric cancer cells by CBL-regulated death receptor redistribution in lipid rafts. *FEBS Lett* 583: 943–948.

Copyright: © 2016 Salah R, et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Citation: Salah R, Harir N, Sellam F, Aidouni M, Medjania M, et al. (2016) Immunohistochemical Analysis and Pathological Assessment of B-Cbl Proto-Oncogene in Gastric Carcinoma Cells. *Peertechz J Cytol Pathol* 1(1): 054-057.