

**Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Mouloud MAMMARI de Tizi-Ouzou
Faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques
Département de Biochimie-Microbiologie**



MEMOIRE

Présenté pour l'obtention du diplôme de Magister

Spécialité : Sciences Biologiques

Option : Biochimie Appliquée aux Bio-industries

Thème

Etude du profil protéique chez des patients atteints du cancer de l'estomac. Essai de mise en évidence de protéines potentiellement candidates pour le diagnostic.

Présenté par :

SALMI Djouza

Soutenu le : 19 Mai 2014

Devant le jury composé de :

M. MATI A	Professeur UMMTO	Président
M. HOUALI K	Maitre de conférences A UMMTO	Rapporteur
M^{me} MOULTI-MATI F	Professeur UMMTO	Examineur
M. MESBAHI M	Maitre de conférences A UMMTO	Examineur

Remerciements

Je tiens avant tout à exprimer ma profonde gratitude à monsieur HOUALI K., Maître de conférences (A) à l'université UMMTO, de m'avoir proposé un sujet aussi intéressant et fort passionnant, de m'avoir accueilli dans son laboratoire et mis à ma disposition le nécessaire pour parvenir à mener à bien ce travail. Qu'il trouve ici l'expression d'un respect absolu et d'une estime sans faille, pour m'avoir apporté durant des années un enseignement de rigueur et d'une grande qualité, pour m'avoir transmis son intérêt pour la science et la recherche et pour m'avoir permis de mettre un pied dans le monde de la science et de m'y avoir entourer avec toute la ferveur scientifique et toute la modestie qui lui sont propres.

Qu'il me soit aussi permis d'exprimer mes vifs remerciements à monsieur MATI A., Professeur à l'université UMMTO, d'avoir accepté de présider le jury, mais avant tout d'avoir ouvert cette PG qui m'a permis de réaliser un rêve, celui de pousser mes études plus loin, de m'avoir permis de puiser dans sa grandeur d'esprit et sa rigueur scientifique et aussi pour tous les enseignements prodigués et tout l'intérêt qu'il m'a toujours porté tout au long de ces années. Qu'il trouve ici l'expression de mon profond respect.

Je tiens aussi à remercier madame MATI F., Professeur à l'université UMMTO, d'avoir accepté d'examiner ce travail, d'avoir vivement contribué à ma formation et pour tous les conseils prodigieux qu'elle m'a toujours apportés aussi bien sur le plan scientifique que personnel. Qu'elle trouve ici l'expression de ma reconnaissance et toute ma gratitude.

J'adresse aussi mes plus vifs remerciements à monsieur MESBAHI M., Maître de conférences (A) à l'université UMMTO, d'avoir accepté d'examiner ce travail, de m'avoir permis de découvrir pour la première fois toute la satisfaction qu'on peut trouver à donner un cours, d'avoir été pour moi un enseignant humble et noble, tout simplement un exemple à suivre. Qu'il trouve ici l'expression de mon profond respect.

Je remercie aussi le Dr SIFFER, chef de service du laboratoire central de biochimie du CHU de Tizi-Ouzou, qui m'a ouvert les portes de son service pour la réalisation des électrophorèses sur acétate de cellulose, ainsi que toute l'équipe du laboratoire et plus particulièrement madame HADJ KACI pour tous les renseignements apportés et toute sa bonne humeur, ainsi que le Dr TCHOKHANI ESSAID pour son aide lors des interprétations des protéinogrammes.

Mes remerciements s'adressent aussi à monsieur METNA pour m'avoir permis de réaliser l'étude statistique de mon travail et d'enrichir mes connaissances dans le domaine des statistiques, de m'avoir permis de connaître un homme et un scientifique d'une grande envergure.

Mes remerciements vont aussi à monsieur CHIBAH qui m'a permis de réaliser la sonication des extraits protéiques des biopsies gastriques et aussi pour ses conseils enrichissants.

Je remercie aussi très particulièrement mon amie MATI Narimane de m'avoir permis d'enrichir mes sources bibliographiques. Je remercie également, pour les mêmes raisons, Faiza la bibliothécaire ainsi que monsieur HAMDAD.

Je tiens également à remercier madame IRATNI, M^{elle} MEGUENNI, M^{elle} ISSELNANE, monsieur BARIZ et monsieur CHERGUI pour leur soutien moral, pour toutes les instructions apportées, les encouragements incessants et leur esprit d'équipe.

Mes remerciements les plus chaleureux à toutes ces personnes qui m'ont soutenue tout au long de la réalisation de ce travail, je pense plus particulièrement à toute l'équipe du laboratoire (Malika NADOUR, Dalila ALMI, Nassima SENOUCI, Samia CHABI et Sarah SI AHMED et plus particulièrement Samia DERMECHE), pour toute l'écoute et l'attention apportée et toutes les informations partagées. Je remercie aussi à cet effet monsieur HADJ KACI pour toute l'orientation qu'il ne cesse de m'apporter.

Enfin, je remercie toutes les personnes qui, de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de ce travail.

Dédicaces

- A ma défunte mère qui durant toute mon existence m'a toujours entouré d'amour, de tendresse, même après sa disparition son souvenir ne cesse de me combler de toute l'affection maternelle, je lui dois la vie et ce que je suis devenue, elle m'a apporté rigueur et discipline qu'elle repose en paix ;
- A mon père pour l'éducation qu'il m'a donné, tous les principes inculqués, l'amour et le soutien qu'il ne cesse de m'apporter. Qu'il trouve ici l'expression de mon amour absolu et inconditionnel ;
- A mon grand frère, Atheman, qui malgré la distance qui nous sépare, est toujours présent pour moi dans les moments décisifs de ma vie. Qu'il trouve ici le témoignage mon amour et mon respect ;
- A mon frère Moussa qui est pour moi un ange gardien, il veille à ce que je ne perde jamais le nord, il est ma raison. Qu'il trouve ici un symbole du respect que je lui porte ;
- A mon neveu Mouhand Ouamar, un être pur et noble qui embellie ma vie, que la sienne soit toujours remplie de succès ;
- A mon merveilleux mari pour ses encouragements, son soutien, son amitié et surtout son humour qui me permet de respirer et de prendre tout le recul nécessaire face aux situations difficiles. Qu'il trouve ici l'expression de ma reconnaissance et de mon amour ;
- A ma grand-mère ;
- A mes oncles et tantes en particulier Ahcen (que sa vie soit remplie de succès) ;
- A ma belle mère Lynda ;
- A tous les membres de ma belle famille en particulier ma belle mère pour toute sa compréhension et mes neveux : Rayane et Ilyas pour leur distraction.
- A mes plus chères amies : Khadidja, Nawel, Sara, Numidia et Sabrina qui enrichissent ma vie ;
- A Souad ISSELNANE et Samia DERMECHE pour leur amitié et leur soutien ;
- A tous les membres de ma promotion ;
- A toutes les personnes qui ont croisé ma route et qui ont contribué à ce que je devienne quelqu'un de meilleur.

Résumé

Le cancer gastrique est l'un des cancers les plus fréquents dans le monde avec un million de nouveaux cas chaque année. Il demeure la deuxième cause de décès par cancer chez les deux sexes. Il représente 5% de tous les cancers répertoriés en Algérie. Il vient en cinquième position avec 1430 cas chaque année.

Le cancer gastrique a été associé au virus d'Epstein-Barr (EBV) depuis 1990, il a été d'abord recherché dans les carcinomes gastriques de type lymphoépithélial, ensuite dans tous les autres types histologiques avec une incidence de 10 à 18%. La protéine LMP-1 est considérée comme l'oncogène majeur d'EBV. Grâce à sa signalisation, LMP1 présente des propriétés immortalisantes et transformantes, capable d'inhiber la différenciation cellulaire.

L'approche la plus prometteuse pour réduire la mortalité par cancer gastrique reste le diagnostic précoce par l'identification de bio-marqueurs spécifiques et sensibles. C'est dans ce contexte que nous avons d'abord réalisé des électrophorèses sur plaques d'acétate de cellulose des sérums de sujets atteints de cancer gastrique. Les protéinogrammes obtenus sont, d'une manière générale, très similaires et ils présentent une allure conforme aux tracés dits normaux. Certains d'entre eux présentent des hypo-protéïnémies et des diminutions de la concentration en albumine en relation avec un syndrome inflammatoire et des pertes protéiques par saignement digestif.

Dans un second temps, nous avons réalisé des PAGE –SDS pour comparer les profils protéiques de sérums de sujets atteints de cancer gastrique avec ceux de sujets sains. Il est difficile d'associer les différences constatées au cancer gastrique.

Ensuite, nous avons réalisé des ELISA sur sérums et sur des extraits protéiques de biopsies gastriques afin de rechercher la présence éventuelle de la protéine LMP1. Cette dernière a été détectée dans près de 50% des cas. Au niveau des sujets sains, les prélèvements se sont révélés négatifs. Par des tests statistiques, nous avons montré que la protéine est exprimée sans distinction de l'âge du patient ni du stade d'avancement du cancer. LMP-1 pourrait ainsi servir de bio-marqueur pour le diagnostic du cancer gastrique EBV positif.

Mots clés : Cancer gastrique, EBV, LMP1, PAGE-SDS, ELISA, protéinogrammes.

Abstract

The gastric cancer is one of the most common cancers in the world with one million new cases each year; it remains the second leading cause of death with for both sexes. It represents 5% of all cancers listed in Algeria. It comes in fifth position with 1430 cases each year.

Some reports suggest that gastric cancer is associated to Epstein- Barr virus (EBV) since 1990; it was first sought in gastric carcinomas lymphoepithelial type then in all other histological types with an incidence of 10 to 18 %. The LMP- 1 protein is considered as the major EBV oncogene. Thanks to its signaling, LMP-1 shows immortalizing and transforming properties and it is capable of inhibiting cellular differentiation.

The most promising approach to reduce gastric cancer mortality remains the precocious diagnosis by the identification of specific and sensitive biomarkers. It is in this context that we first made electrophoresis cellulose acetate plates sera of patients with gastric cancer. The proteinogrammes obtained are generally very similar to each other and they have a shape conforming to those said to be normal paths. Some of them have hypo - proteinemias and reduce the concentration of albumin in a relationship with inflammation and protein losses by gastrointestinal bleeding.

In a second step, we performed SDS-PAGE to compare the protein profiles of sera from subjects Reach gastric cancer with those of healthy subjects. It is difficult to associate the differences noticed to gastric cancer.

Then, we performed ELISA on sera and protein extracts of gastric biopsies to check the presence of LMP1 protein. The latter was detected in each of these samples. On healthy subjects, the samples were negative. By statistical tests, we showed that it is expressed without distinction of the age of the patient or the advancement of the cancer stage. LMP- 1 could serve as a biomarker for the diagnosis of EBV- positive gastric cancer.

Key words: Gastric cancer, EBV, LMP1, SDS-PAGE, ELISA, proteinogrammes.

Liste des abréviations

AJCC : Association Japonaise Contre le Cancer

ARN EBER : EBV Encoded RNAs

BART : BamHI A region's Rightward Transcripts

CBF1/RBP-J κ : Centromere Binding Factor 1 / Recombination-Binding Protein Jkappa

CCC : Covalently Closed Circle

CIMP : CpG island methylator phenotype

Ct : C terminal

CTAR : C terminal Activating Region

EA : Early Antigen

EBER : Epstein-Barr Encoded RNA

EBNA : EBV Nuclear Antigen

EBNA : Epstein-Barr Nuclear Antigen

EBNA2 : EBV Nuclear Antigen 2

HHV : *Human Herpes Virus*

Hp : *Helicobacter pylori*

IEA : Immediate Early Antigen

IR1 : Internal Repeat 1

ISH : Hybridation in situ

ITAM : Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif

LMP : Latent Membrane Protein

LOH : Loss of heterozygosity

LP : Leader Protein

miARN : micro ARN

MNI : Mononucléose infectieuse

Nt : N terminal

Ori-Lyt : Origine de réplication lytique

Ori-P : Origine de réplication latente

PM : Poids moléculaire

pRb : protéine du Rétinoblastome

PUMA : p53 Up-regulated Modulator of Apoptosis)

RIPA : Radio Immuno Precipitation Assay

TES : Transforming Effector Sites

TMB : Tetramethylbenzidine

TNF : Tumor Necrosis Factor

TNM : tumeur, nodules et métastases

TR : Terminal repeat

TRADD : TNF-R Associated Death Domain

UICC : Union internationale contre le cancer

UL : Long Unique region

US : Short Unique region

VCA : Viral Capside Antigène

ZEBRA : Z Epstein-Barr Replication Activator

Liste des figures

N° des figures	Page
Figure 1 : Estimation des taux d'incidence et de mortalité normalisés selon l'âge pour 100 000 habitants.....	04
Figure 2 : Aspect anatomique de l'estomac.....	06
Figure 3 : Drainage ganglionnaire de l'estomac. Classification japonaise.....	06
Figure 4 : Perte d'expression d'E-cadhérine et sa relation avec la cancérogenèse.....	10
Figure 5 : E-cadhérine et le complexe cadhérine- caténine.....	10
Figure 6 : Représentation de la phylogénie de la famille des <i>Herpesviridae</i>	13
Figure 7 : Structure du virus EBV.....	14
Figure 8 : Organisation génomique linéaire de l'EBV.....	15
Figure 9 : Représentation schématique de l'organisation épisomale de l'EBV.....	15
Figure 10 : Cycle de vie du virus d'Epstein-Barr et ses interactions avec les cellules hôtes.....	17
Figure 11 : Structure de la protéine LMP1.....	21
Figure 12 : Structure de la protéine LMP2A.....	22
Figure 13 : Représentation schématique du développement et de la progression du carcinome gastrique EBV associé.....	29
Figure 14 : Courbe de calibration du gel de séparation en PAGE-SDS.....	34
Figure 15 : Répartition selon les tranches d'âge.....	36
Figure 16 : Répartition en fonction du sexe et des tranches d'âge.....	37
Figure 17 : Distribution selon le stade d'avancement du cancer gastrique.....	37
Figure 18 : Electrophorèse sur acétate de cellulose des échantillons de sérums des sujets atteints de cancer gastrique.....	39
Figure 19 : Variation de la protéinémie totale.....	40
Figure 20 : Variation de la concentration sérique en albumine.....	41
Figure 21 : Variation de la concentration sérique en alpha 1 globuline.....	42
Figure 22 : Variation de la concentration sérique en alpha 2 globuline.....	43
Figure 23: Variation de la concentration sérique en bêta globuline.....	43
Figure 24 : Variation de la concentration sérique en gammaglobuline.....	44
Figure 25 : Gel 1 avec les échantillons de sérum de sujets sains : 1, 2, 3, 4 et 5 et des patients avec un cancer gastrique : S2, S3, S4 et S5.....	47
Figure 26 : Gel 2 avec les échantillons de sérum de sujets sains : 5, 6, 7, 8 et 9 et des patients avec un cancer gastrique : S7, S8, S10 et S12.....	52
Figure 27 : Gel 3 avec les échantillons de sérum de sujets sains : 9, 10, 11, 12 et 13 et des patients avec un cancer gastrique : S13, S14, S16 et S18.....	52
Figure 28 : Gel 4 avec les échantillons de sérum de sujets sains : 13, 14, 15, 16 et 17	

et des patients avec un cancer gastrique : S19, S6', T14 et T15.....	53
Figure 29 : Gel 5 avec les échantillons de sérum de sujets sains : 18, 19, 20 et 21 et les patients avec un cancer gastrique : T16, T17, T18 et T19.....	53
Figure 30 : Détection de la LMP-1 avec le test ELISA dans le sérum de patients atteints de cancer gastrique.....	55
Figure 31 : Détection de la LMP-1 avec le test ELISA dans les extractions protéiques des biopsies des patients atteints de cancer gastrique.....	57
Figure 32 : Détection de la LMP-1 avec le test ELISA dans le sérum des sujets sains.	58

Liste des tableaux

N° des tableaux	Page
Tableau I : Incidence, mortalité et prévalence du cancer de l'estomac dans le monde en 2008.....	04
Tableau II : Classification TNM de l'UICC et l'AJCC du cancer gastrique.....	07
Tableau III : Altération des gènes dans les deux types histologiques du cancer gastrique.....	11
Tableau IV : Profil d'expression des protéines virales selon le type de latence.....	24
Tableau V : Résultats statistiques obtenus par le test de conformité d'une moyenne pour les échantillons de sérums des patients atteints de cancer gastrique.....	56
Tableau VI : Résultats statistiques obtenus par le test de conformité d'une moyenne pour les échantillons d'extraits protéiques des patients atteints de cancer gastrique.....	57
Tableau VII : Résultats statistiques obtenus par le test de conformité d'une moyenne pour les échantillons de sérums des sujets sains.....	59
Tableau VIII : Test de KRUSKAL et WALLIS pour les échantillons de sérums des sujets malades (variante indépendante : l'âge du patient au moment du diagnostic)....	61
Tableau IX : Test de KRUSKAL et WALLIS pour les échantillons des extraits protéiques des biopsies gastriques (variante indépendante : l'âge du patient au moment du diagnostic).....	61
Tableau X : Test de KRUSKAL et WALLIS pour les échantillons de sérums des sujets malades (variante indépendante : stade d'avancement de la maladie).....	62
Tableau XI : Test de KRUSKAL et WALLIS pour les échantillons des extraits protéiques des biopsies gastriques (variante indépendante : stade d'avancement de la maladie).....	62

Liste des annexes

Annexe 1 : Distribution géographique du cancer gastrique chez les individus de sexe masculin.

Annexe 2 : Tampons et solutions utilisées.

Annexe 3 : Protéinogrammes obtenus par électrophorèse sur acétate de cellulose pour les différents échantillons de sérums des sujets atteints de cancer gastrique.



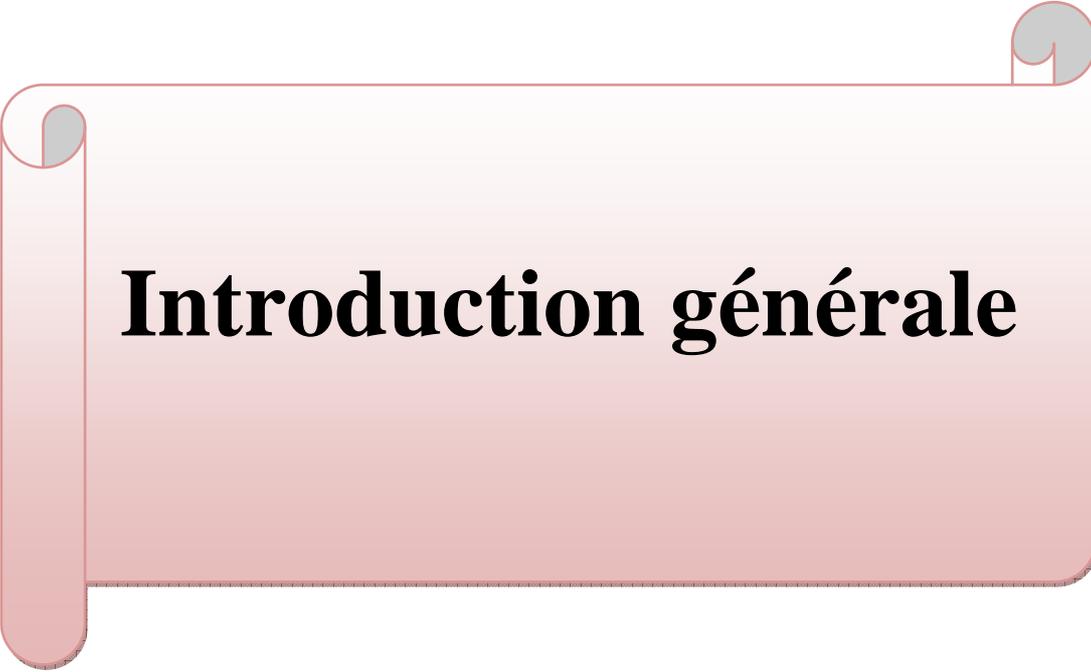
Table des matières

Table des matières

	Page
Introduction générale	01
1. Synthèse bibliographique	
1.1 Cancer gastrique.....	03
1.1.1. Epidémiologie.....	03
1.1.2. Manifestations cliniques du cancer gastrique.....	05
1.1.3. Classification du cancer gastrique.....	05
1.1.4. Facteurs de risque.....	07
1.1.4.1. Facteurs alimentaires et environnementaux.....	07
1.1.4.2. Conditions précancéreuses.....	08
1.1.4.2.1. Conditions pathologiques de prédisposition.....	08
1.1.4.2.2. Infection à <i>Helicobacter pylori</i>	08
1.1.4.3. Facteurs génétiques.....	09
1.2. Virus d'Epstein- Barr.....	12
1.2.1. Historique.....	12
1.2.2. Caractéristiques générales d'EBV.....	12
1.2.2.1. Taxonomie et épidémiologie.....	12
1.2.2.2. Structure de l'EBV.....	13
1.2.2.3. Organisation génomique du virus.....	14
1.2.3. Primo infection et pénétration cellulaire par l'EBV.....	15
1.2.4. Phase de latence.....	17
1.2.4.1. Protéines nucléaires.....	17
1.2.4.1.1. Protéine EBNA1.....	17
1.2.4.1.2. Protéine EBNA2.....	18
1.2.4.1.3. Protéine EBNA-LP (Leader Protein ou EBNA-5).....	18
1.2.4.1.4. Protéines EBNA-3 (3A/3, 3B/4, 3C/6).....	18
1.2.4.2. ARN viraux EBER et BART.....	19
1.2.4.2.1. ARN EBER.....	19
1.2.4.2.2. ARN BART.....	19
1.2.4.3. Protéines de latence membranaires (Latent Membrane Proteins).....	20
1.2.4.3.1. LMP-1.....	20
1.2.4.3.2. LMP-2A et LMP-2B.....	21
1.2.5. Différents types de latence.....	22
1.2.6. Phase de réplication.....	24
1.2.6.1. Cycle lytique.....	24
1.2.6.2. Protéines du cycle lytique.....	25
1.2.6.2.1. Protéines très précoces (IEA).....	25
1.2.6.2.2. Protéines précoces (EA, Early Antigen).....	25
1.2.6.2.3. Protéines tardives.....	25
1.3. Carcinome gastrique et le virus d'Epstein- Barr.....	26
1.3.1. Caractéristiques oncologiques de l'EBV.....	26
1.3.2. Carcinomes gastriques associés à l'EBV.....	26
1.3.2.1. Définition.....	26
1.3.2.2. Epidémiologie du carcinome gastrique EBV positif.....	27
1.3.3. Caractéristiques cliniques du carcinome gastrique EBV	

positif.....	27
1.3.4. Histogenèse du cancer gastrique EBV positif.....	27
2. Matériel et méthodes	
2.1. Matériel.....	30
2.1.1. Matériel biologique.....	30
2.1.2. Appareillage.....	30
2.1.3. Produits chimiques et réactifs.....	30
2.2. Méthodes.....	31
2.2.1. Électrophorèse des protéines sériques sur acétate de cellulose.....	31
2.2.1.1. Précautions à prendre lors d'une électrophorèse des protéines sériques sur acétate de cellulose.....	31
2.2.1.2. Dépôt.....	32
2.2.1.3. Migration électrophorétique.....	32
2.2.1.4. Coloration et décoloration.....	32
2.2.1.5. Eclaircissement.....	32
2.2.1.6. Lecture par densitomètre.....	32
2.2.2. PAGE SDS des protéines sériques en présence de β mercaptoéthanol.....	33
2.2.2.1. Conditions générales de la conduite de l'électrophorèse.....	33
2.2.2.2. Préparation des échantillons.....	33
2.2.2.3. Dépôt des échantillons dans le gel et mise sous tension.....	33
2.2.2.4. Révélation des bandes électrophorétiques.....	33
2.2.3. Détermination des poids moléculaire des protéines.....	34
2.2.4. Extraction des protéines tissulaires des tumeurs gastriques.....	34
2.2.5. Recherche de la protéine de latence membranaire LMP1 par ELISA.....	35
2.2.6. Tests statistiques.....	35
2.2.6.1. Test de conformité d'une moyenne.....	35
2.2.6.2. Test de KRUSKAL et WALLIS.....	35
3. Résultats et discussion	
3.1. Distribution en fonction du sexe et des groupes d'âge.....	36
3.2. Etude clinique.....	37
3.2.1. Stade du cancer gastrique.....	37
3.3. Etude des résultats obtenus par l'électrophorèse des protéines sériques sur acétate de cellulose.....	38
3.3.1. Etude du protéinogramme des protéines sériques.....	38
3.3.2. Variation de la protéinémie.....	40
3.3.3. Variation des différentes fractions protéiques.....	41
3.3.3.1. Variation de la concentration en albumine.....	41
3.3.3.2. Variation de la concentration de la fraction α 1 globuline.....	41
3.3.3.3. Variation de la concentration en alpha 2 globuline.....	42
3.3.3.4. Variation de la concentration de la fraction bêta globuline.....	43
3.3.3.5. Variation de la concentration de la fraction gammaglobuline.....	44
3.3.4. Interprétation de l'électrophorèse des protéines sériques.....	44
3.4. Etude des profils protéiques des protéines sériques obtenus par PAGE-SDS...	46
3.4.1. Caractérisation des protéines sériques.....	46
3.4.2. Comparaison des profils électrophorétiques obtenus.....	51
3.5. Analyse quantitative de LMP-1 par ELISA.....	54

3.5.1. Révélation de l'expression de la LMP-1 par le test ELISA.....	54
3.5.2. Relation entre l'âge du patient atteint de cancer gastrique et l'expression de LMP-1.....	61
3.5.3. Relation entre le stade du cancer gastrique et l'expression de LMP-1...	62
Conclusion.....	64
Références bibliographiques	
Annexes	



Introduction générale

Introduction générale

Le cancer de l'estomac est l'un des cancers les plus fréquents dans le monde. Près d'un million de nouveaux cas sont recensés chaque année. Cette tumeur représente 7,8% de tous les nouveaux cas de cancer, ce qui en fait actuellement le quatrième cancer dans le monde. (JEMAL *et al*, 2011 ; FERLAY *et al*, 2012). Le cancer gastrique représente 5% de tous les cancers répertoriés en Algérie. Il vient en cinquième position avec 1430 cas chaque année (FERLAY *et al*, 2012). Il est la deuxième cause de décès par cancer chez les deux sexes dans le monde (736 000 décès, soit 9,7% du total). Son pronostic reste délicat avec un taux de survie d'environ 15% à 5 ans (DE MARTEL *et al*, 2013).

Les facteurs de risques alimentaires ou environnementaux comme l'alcool et le tabac jouent très probablement un rôle majeur, s'ajoutent à ceux là les facteurs génétiques de prédisposition. Il a été mis en évidence que les mécanismes moléculaires sous-jacents du cancer gastrique comprennent le plus souvent des altérations des oncogènes, des gènes suppresseurs de tumeurs, des régulateurs du cycle cellulaire, des molécules d'adhésion cellulaire et des gènes de réparation de l'ADN (CORSO *et al*, 2012).

Le virus d'Epstein Baar (EBV) est un herpèsvirus humain. Il s'agit d'un virus ubiquitaire avec plus de 95% de la population adulte qui porte la trace de la primo-infection, et cela quelque soit la répartition géographique. Très tôt, le rôle oncogénique du virus d'Epstein-Barr fut soupçonné suite à la capacité du virus à immortaliser *in vitro* des cellules B humaines. Ces cellules comportaient le génome viral à l'état latent, exprimant différentes protéines virales. Ainsi, un virus pouvant induire une telle immortalisation *in vitro* pouvait avoir un rôle dans la lymphomagenèse *in vivo* (THOMPSON et KURZROCK, 2004). Une affection maligne pourra se développer plusieurs années après la primo-infection à la condition de mutations oncogéniques accompagnées d'une diminution du système immunitaire de l'hôte, de la présence d'un second agent infectieux ou de l'existence d'autres aberrations ou mutations génétiques. (BELL et RICKINSON, 2003).

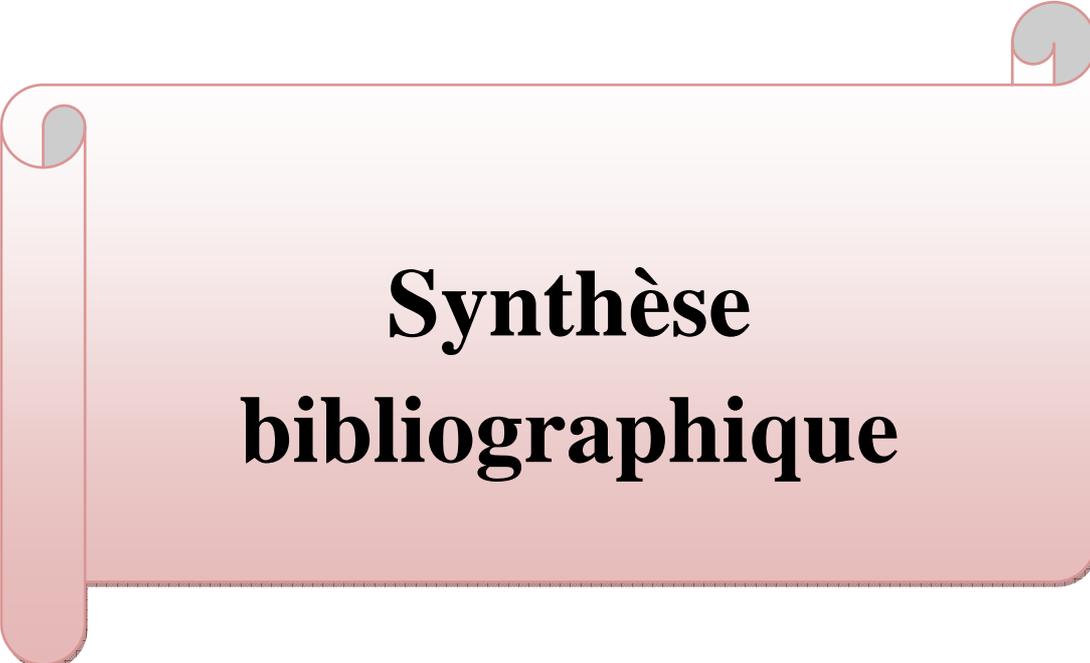
Les cancers gastriques ont été associés à une infection par le virus d'Epstein-Barr depuis 1990. L'association a d'abord été décrite dans une forme rare de tumeur gastrique, identique aux carcinomes EBV positifs observés dans d'autres organes dont le nasopharynx, et connue sous le nom de carcinome indifférencié à stroma lymphoïde, (UOZAKI et FUKAYAMA, 2008). Il a ensuite été montré que tous les types histologiques classiques d'adénocarcinomes gastriques peuvent être associés à l'infection EBV (AKIBA *et al*, 2008). Des études suggèrent que le virus infecte précocement les cellules épithéliales gastriques. De plus, de forts titres d'anticorps anti-EBV sont détectés chez les patients. Par ailleurs, l'infection par l'EBV de lignées épithéliales primaires gastriques permet une meilleure prolifération et génère une croissance en agar, suggérant un rôle du virus dans la carcinogenèse (CORVALAN *et al*, 2006 ; KIM *et al*, 2010).

LMP1 (Latent Membrane Proteins) est considérée comme l'oncogène majeur d'EBV. Grâce à sa signalisation, LMP1 présente des propriétés immortalisantes et transformantes, et est responsable de nombreux changements phénotypiques dans les cellules infectées par

l'EBV (AHSAN et KANDA, 2005). D'après DAWSON *et al* (2012) l'expression de LMP1 conduit au détournement et à la dérégulation chronique de voies de signalisation cellulaire et de leurs gènes cibles impliqués notamment dans des processus prolifératifs.

Le cancer gastrique présente une symptomatologie clinique discrète, le plus souvent tardive et aspécifique, témoignant d'une maladie déjà localement avancée ou métastatique. (SAIF *et al*, 2010). Ce qui fait que l'identification de la maladie à un stade précoce peut être l'approche la plus prometteuse pour réduire la mortalité par cancer gastrique.

Le but de la présente étude est, d'une part, la mise en évidence d'un protéome spécifique au cancer gastrique, d'abord par l'étude des protéinogrammes sériques de patients atteints de cancer gastrique par électrophorèse sur acétate de cellulose afin d'identifier d'éventuelles variations des différentes fractions protéiques, qui pourraient permettre aux praticiens d'orienter son diagnostic, ensuite par la comparaison des profils protéiques obtenus par PAGE-SDS de sujets atteints de cancer gastrique à ceux de sujets sains, et d'autre part, l'étude de l'expression de LMP-1 chez ces patients par le test ELISA. Cette protéine peut servir comme bio-marqueur spécifique et sensible pour le diagnostic de la maladie.



**Synthèse
bibliographique**

1. Synthèse bibliographique

1.1 Cancer gastrique

1.1.1. Epidémiologie

Le cancer de l'estomac est l'un des cancers les plus fréquents dans le monde. Environ un million de nouveaux cas sont recensés chaque année. Cette tumeur représente 7,8% de tous les nouveaux cas de cancer, ce qui en fait actuellement le quatrième cancer dans le monde, après le cancer du poumon (1608055 de cas soit 12,7%), du sein (1384155 de cas soit 10,9%), et le cancer colorectal (1235108 de cas soit 9,8%). Son incidence dans les pays en développement est plus élevée que dans les pays industrialisés avec plus de 70% des cas (figure 1) (NAESS *et al*, 2005 ; FERLAY *et al*, 2012).

Il existe une variation géographique considérable dans l'incidence du cancer gastrique dans le monde avec les taux les plus élevés en Asie de l'Est (avec la moitié du total mondial), l'Amérique du Sud et l'Europe de l'Est et du Sud (tableau I). L'Europe Occidentale et l'Amérique du Nord sont des régions à risque moyen et l'Afrique à risque faible (BROWN *et al*, 1998 ; DE MARTEL *et al*, 2013).

En Algérie, le cancer de l'estomac vient en cinquième position avec 1430 cas chaque année, soit 5%, précédé du cancer du sein, du cancer colorectal, celui du poumon et de la vessie (14,9%, 9,1%, 8,9% et 5,5% respectivement) (FERLAY *et al*, 2012).

Cependant, le cancer gastrique ne suit pas toujours un schéma de distribution géographique clair (annexe 1). Ainsi, bien que quelques unes des populations du monde les plus à risque soient dans les pays asiatiques, certaines d'entre elles ont des taux relativement faibles comme dans le cas de l'Inde (tableau I) (FERLAY *et al*, 2012). Il y a aussi des groupes à très haut risque au sein de populations à faible risque, par exemple, les Coréens vivant aux Etats-Unis. Des études ont montré que les immigrants de la première génération ont le même risque de développer un cancer gastrique que ceux de leur pays d'origine, tandis que les générations suivantes prennent un risque similaire à celui existant dans leur nouveau pays (HAENSZEL *et al*, 1972 ; APARICIO *et al*, 2004). Cela peut suggérer un rôle pour l'alimentation et l'environnement.

Il existe une prédominance masculine avec un sex-ratio de 2 (figure 1). Les cancers de l'estomac surviennent rarement avant l'âge de 40 ans. L'incidence augmente rapidement au-delà, avec un pic pendant la septième décennie. Ainsi environ 60% des patients atteints de ce cancer ont plus de 65 ans (JEMAL *et al*, 2011 ; DE MARTEL *et al*, 2013).

Le cancer de l'estomac est la deuxième cause de décès par cancer chez les deux sexes dans le monde (736 000 décès, soit 9,7% du total). Les taux de mortalité les plus élevés sont estimés en Asie orientale (28,1 pour 100.000 hommes et 13 pour 100.000 femmes), et les plus bas en Amérique du Nord (2,8 et 1,5 respectivement) (JEMAL *et al*, 2011 ; FERLAY *et al*, 2012) (figure 1). Le pronostic du cancer de l'estomac reste faible avec un taux de survie d'environ 15% à 5 ans pour les personnes non opérées et de l'ordre de 35% à 5 ans pour les patients opérés. La survie est fortement dépendante du stade durant lequel la tumeur est

diagnostiquée, en plus, le site de la tumeur au moment du diagnostic contribue également au pronostic de survie (VERDECCHIA *et al*, 2003 ; DE MARTEL *et al*, 2013).

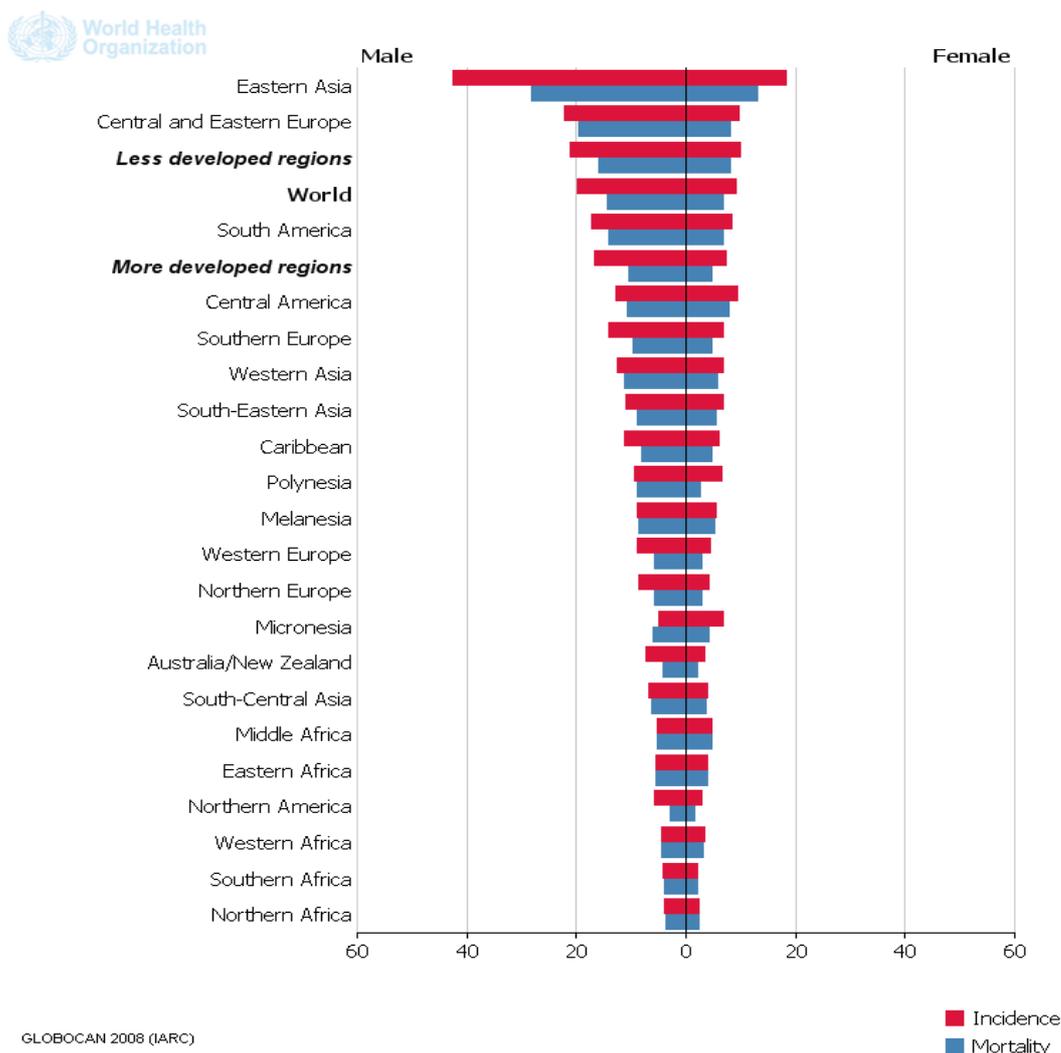


Figure 1 : Estimation des taux d'incidence et de mortalité normalisés selon l'âge pour 100 000 habitants (FERLAY *et al*, 2012).

Tableau I : Incidence, mortalité et prévalence du cancer de l'estomac dans le monde en 2008 pour 100 000 habitants (JEMAL *et al*, 2011).

Estimation du nombre	Chez les hommes			Chez les femmes		
	Les cas	Décès	Prévalence à 5 ans	Les cas	Décès	Prévalence à 5 ans
Le monde	640	463	1050	348	273	548
Les pays développés	173	110	361	101	70	193
Les pays en développement	467	353	688	246	202	354
Les Etats Unis d'Amérique	13	6	20	8	4	12
La Chine	315	231	466	148	121	214
L'Inde	21	20	15	13	12	10
L'Union européenne	50	37	74	32	24	47

1.1.2. Manifestations cliniques du cancer gastrique

La symptomatologie clinique du cancer gastrique est discrète, le plus souvent tardive et aspécifique, témoignant d'une maladie déjà localement avancée ou métastatique. Les tumeurs débutantes sont habituellement asymptomatiques et rarement détectées en dehors d'une politique de dépistage ciblée (SONALI et MASTER, 2004 ; SAIF *et al*, 2010). Les premières manifestations cliniques sont banales et n'inquiètent pas le patient. Une perte de poids et des douleurs abdominales représentent les symptômes les plus fréquents lors du diagnostic initial. Une fièvre inexplicée, une anémie et une asthénie sont aussi fréquentes (CATALANO *et al*, 2005 ; ALLUM, 2011).

Les patients atteints de cancer gastrique avancé peuvent présenter des manifestations cutanées systémiques comprenant des kératoses séborrhéiques diffuses et une acanthosis nigricans (pigmentation sombre dans les plis de la peau et des muqueuses) (YEH *et al*, 2000 ; SAIF *et al*, 2010). Des anomalies hématologiques, y compris une anémie hémolytique, des néphropathies membrano-prolifératives, le syndrome d'hypercoagulation (syndrome de Trousseau) ont été également rapportées (ALLUM, 2011).

1.1.3. Classification du cancer gastrique

D'un point de vue anatomopathologique, les adénocarcinomes gastriques sont divisés en deux grands groupes en fonction de la localisation : ceux situés au niveau de la jonction de l'œsophage ou cardia, sont appelés proximaux, par opposition aux cancers distaux, situés au niveau du corps ou de l'antrum gastrique (figure 2) (ROTH, 2003 ; ETO *et al*, 2006).

La classification histologique des adénocarcinomes la plus couramment utilisée est celle présentée par LAUREN en 1965. Elle distingue deux catégories : la forme intestinale bien différenciée, caractérisée par des cellules néoplasiques formant des structures glandulaires et la forme diffuse caractérisée par une prolifération cellulaire en amas non organisés, infiltrant de façon diffuse le mur gastrique (ETO *et al*, 2006 ; MINEUR *et al*, 2010).

La forme intestinale généralement bien différenciée est fréquemment ulcérée, elle survient dans l'estomac distal et est souvent précédée d'une phase précancéreuse prolongée, associée à une gastrite atrophique sévère avec métaplasie intestinale (BARBER, 2006 ; SAIF *et al*, 2010). La forme diffuse peu différenciée, survient plus fréquemment chez des patients jeunes et atteint plutôt l'estomac proximal. Elle est caractérisée par une infiltration muqueuse de cellules tumorales comportant un cytoplasme rempli de mucine et un noyau excentré, leur donnant un aspect de cellules en bague à chaton (ETO *et al*, 2006 ; SAIF *et al*, 2010). On trouve également dans cette classification des tumeurs mixtes qui associent les deux aspects, et les tumeurs inclassables (ROTH, 2003 ; MINEUR *et al*, 2010).

Cependant, la classification post-thérapeutique (tableau II) repose sur la classification de TNM (tumeur, nodules et métastases) de l'Union internationale contre le cancer (UICC) et de l'association Japonaise contre le cancer (AJCC) (MINEUR *et al*, 2010 ; JOAQUIN *et al*, 2011). Cette classification décrit 16 sites ganglionnaires répartis en trois groupes (N1, N2, N3

et N4). Ces regroupements sont modifiés en fonction du siège du primitif (figure 3). Généralement, les ganglions péri-gastriques le long de la petite courbure (sites 1, 3 et 5) et de la grande courbure gastrique (sites 2, 4 et 6) correspondent au groupe N1. Les ganglions le long de l'artère coronaire stomacique (site 7), de l'artère hépatique commune (site 8), du tronc coeliaque (site 9) et de l'artère splénique (site 10 et 11) correspondent au groupe N2 (JOAQUIN *et al*, 2011).

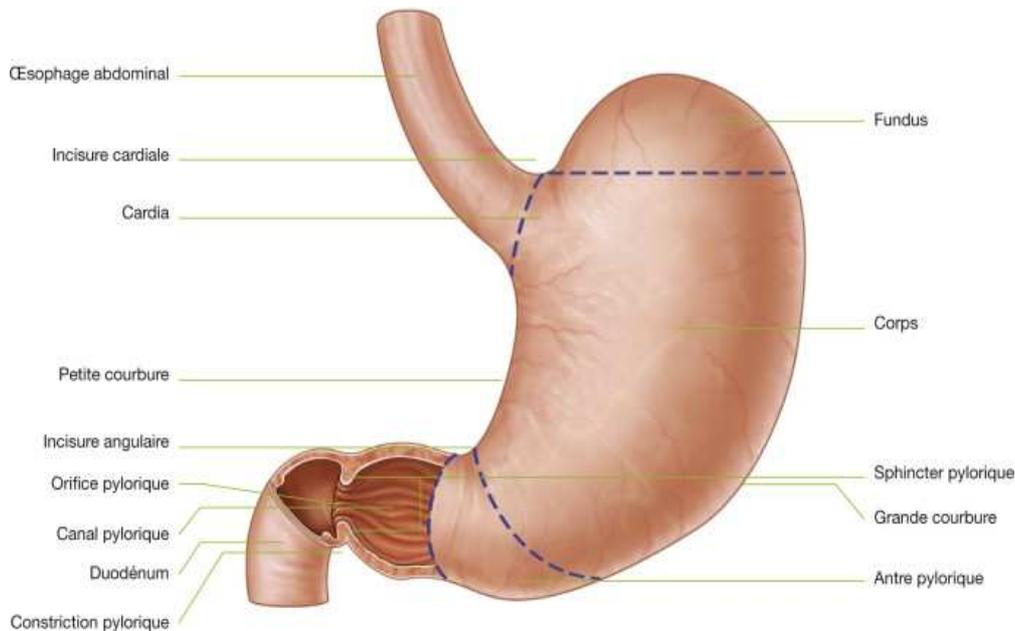


Figure 2 : Aspect anatomique de l'estomac (DILLENSEGER, 2011).

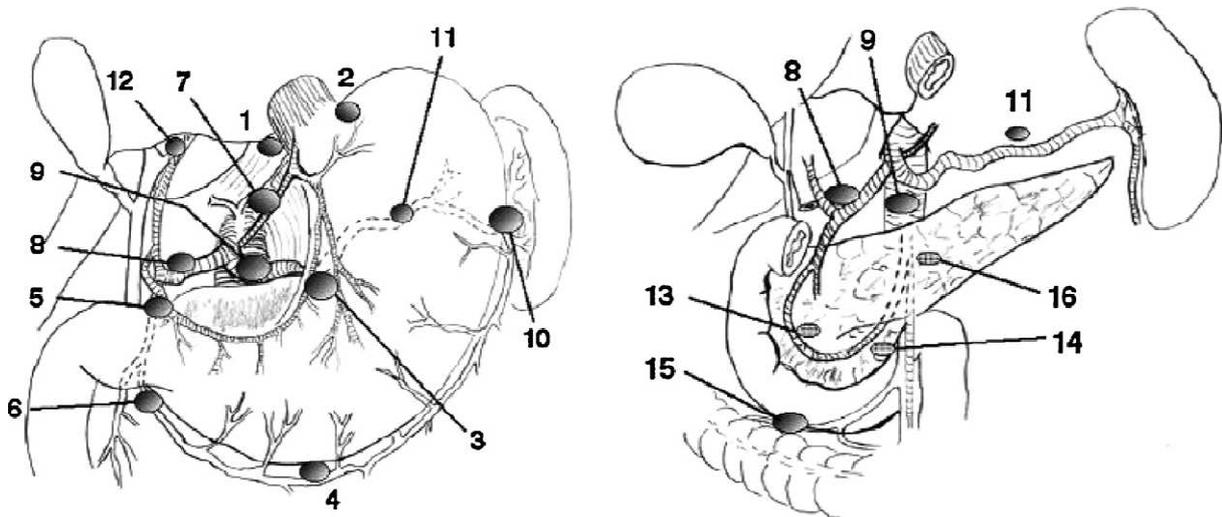


Figure 3 : Drainage ganglionnaire de l'estomac. Classification japonaise (HENNEQUIN *et al*, 2008).

Aires ganglionnaires péri-gastriques (N1) : 1. Péricardiale droite ; 2. Péricardiale gauche ; 3. Petite courbure ; 4. Grande courbure ; 5. Suprapylorique ; 6. Infrapylorique. Axe coeliaque (N2) : 7. Artère gastrique gauche ; 8. Hépatique ; 9. Coeliaque ; 10 et 11. Splénique. Distaux (N3) : 12. Hépatoduodéal ; 13. Péripancréatique ; 14. Mésentérique. Abdominaux (N4) : 15. Colique médiane ; 16. Para-aortique.

Tableau II : Classification TNM de l'UICC et l'AJCC du cancer gastrique.

Stade du cancer	T : Tumeur	N : Nodule	M : Métastase
Stade IA	T1	N0	M0
Stade IB	T1	N1	M0
	T2	N0	M0
Stade IIA	T2	N1	M0
Stade IIB	T4a	N0	M0
	T3	N1	M0
Stade IIIA	T3	N2	M0
	T2	N3	M0
	T4a	N1	M0
Stade IIIB	T3	N3	M0
	T4b	N0-N1	M0
	T4a	N2	M0
Stade IIIC	T4a	N3	M0
	T4b	N2-N3	M0
Stade IV	Tout T	Tout N	M1

T : Tumeur primitive, T1 : tumeur envahissant la lamina propria, la muscularis mucosae ou la sous-muqueuse. T2 : tumeur envahissant la musculature propre ou la sous séreuse, le ligament gastro colique, gastro hépatique, le petit ou grand épiploon si absence de perforation du péritoine viscéral. T3 : tumeur envahissant le péritoine viscéral (séreuse) sans envahissement d'organes adjacents. T4 : tumeur envahissant les structures adjacentes, T4a : tumeur envahissant toute la séreuse, T4b : tumeur envahissant les structures adjacentes. N : Nodule, N0 : pas d'envahissement des ganglions régionaux. N1 : 1 à 2 ganglions envahis. N2 : 3 à 6 ganglions envahis. N3 : 7 ganglions envahis et plus. M : Métastase, M0 : pas de métastase à distance. M1 : présence de métastase à distance.

1.1.4. Facteurs de risque

1.1.4.1. Facteurs alimentaires et environnementaux

De nombreuses études ont suggéré un rôle protecteur d'une alimentation riche en fruits frais et en légumes crus (CHYOU *et al*, 1990 ; TSUBONO *et al*, 1997 ; RIBOLI et NORAT, 2003 ; ZHANG *et al*, 2012). Les antioxydants contenus dans ces aliments inhibent les radicaux libres potentiellement carcinogènes ((DRAKE *et al*, 1996 ; SERAFINI *et al*, 2002 ; BJELAKOVIC *et al*, 2004 ; GALVAN-PORTILLO *et al*, 2010).

Une alimentation riche en sel est associée à un risque accru de cancer de l'estomac. Les études chez l'animal révèlent qu'une diète riche en sel provoque une gastrite atrophique ou une dysplasie et favorise la carcinogenèse gastrique (KODAMA *et al*, 1984 ; PELETEIRO *et al*, 2011). Une diminution de l'incidence du cancer gastrique est corrélée avec une diminution de la consommation des aliments conservés par salage et fumage, remplacé par une conservation par réfrigération (D'ELIA *et al*, 2012).

1.1.4.2. Conditions précancéreuses

1.1.4.2.1. Conditions pathologiques de prédisposition

Plusieurs conditions ont été associées à un risque accru de cancer de l'estomac. Il s'agit notamment de la gastrite atrophique chronique avec métaplasie intestinale, l'ulcère gastrique, et la gastrectomie subtotale. La gastrite atrophique chronique peut résulter d'une anémie pernicieuse ou d'une infection chronique à *Helicobacter pylori* (Hp). Toutefois, moins de 10% des patients atteints de gastrite chronique progressent en cancer gastrique. Le risque relatif de cancer gastrique est de 1,5 à 2 fois plus élevé chez les sujets présentant un ulcère gastrique par rapport à une population témoin. Les patients qui ont subi une résection gastrique subtotale ont un risque accru de développer un cancer gastrique dans les 15 à 20 ans suivant leur première chirurgie (FARAJI et FRANK, 2002 ; WHITING *et al*, 2002).

1.1.4.2.2. Infection à *Helicobacter pylori*

Helicobacter pylori est reconnu comme un facteur étiologique de cancer gastrique depuis 1994 (ESLICK *et al*, 1999 ; DANTAS MACHADO *et al*, 2010). Un modèle animal chez des gerbilles de Mongolie a confirmé que l'infection par Hp était responsable de l'apparition d'adénocarcinomes gastriques (WEN et MOSS, 2009).

L'identification d'Hp dans la muqueuse à distance des lésions cancéreuses a constitué la première évidence d'une association possible (NAUMAUN et CRABTREE ; 2004). Certaines populations, notamment en Inde et en Thaïlande, présentent des taux élevés d'infection par Hp mais une faible incidence du cancer de l'estomac (SUZUKI *et al*, 2012). De même qu'au Japon, un pays avec un fort taux de cancer de l'estomac, il a été estimé que les 60 millions de personnes infectées par Hp seulement 0,4% développent un cancer de l'estomac (KIM *et al*, 2011).

Il y a également l'hypothèse que l'infection à Hp induit une réponse inflammatoire, activant des cellules inflammatoires comme les neutrophiles et les macrophages qui libèrent des médiateurs, incluant des espèces réactives de l'oxygène (MACHIDA-MONTANI *et al*, 2004). Ces médiateurs confèrent un stress oxydatif sur les cellules dans le voisinage immédiat. Des études semblent indiquer que la force de l'association peut varier en fonction du type de souche d'Hp. Cette bactérie présente une grande diversité génétique. Au niveau phénotypique, on peut distinguer les souches qui contiennent des gènes associés à l'expression de cytotoxines, comme par exemple le gène CagA et *VacA* qui sont des facteurs de virulence pour la survenue de lésions muqueuses inflammatoires (BLASER, 1995 ; EKSTROM *et al*, 2001). Les bactéries possédant spécifiquement le gène *VacA* de génotype s1/m1 ont été associées à la survenue de cancer gastrique (SHIMOYAMA *et al*, 1998; MIEHLKE *et al*, 2000 ; SUZUKI *et al*, 2012). De plus, l'infection à Hp CagA positive semble porter un plus grand risque de cancer de l'estomac, tandis que l'Hp CagA négative est moins liée à la malignité (PARSONNET, 1997 ; LOCHHEAD et EL- OMAR, 2007).

La réactivité de l'hôte à l'agent pathogène peut aussi avoir une certaine importance. Des données ont montré que le polymorphisme du gène de l'interleukine-1 (IL-1) peut, sous une

stimulation antigénique, conduire à la production de l'interleukine-1 bêta, une cytokine pro-inflammatoire et un puissant inhibiteur de la sécrétion de l'acide gastrique (BEALES *et al*, 1998 ; EL-OMAR, 2000 ; SUZUKI *et al*, 2012).

1.1.4.3. Facteurs génétiques

De nombreux facteurs contribuent à la carcinogenèse gastrique : instabilité des microsatellites (BEGHELLI *et al*, 2006 ; CORSO *et al*, 2011), altérations génétiques ou épigénétiques des oncogènes et gènes suppresseurs de tumeurs (QU *et al*, 2013). Les altérations moléculaires somatiques impliquées dans la genèse des cancers gastriques sont différentes dans les formes intestinales et diffuses (tableau III). Des mutations somatiques du gène de la E-cadhérine (CDH1) ou une hyperméthylation du promoteur de ce gène sont caractéristiques des adénocarcinomes de type diffus (figure 4) (MORE *et al*, 2007 ; CARNEIRO *et al*, 2012), tandis que, parmi les nombreuses mutations décrites au cours des cancers de type intestinal, les plus fréquentes concernent p53 (RESENDE *et al*, 2010 ; SADEGHI *et al*, 2011). Les mutations des gènes APC (LEE, 2002) et de la β caténine (EBERT *et al*, 2002) sont plus rares au début des cancers gastriques. Un déséquilibre allélique (LOH) est également observé pendant la carcinogenèse gastrique, et à stade égal dans les adénocarcinomes de type intestinal que diffus (BALASSIANO *et al*, 2011), ce qui témoigne du rôle joué par les gènes suppresseurs de tumeurs. Parmi ces gènes, on trouve le gène bcl-2 dont la surexpression supprime l'activité cellulaire proliférative et est corrélée avec un comportement biologique moins agressif des cancers (YASUI *et al*, 2011).

La plupart des formes familiales de cancer gastrique résultent probablement de l'interaction de facteurs d'environnement et de facteurs génétiques. Parmi les formes familiales de cancer gastrique, on distingue les cancers gastriques diffus héréditaires qui sont liés à une mutation germinale de l'anti-oncogène CDH1 avec perte de fonction de la protéine E-cadhérine (PAREDES *et al*, 2012).

E-cadhérine, également connu sous le nom d'uvomoruline ou L-CAM est une glycoprotéine membranaire calcium dépendante, elle intervient dans l'adhésion cellulaire. A travers ces interactions impliquant une séquence de liaisons caténine, la E-cadhérine peut s'associer directement avec la β ou γ -caténine (plakoglobine), molécules qui lient la E-cadhérine à l'actine du cytosquelette par l'intermédiaire de la α caténine (figure 5). L'ensemble compose le complexe cadherine-caténine, dont la fonction principale est de joindre l'actine du cytosquelette des cellules voisines pour former des tissus cohésifs (GRAZIANO *et al*, 2003 ; CHUN, 2006). En plus de son rôle principal dans l'adhésion, la E-cadhérine assure le maintien de la polarité cellulaire, la motilité cellulaire, l'organisation de l'actine du cytosquelette, ainsi son expression est forte dans les cancers adhérents bien différenciés et réduite dans des cancers indifférenciés (FITZGERALD et CALDAS, 2004).

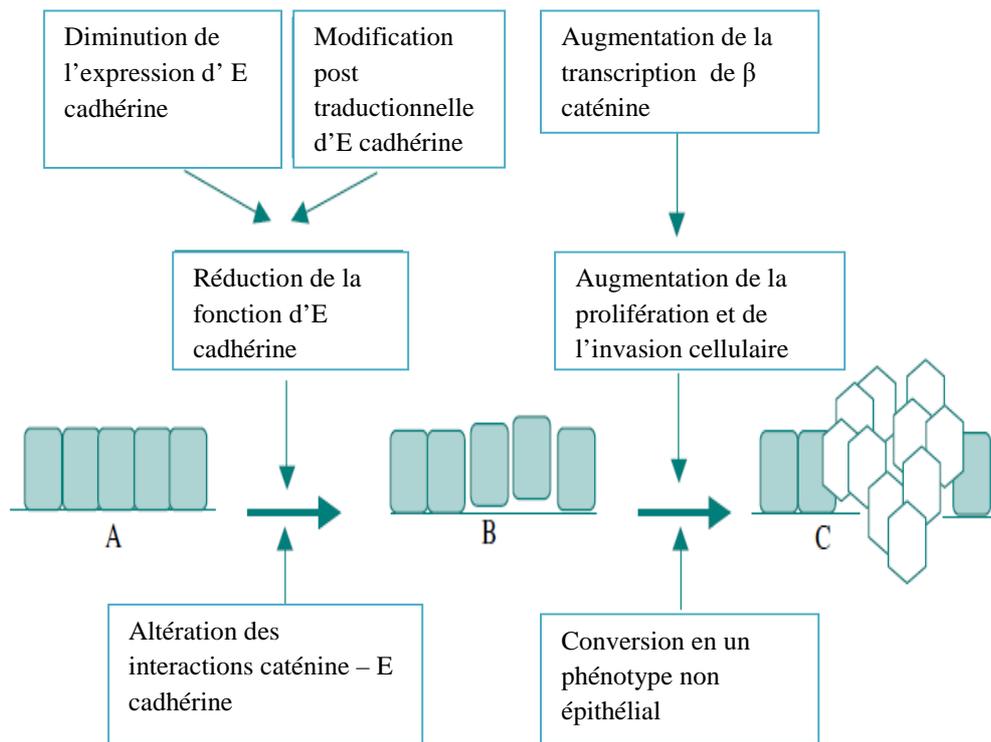


Figure 4 : Perte de l'expression d'E-cadhérine et sa relation avec la cancérogenèse (BARBER *et al*, 2006).

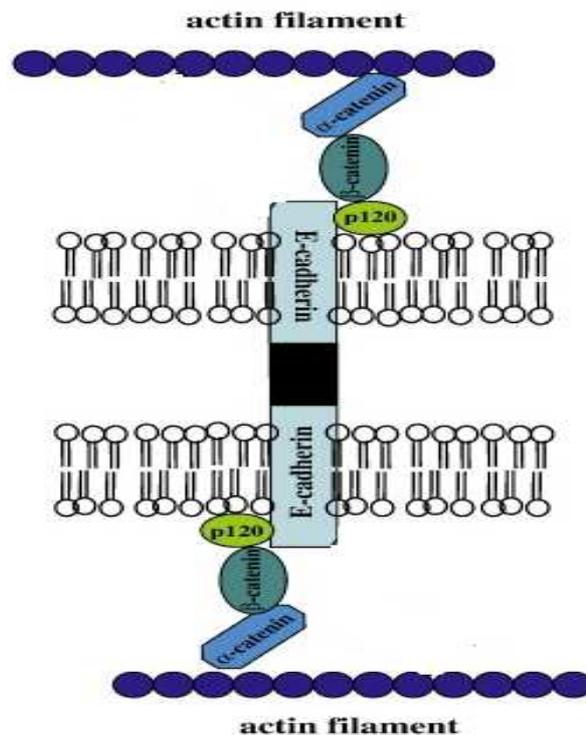


Figure 5 : E-cadhérine et le complexe cadhérine- caténine (YANG *et al*, 2009).

Tableau III : Altération des gènes dans les deux types histologiques du cancer gastrique.

Rôle physiologique	Gène	Altération	Type intestinal	Type diffus	Références
Contrôle de la croissance cellulaire et la prolifération	APC	Mutation	50%	-	(YASHIRO <i>et al</i> , 2005)
	K-ras	Surexpression	Faible incidence	-	(YASHIRO <i>et al</i> , 2005)
	c-met	Amplification, surexpression	20%	-	(CHOI <i>et al</i> , 2012)
	c-erbB2	Amplification, surexpression	10 – 15%	-	(YOKOTA <i>et al</i> , 1988)
	k-sam	Amplification, surexpression	-	35%	(CORSO <i>et al</i> , 2012)
Cycle cellulaire et l'apoptose	Cycline E	Surexpression	15 – 20%	15 – 20%	(CHOI <i>et al</i> , 2009)
	P16	Expression réduite	12 – 30%	12 – 30%	(MITOMI <i>et al</i> , 2011)
	P 27	Expression réduite	40 – 50%	40 – 50%	GAO <i>et al</i> , 2011)
	P 53	Mutation, LOH, hyperméthylation	25 – 40%	25 – 40%	(SADEGHI <i>et al</i> , 2011)
	c-myc	Surexpression	40 – 45%	40 – 45%	(PARK <i>et al</i> , 2011)
	Bcl-2	LOH, surexpression	12 – 35%	12 – 35%	(YASUI <i>et al</i> , 2011)
Adhésion et migration cellulaire	CDH1	LOH, mutation, expression réduite	-	20 – 90%	(PAREDES <i>et al</i> , 2012)

1.2. Virus d'Epstein- Barr

1.2.1. Historique

Le virus d'Epstein-Barr (EBV) a été découvert par Epstein et Barr qui se sont intéressés au lymphome de Burkitt. Ils ont découvert par microscopie électronique sur des cultures lymphomateuses issues de lymphomes de Burkitt une particule virale avec les mêmes caractéristiques morphologiques que les herpès-virus, qui fut dès lors nommée virus d'Epstein-Barr (NICOLAS *et al*, 1997 ; TALBOT et CRAWFORD, 2004 ; DESAI et RODRIGUES, 2013).

Par la suite et afin d'identifier les patients risquant de développer un lymphome de Burkitt, Gertrude et Werner Henle élaborèrent un test sérologique. En 1968, des études séro-épidémiologiques montrèrent que la grande majorité de la population adulte possède des anticorps dirigés contre l'EBV et que ce virus est l'agent étiologique de la mononucléose infectieuse (MNI) (THOMPSON et KURZROCK, 2004 ; KLEIN et NAGY, 2010).

Les capacités de l'EBV à transformer *in-vitro* des lymphocytes B et à induire des lymphomes chez les primates sont alors démontrées et confortent l'hypothèse selon laquelle l'EBV est un agent oncogène chez l'homme (NICOLAS *et al*, 1997 ; YOUNG et MURRAY, 2003).

Depuis lors, l'EBV est reconnu pour être impliqué dans des pathologies malignes diverses d'origine épithéliale comme le carcinome du nasopharynx, le carcinome mammaire et le carcinome gastrique, ou d'origine lymphoïde comme les lymphomes de Hodgkin et de Burkitt, des lymphomes T et les maladies lymphoprolifératives surgissant après immunosuppression des patients sidéens (RICKINSON et KIEFF, 2001 ; NICOLAS et SEIGNEURIN, 2002 ; DESAI et RODRIGUES, 2013).

1.2.2. Caractéristiques générales d'EBV

1.2.2.1. Taxonomie et épidémiologie

L'EBV est classé dans la famille des *herpesviridae* humains. Ces herpès-virus humains ou HHV (*Human Herpes Virus*) sont un vaste ensemble qui comprend huit virus : les herpes simplex de types 1 et 2 (HSV1 et HSV2) ; le virus de la varicelle et du zona (VZV) ; le cytomégalovirus (CMV) ; le virus d'Epstein-Barr (EBV) et les herpes virus lymphotropes (HHV6, HHV7 et HHV8 associé au sarcome de Kaposi) (ECKER *et al*, 2005). Les *herpesviridae* sont répartis en trois sous-familles selon leurs propriétés biologiques, l'alpha (HSV1, HSV2 et VZV), bêta (CMV, HHV6 et HHV7) et gamma-Herpesvirinae (EBV et HHV8). Dans la sous-famille de *gamma-herpesvirinae*, l'EBV est classé dans le genre lymphocryptovirus (figure 6).

Les différentes souches d'EBV peuvent être classées en 2 types (EBV-1 et EBV-2) sur la base du polymorphisme de leurs gènes EBNA2 (EBV Nuclear Antigen 2), EBNA3A, 3B et 3C. La souche EBV-1 est majoritaire dans les pays occidentaux, alors que la souche EBV-2

ne prévaut que dans certaines zones d'Afrique Equatoriale et de Nouvelle-Guinée (MACSWEEN et CRAWFORD, 2003 ; DAVISON, 2010).

Le réservoir viral de l'EBV est strictement humain. Il s'agit d'un virus ubiquitaire. Plus de 95% des adultes dans le monde portent la trace de la primo-infection (EKSTROM-SMEDBY, 2006 ; DESAI et RODRIGUES, 2013). La primo-infection a lieu le plus souvent chez l'enfant, chez qui elle est généralement asymptomatique. Lorsque l'infection a lieu plus tard, chez l'adolescent ou l'adulte jeune, elle peut provoquer la MNI (HOCHBERG *et al*, 2004; LONGNECKER et NEIPEL, 2007). La transmission de l'EBV se fait généralement par l'intermédiaire des sécrétions oropharyngées contenant le virus infectieux, et la transmission est également possible par transfusion sanguine et transplantation par les lymphocytes B infectés (GRULICH et VAJDIC, 2005; MULLER *et al*, 2005). Le virus de l'EBV est détectable durant toute la vie de l'individu dans les lymphocytes B mémoires circulants, traduisant l'état de latence du virus, et dans la salive représentatif de la phase lytique du virus (MIDDELDORP *et al*, 2003; RICKINSON et KIEFF, 2007).

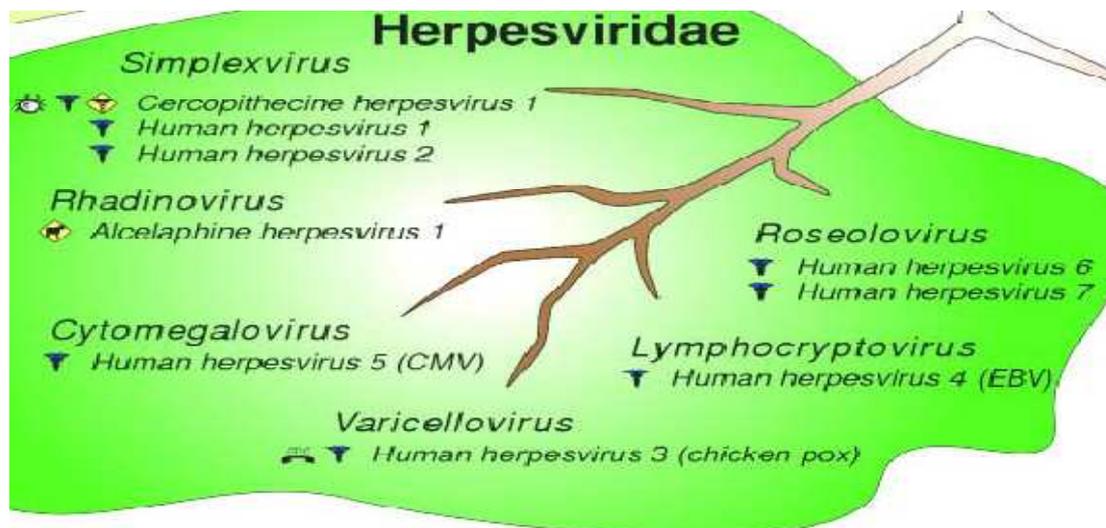


Figure 6 : Représentation de la phylogénie de la famille des *Herpesviridae* (ECKER *et al*, 2005).

1.2.2.2. Structure de l'EBV

L'EBV possède une structure commune aux différents membres de la famille des Herpèsvirus (figure 7). Dans le virion, l'ADN génomique de l'EBV bicaténaire, linéaire, enroulé autour de protéines basiques fibrillaires, l'ensemble formant le nucléoïde ou core. Cette structure majeure est entourée d'une nucléocapside icosaédrique de 162 capsomères (150 hexamères et 12 pentamères) mesurant 100 à 120 nm de diamètre. Le tégment est un matériel globuleux composé de protéines virales et cellulaires, réparti entre la nucléocapside et l'enveloppe (JOHANNSEN *et al*, 2004; SZAKONYI *et al*, 2006 ; KLEIN et NAGY, 2010).

L'enveloppe virale est composée par les membranes nucléaire et plasmique de la cellule infectée. Cette enveloppe contient notamment des glycoprotéines virales, les gp350/220 qui servent à l'attachement du virion à la surface de la cellule-hôte par interaction avec le récepteur de la fraction CR2 (CD21) du complément. D'autres glycoprotéines virales, les gp42/38, gp85 (gH) et gp25 (gL) se fixent aux molécules du Complexe Majeur d'Histocompatibilité de classe II (CMH II) et ont un rôle de co-récepteurs, menant à l'internalisation du virus (MULLEN *et al*, 2002; YOUNG et RICKINSON, 2004).

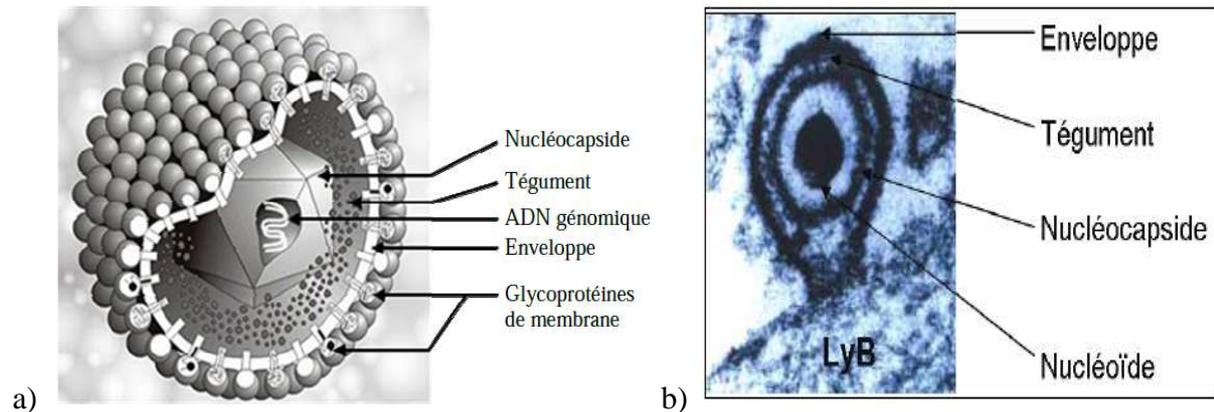


Figure 7 : Structure du virus EBV (YOUNG et RICKINSON, 2004) :

a) Reconstitution tridimensionnelle d'EBV, b) Image d'un virion dans la première phase de l'infection d'un lymphocyte B par microscopie électronique.

1.2.2.3. Organisation génomique du virus

Le génome de l'EBV se compose d'un ADN bicaténaire de 172 kpb codant pour quelques 85 protéines. L'ADN est linéaire dans la particule virale et porte à ses extrémités deux séquences répétitives (TR : terminal repeat) dont la séquence varie de 4 à 12 répétitions suivant les souches virales (YOUNG et RICKINSON, 2004 ; DAVISON, 2010). Le génome comporte également une importante zone de répétition interne (Internal Repeat 1 ou IR1) séparant le génome en deux régions uniques longue et courte (respectivement, Long Unique region ou UL et Short Unique region ou US) (figure 8). La fusion des deux extrémités TR aboutit à la circularisation du virus, pour donner la forme épisomale sous laquelle le virus persistera lors de sa phase de latence dans les cellules infectées. L'ADN viral forme alors un Covalently Closed Circle (CCC) (RICKINSON et KIEFF, 2007). Pendant cette période de latence, l'EBV utilise une origine de répllication latente Ori-P pour se répliquer de façon synchrone avec la cellule infectée (figure 9). Il existe une autre origine de répllication, Ori-Lyt, composée de deux régions homologues DR et DL, servant à la répllication lytique (figure 8).

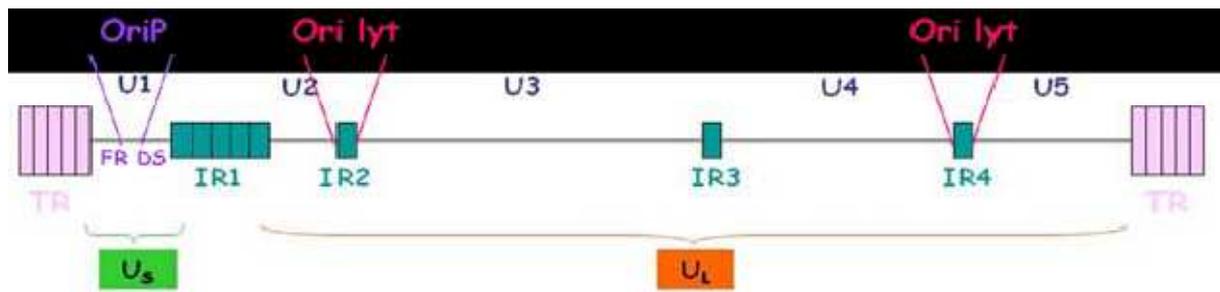


Figure 8 : Organisation génomique linéaire de l'EBV (YOUNG et RICKINSON, 2004).

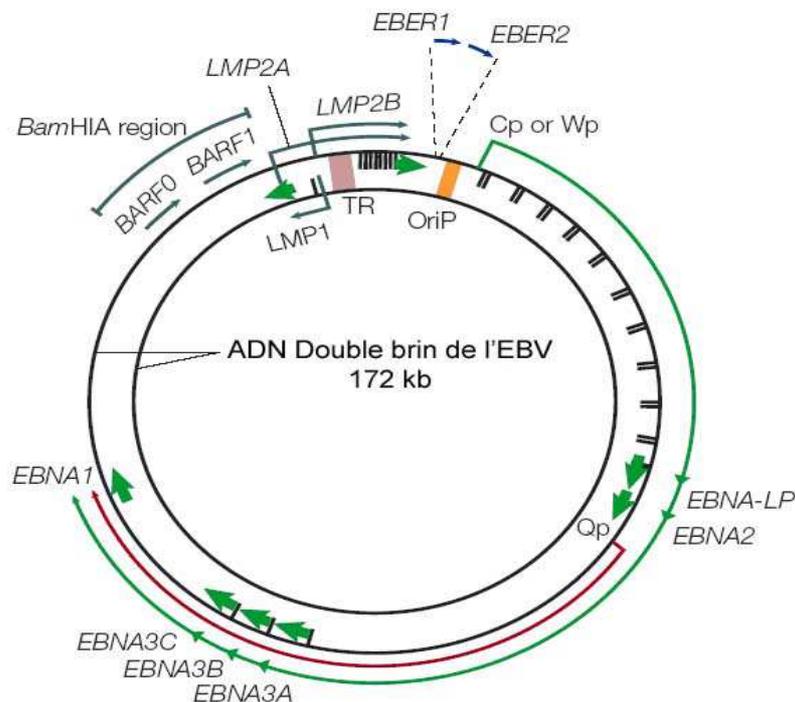


Figure 9 : Représentation schématique de l'organisation épisomale de l'EBV (YOUNG et RICKINSON, 2004).

Les régions codantes des protéines de latence sont représentées par les flèches vertes. Ces protéines de latence sont composées des 6 antigènes nucléaires (EBNA-LP, 1, 2, 3A, 3B et 3C) et des 3 protéines membranaires de latence (LMP-1, LMP-2A et 2B). Les flèches bleues représentent les ARN transcrits non-traduits EBER. Cp, Wp et Qp sont les promoteurs de la latence.

1.2.3. Primo infection et pénétration cellulaire de l'EBV

In-vivo le virus pénètre dans l'organisme par la salivaire. La première phase de l'infection est caractérisée par une infection lytique dont le siège est le tissu lymphoépithélial de l'oropharynx. Les lymphocytes B présents dans l'oropharynx sont les cibles préférentielles d'EBV. L'ancrage de la particule virale à la membrane cellulaire des lymphocytes B se fait par une interaction entre la glycoprotéine d'enveloppe virale gp350/220 et le récepteur cellulaire CD21, également appelé CR2 (JUNKER, 2005 ; KLEIN *et al.*, 2010). Après fusion de l'enveloppe virale avec la membrane plasmique, la nucléocapside rentre dans le cytosol.

Cette pénétration du virus requiert un complexe de quatre glycoprotéines virales gH (gp85), gL (gp25), gB (gp110) et gp42 (ROWE *et al*, 2013). Les trois premières glycoprotéines sont nécessaires pour la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane cellulaire des lymphocytes B alors que la gp42, considérée comme un corécepteur, se lie aux molécules du CMH-II et intervient dans la pénétration du virus dans la cellule par endocytose. Après décapsidation, le génome viral migre sous forme linéaire vers le noyau (LOUGHREY *et al*, 2004; ISOBE *et al*, 2004 ; KLEIN et NAGY, 2010), où il se circularise pour établir un état de latence.

Au niveau de l'oropharynx, l'EBV infecte également les cellules épithéliales où il établit un site d'amplification de particules virales excrétées dans la salive du sujet qui est alors très contagieux (FAFI- KREMER *et al*, 2005; HADINOTO *et al*, 2009).

L'entrée d'EBV dans les cellules épithéliales est un mécanisme plus complexe et différent de celui des lymphocytes B. En effet, certaines cellules épithéliales n'expriment pas le CD21, de même, ces cellules n'expriment pas le CMH II, la présence de la gp42 et des glycoprotéines gp350/220 n'est donc pas nécessaire. L'attachement et l'entrée de la particule virale dans les cellules épithéliales se fait grâce aux glycoprotéines gH et gL sur un récepteur gHgLR (REISINGER, 2006 ; KLEIN *et al*, 2010). L'infection des cellules épithéliales peut également avoir lieu par un transfert direct à partir des lymphocytes infectés *via* une synapse virale (SHANNON-LOWE *et al*, 2006). L'infection des cellules épithéliales par EBV est également possible par phagocytose des corps apoptotiques contenant plusieurs copies du génome d'EBV.

BORZA *et al* (2002) ont mis en évidence le fait que les particules virales produites par les lymphocytes B sont déficientes en gp42 et auront une plus grande capacité à infecter les cellules épithéliales, tandis que les particules virales produites par les cellules épithéliales sont riches en gp42 et auront un très haut niveau infectieux pour les lymphocytes B.

Au cours de cette primo-infection, le virus établit donc une infection latente dans des lymphocytes B naïfs ou des lymphocytes B mémoires, conduisant à la multiplication de lymphoblastes exprimant une latence de type III. La prolifération de ces cellules est contrôlée par une forte réponse immune menée par les lymphocytes T CD8+ ainsi qu'une réaction NK non spécifique permettant la lyse d'une très grande majorité des cellules infectées par le virus. Seules quelques cellules survivent en réduisant au minimum l'expression d'antigènes viraux de latence. Ainsi, l'EBV persiste à vie dans quelques lymphocytes B mémoires (un sur un million) (Figure 10) (THORLEY-LAWSON *et al*, 2005 ; ROWE *et al*, 2011).

Occasionnellement, des cellules infectées par l'EBV sont recrutées au niveau des centres germinaux, à ce niveau, les lymphocytes B infectés expriment les protéines de la latence de type I ou II, lesquelles retournent après dans le réservoir de lymphocytes B mémoires de latence 0, ou bien se différencient en plasmocytes, retournent sur les sites de l'oropharynx et activent le cycle lytique viral (Figure 10). Les virions produits peuvent à leur tour induire le cycle lytique dans les cellules épithéliales, l'individu sera alors contagieux quelques jours, voire quelques semaines (REISINGER, 2006 ; GARTNER et PREIKSAITIS, 2010).

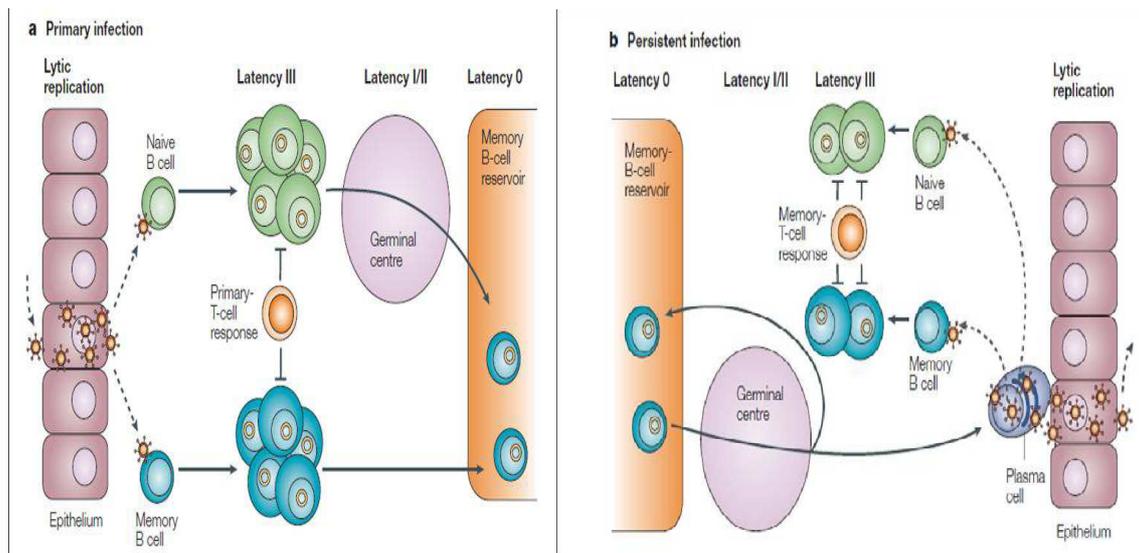


Figure 10 : Cycle de vie du virus d'Epstein-Barr et ses interactions avec les cellules hôtes (YOUNG et RICKINSON, 2004).

1.2.4. Phase de latence

Lors de l'infection par l'EBV, deux événements sont essentiels au maintien du virus : d'une part, l'inhibition du passage vers le cycle lytique et le maintien de la structure épisomale et, d'autre part, l'expression des gènes dits de latence. Chaque copie de l'épisome est répliquée par une ADN polymérase cellulaire lors du cycle cellulaire, à partir de l'origine de répllication Ori-P. Les produits des gènes de latence sont les protéines EBNA (Epstein-Barr Nuclear Antigen), les protéines LMP (Latent Membrane Protein) et les ARN EBER (EBV Encoded RNAs) et BART (BamHI A region's Rightward Transcripts). Les protéines de latence dérèglent les fonctions cellulaires en détournant la régulation transcriptionnelle et différentes voies de signalisation cellulaires, aboutissant à l'immortalisation de la cellule hôte (NICOLAS et SEIGNEURIN, 2002).

1.2.4.1. Protéines nucléaires

Dans un premier temps, l'expression des protéines EBNA est initiée à partir du promoteur Wp puis, lorsque la transformation cellulaire est établie, c'est le promoteur Cp qui prend le relais. Il existe six protéines de latence EBNA : EBNA-1, 2, 3A, 3B, Leader Protein (LP) et 3C.

1.2.4.1.1. Protéine EBNA1

Elle est retrouvée dans tous les types de latence et, de ce fait, dans toutes les pathologies associées à EBV. En effet, les propriétés biologiques de la protéine EBNA1 sont indispensables au maintien du virus dans la cellule en prolifération. Ainsi, EBNA1 se fixe sur une région de répétitions située dans l'origine de répllication plasmidique (oriP) et également

sur les chromosomes de la cellule hôte lors de la mitose (IMAI *et al.*, 2005). Grâce à ces fixations, la protéine EBNA1 permet la réplication et le maintien du génome viral dans les cellules en prolifération (HEBNER *et al.*, 2003 ; CANAAN *et al.*, 2009).

Quelques études montrent également l'importance de la protéine EBNA1 pour la transformation cellulaire. En effet, des souris transgéniques pour EBNA1 présentent une forte incidence de lymphomes B (KENNEDY *et al.* 2003). De plus, indépendamment de sa fonction de maintien du génome viral, EBNA1 semble impliqué dans l'inhibition de l'apoptose des cellules B infectées par EBV (CANAAN *et al.*, 2009).

1.2.4.1.2. Protéine EBNA2

La protéine EBNA-2 est la première protéine virale exprimée après l'introduction du génome viral dans le noyau de la cellule hôte par l'intermédiaire du promoteur Wp. Elle se lie à l'ADN par l'intermédiaire de la protéine Centromere Binding Factor 1 / Recombination-Binding Protein Jkappa (CBF1/RBP-Jκ) et active ainsi la transcription de gènes cellulaires comme CD21 et CD23 ou viraux tels que LMP1 et LMP2 (KELLY *et al.*, 2002 ; MUROMOTO *et al.*, 2009). EBNA2 semble également interagir avec l'oncogène c-myc. L'activation de ces proto-oncogènes pourrait contribuer à l'altération de la croissance et de la différenciation cellulaire afin de favoriser la prolifération des lymphocytes B (TSURUMI *et al.*, 2005 ; LIU *et al.*, 2013).

1.2.4.1.3. Protéine EBNA-LP (Leader Protein ou EBNA-5)

La protéine EBNA-LP est la première à être exprimée avec EBNA-2 lors de l'infection. EBNA-LP n'est pas indispensable au processus d'immortalisation mais elle en augmente l'efficacité (LING *et al.*, 2005 ; PENG et MOSES, 2005). Elle potentialiserait les effets d'EBNA-2 en augmentant son activité transcriptionnelle.

De plus, EBNA-LP se co-localise notamment avec les protéines pRb (Rétinoblastome), p53 et p14ARF (inhibe la dégradation de p53) suggérant son rôle dans la régulation du cycle cellulaire. Alors que la transfection de p14ARF induit l'arrêt de la croissance et la mort cellulaire, la présence d'EBNA-LP réduit considérablement cet effet. Ainsi, il a été suggéré que la protéine EBNA-LP pourrait bloquer l'action de p14ARF et donc diminuer le niveau de la protéine p53 (KASHUBA *et al.*, 2003 ; PANG et LIN, 2009).

1.2.4.1.4. Protéines EBNA-3 (3A/3, 3B/4, 3C/6)

Les protéines EBNA-3A et EBNA-3C sont essentielles à l'immortalisation des lymphocytes B *in vitro*, contrairement à la protéine EBNA-3B. La délétion complète de l'exon codant EBNA-3B ne perturbe ni l'immortalisation ni la croissance des cellules B *in vitro* (CHEN *et al.* 2005 ; YENAMANDRA *et al.*, 2009).

Les EBNA-3 ne se fixent pas directement à l'ADN et pourraient agir *via* l'interaction avec des protéines cellulaires capables de se lier à l'ADN comme CBF1/RBP-JK (BURGESS *et al.*, 2006). Les EBNA-3 pourraient inhiber la transcription en déplaçant CBF1/RBP-Jκ de sa cible ADN, inhibant ainsi le recrutement d'activateurs de transcription comme EBNA-2. En

effet, il a été décrit que les EBNA-3 inhibent l'activation par EBNA2 des promoteurs latents montrant ainsi une boucle de régulation au niveau de l'expression virale (BUCK *et al*, 2006). L'expression d'EBNA-3C dans des fibroblastes perturbe les points de contrôle du cycle cellulaire *via* les protéines régulatrices pRb et p27^{KIP1} (BAJAJ *et al*, 2008 ; SAHA *et al*, 2009).

1.2.4.2. ARN viraux EBER et BART

1.2.4.2.1. ARN EBER

Les ARN EBER1 et EBER2 (Epstein-Barr Encoded RNA) sont des petits ARN nucléaires non polyadénylés qui sont exprimés dans tous les programmes de latence d'EBV. La particularité de ces petits ARN est leur très grande quantité, en moyenne, un million de copies sont détectées dans la cellule infectée. Ils sont retrouvés essentiellement dans le noyau au sein de complexes ribonucléoprotéiques très stables (LOUGHREY *et al*, 2004).

Ces ARN joueraient un rôle dans l'épissage des ARN des protéines EBNA et LMP (YAJIMA *et al*, 2005) et de façon plus générale, dans le maintien de l'EBV dans l'organisme hôte. En effet, ils sont impliqués dans des mécanismes anti-apoptotiques par l'expression de Bcl-2, une molécule anti-apoptotique (LOUGHREY *et al*, 2004), suppriment l'effet antiviral des interférons α et γ et induisent la production d'IL-10, cytokine immuno-suppressive (YAJIMA *et al*, 2005).

1.2.4.2.2. ARN BART

Les ARN BART (Rightward Transcripts of the BamHI A region) sont aussi retrouvés dans tous les types de latence virale. Ils présentent dans leur extrémité 5', un cadre de lecture ouvert, BARF0. Des études *in vitro*, réalisées avec une des protéines BARF0 (RK-BARF0) surexprimée, montrent que cette protéine pourrait induire la transcription de LMP1 en l'absence d'EBNA2 grâce à une interaction avec le précurseur du récepteur Notch. Cependant, l'expression des protéines BARF0, n'a jamais été retrouvée *in vivo* (VAN BEEK et BRINK, 2003) du fait de sa durée de vie très courte. Un autre transcrite est généré à partir de la région BAMHI et code BARF1 retrouvée dans des tumeurs d'origines épithéliales et est considérée comme un oncogène (WIECH *et al*, 2008).

C'est dans la région BART, qu'ont été découverts les premiers micros ARN (ou miR-BART) de l'EBV (PFEFFER *et al*, 2004 ; MARQUITZ et RAAB-TRAUBA, 2012). Plusieurs miR-BART divisés en trois groupes (cluster 1, cluster 2 et le mi-BART2) ont été identifiés, ils sont transcrits pendant la phase latente de l'infection (EDWARDS *et al*, 2008 ; HE *et al*, 2012).

Le rôle des miARN est encore mal connu mais des études suggèrent un rôle dans la pathogenèse associée à l'EBV et un rôle de régulateur dans l'expression des protéines de latence. En effet, certains miARN du cluster 1 interagissent avec LMP-1 pour réguler négativement son expression, permettant de diminuer sa présentation par le CMH I et ainsi de contrôler la réponse immunitaire anti-LMP-1 (LO *et al*, 2007 ; HE *et al*, 2012). Le miR-BART5

(cluster 1) inhibe l'expression de la protéine pro-apoptotique induite par p53, la protéine PUMA (p53 Up-regulated Modulator of Apoptosis), favorisant ainsi la survie cellulaire (BARTH *et al*, 2008 ; CHOY *et al*, 2008). De même, le miR-BART22 (cluster 2), fortement exprimé dans des cas de carcinome du rhinopharynx, régule l'expression de la protéine LMP-2A permettant l'échappement au système immunitaire des cellules infectées par l'EBV (LUNG *et al*, 2009).

1.2.4.3. Protéines de latence membranaires (LMP, Latent Membrane Proteins)

1.2.4.3.1. LMP-1

La protéine LMP-1 est codée par le gène *BNLF1* qui est transcrit dans le sens L (de U5 à U1) de façon très abondante dans les cellules infectées (50 à 60 copies par cellule dans la latence de type III). LMP1 est une protéine transmembranaire ayant une demi-vie courte (environ 3h). Elle comprend 3 domaines : un domaine N terminal (Nt) cytoplasmique de 24 acides aminés (aa), un domaine transmembranaire de 162 aa composé de 6 hélices alpha et un domaine C terminal (Ct) cytoplasmique de 200 aa (figure 11). Les domaines Nt et transmembranaire sont responsables de l'ancrage de LMP1 à la membrane. Le domaine Ct cytoplasmique est, quant à lui, impliqué dans l'activation des voies de signalisation cellulaire induites par LMP1 (LO *et al*, 2007 ; DAWSON *et al*, 2012).

LMP1 est considéré comme l'oncogène majeur d'EBV. Grâce à sa signalisation, LMP1 présente des propriétés immortalisantes et transformantes, et est responsable de nombreux changements phénotypiques dans les cellules infectées par l'EBV (AHSAN et KANDA, 2005). LMP1 est fonctionnellement apparentée aux membres de la famille des récepteurs au Tumor Necrosis Factor (TNF). *In vivo*, LMP1 peut se substituer au CD40 en induisant l'expression d'un grand nombre de gènes cellulaires impliqués dans les processus d'activation et de prolifération cellulaire des lymphocytes B (LIN et JOHANNSEN, 2002 ; WU *et al*, 2011).

L'expression de LMP1 conduit au détournement et à la dérégulation chronique de voies de signalisation cellulaire et de leurs gènes cibles impliqués notamment dans des processus prolifératifs (EDWARDS *et al*, 2004 ; DAWSON *et al*, 2012). La région de LMP1 responsable de l'induction des voies de signalisation cellulaire est incluse dans la partie Ct cytoplasmique de la protéine. Cette région se subdivise en 2 domaines importants «C terminal Activating Region» CTAR-1 et CTAR-2 qui incluent eux-mêmes les sites «*Transforming Effector Sites*» TES-1 et TES2 ayant des rôles dans la signalisation et la transformation. Ces deux domaines sont responsables de l'activation des voies p38 et JNK/AP1 et de l'activité NF-kB induite par LMP1. Les médiateurs proximaux de ces voies identifiés à ce jour et interagissant directement avec LMP1 ont également été caractérisés au préalable par leur interaction avec les membres de la famille des récepteurs au TNF α (TNF-R) (LO *et al*, 2007 ; WU *et al*, 2011). Il s'agit des protéines TRAF (*TNFR Associated Factors*, interagissant avec TES1) et TRADD (*TNF-R Associated Death Domain*, interagissant avec TES2).

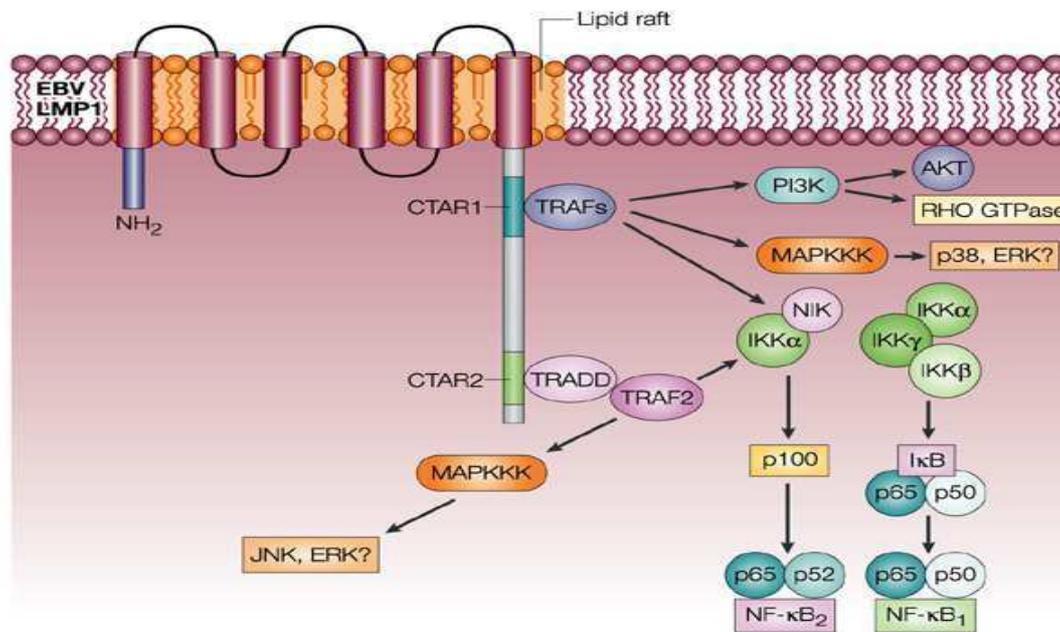


Figure 11 : Structure de la protéine LMP1 (YOUNG et RICKINSON, 2004).

1.2.4.3.2. LMP-2A et LMP-2B

Les protéines LMP-2A et LMP-2B sont codées par le même gène mais présentent un épissage alternatif. La transcription ne peut se faire que lorsque le génome est sous forme circulaire car elle est initiée au niveau des régions répétées terminales. LMP-2A et -2B possèdent 12 domaines transmembranaires, suivis d'un domaine carboxy-terminal transmembranaire hydrophile (figure 12). La partie amino-terminale de LMP-2A permet la signalisation. Cette partie est déléetée pour LMP-2B (LUNG *et al*, 2009 ; DAWSON *et al*, 2012).

Une des propriétés principales de LMP-2A est de moduler le signal induit par le BCR. Elle mime la signalisation du BCR et agit également comme un dominant négatif, bloquant l'activation du BCR. La protéine LMP-2A possède un motif ITAM (Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif) lui permettant d'interagir avec les tyrosines kinases Lyn et Syk nécessaires à la signalisation du BCR. La protéine LMP2A recrute également les ligases (E3) qui vont ubiquitinyler les protéines Lyn et Syk et donc activer leur dégradation par le protéasome induisant le blocage de la signalisation du BCR (LONGNECKER, 2000 ; HAYASHI *et al*, 2012).

De plus, LMP-2A, localisée dans les radeaux lipidiques, bloque la translocation du BCR dans ces micros domaines lipidiques et l'internalisation du complexe BCR/antigène (LUNG *et al*, 2009). Des données sur des souris transgéniques LMP-2A montrent que la protéine LMP-2A ne présente pas de propriétés oncogéniques mais en donnant aux lymphocytes B un signal de survie leur permettant d'échapper à l'apoptose en l'absence de sélection *in vivo* dans les centres germinatifs (MANCAO et HAMMERSCHMIDT, 2007 ; DAWSON *et al*, 2012).

Les transcrits de LMP2A ou LMP2B sont fréquemment détectés dans les lymphomes de Hodgkin, le carcinome du nasopharynx et dans le Lymphome de Burkitt (BELL et GROVES, 2006) suggérant que LMP2A est un facteur clé dans la capacité d'EBV à contribuer aux cancers humains. LMP2A est en effet capable de participer à la transformation des cellules épithéliales notamment grâce à l'activation des voies de signalisation cellulaire PI3K-Akt et β -caténine (MORRISON et RAAB-TRAUB, 2005), mais également à leur pouvoir métastatique (PEGTEL et SUBRAMANIAN, 2005). Cette donnée a été confirmée par les travaux de LONGNECKER en 2007, dans des lignées de cellules épithéliales et de cellules de carcinome gastrique (FUKUDA et LONGNECKER, 2007 ; HAYASHI *et al.*, 2012). Idée également supportée par des travaux rapportant l'effet protecteur de LMP2A sur l'apoptose induite par une translocation *c-myc* dans un modèle de Lymphome de Burkitt, ainsi que sa participation à la prolifération cellulaire et à l'accélération de la mise en place du lymphome (BULTEMA et LONGNECKER, 2009). Ceci suggère que LMP2A peut avoir un rôle clé non seulement dans le maintien de la latence, mais également en tant qu'activateur de la carcinogénèse EBV-dépendante (PANG et LIN, 2009).

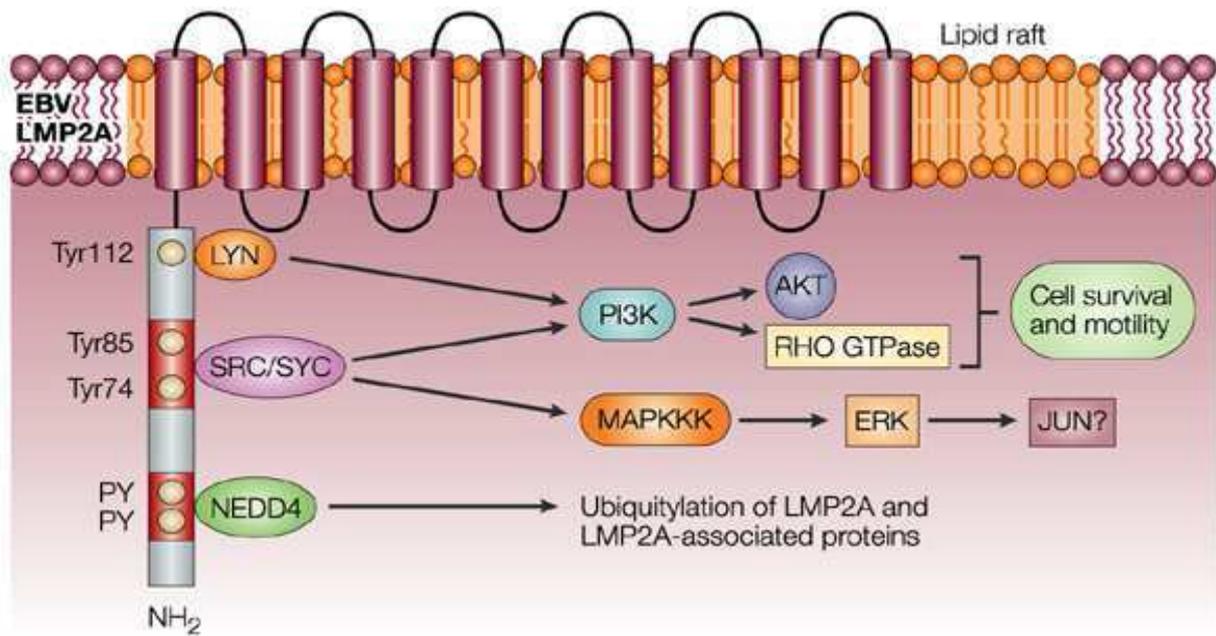


Figure 12 : Structure de la protéine LMP2A (YOUNG et RICKINSON, 2004).

1.2.5. Différents types de latence

Le profil d'expression des gènes de latence n'est pas identique dans tous les contextes cellulaires d'infection par EBV. On distingue ainsi 4 types de latence (0, I, II et III) en fonction des différents gènes qui y sont exprimés. Il faut noter que les ARN EBER1 et 2 s'expriment dans chacune des latences. Quant aux ARN BART, ils sont exprimés au moins en partie lors des latences I, II et III mais, aucune donnée n'existe sur leur statut durant la latence 0 (LUNG *et al.*, 2009).

La latence de type I est celle que l'on trouve dans le lymphome de Burkitt. Elle se caractérise par la seule présence de la protéine EBNA1 et un phénotype cellulaire particulier. En effet, ces cellules expriment à leur surface les marqueurs CD10 et CD77, et peu ou pas d'antigènes d'activation cellulaire et de molécules d'adhésion (BULTEMA et LONGNECKER, 2009) (tableau IV).

Celle de type II (appelée aussi programme par défaut) est caractéristique du carcinome du nasopharynx (CNP), de la maladie de Hodgkin et de certains lymphomes T/NK et se caractérise par l'expression des protéines EBNA1, LMP1, LMP2A et LMP2B (LUNG *et al*, 2009).

La latence de type III (appelée aussi programme de croissance) se retrouve dans les LCL transformées *in vitro* par EBV et dans les lymphoproliférations des sujets immunodéprimés. Elle s'accompagne de l'expression des 9 protéines de latence EBNA1, EBNA2, EBNA3A, EBNA3B, EBNA3C, EBNA-LP, LMP1, LMP2A et LMP2B (LUNG *et al*, 2009).

Ces trois types de latence sont typiquement retrouvés dans certaines pathologies malignes associées à EBV. Cependant, en dehors de toute pathologie tumorale, ces trois programmes de latence semblent être caractéristiques des différentes étapes franchies par le virus lors d'une infection asymptomatique. Ainsi, chez les personnes infectées de façon persistante et asymptomatique, le réservoir viral majeur est une partie des lymphocytes B mémoires de l'hôte, où l'EBV se maintient en latence de type 0 (appelée aussi programme latent). Durant cette latence, les EBER sont transcrits mais aucune protéine virale n'est exprimée (MANCAO et HAMMERSCHMIDT, 2007).

D'autres programmes de latence « non conventionnels » ont été décrits dans des lymphomes de Burkitt endémiques associés à l'EBV. Dans 20 % des cas, les cellules tumorales présenteraient des latences atypiques, soit avec l'expression des protéines nucléaires EBNA-1, -3A, -3B, -3C et une forme tronquée de EBNA-LP sans expression d'EBNA-2 (délétion du gène) ni des LMP (latence Wp restreinte), soit sans expression des LMP uniquement (latence EBNA2⁺/LMP⁻) (KELLY *et al*, 2002 ; KELLY *et al*, 2006). Cette dernière latence est à rapprocher des latences atypiques décrites dans les cellules B du centre germinatif chez les patients atteints de MNI. Des travaux montrent que les cas de lymphomes de Burkitt avec une « latence Wp restreinte » expriment un homologue viral de la protéine Bcl-2, BHRF1 qui participe à la survie des cellules tumorales (WATANABE *et al*, 2010).

Tableau IV : Profil d'expression des protéines virales selon le type de latence (LUNG *et al*, 2009).

	Latence de type 0	Latence de Type I	Latence de type II	Latence de Type III
EBNA1	-	+	+	+
EBNA2	-	-	-	+
EBNA3A,B,C	-	-	-	+
EBNALP	-	-	-	+
LMP1	-	-	+	+
LMP2A,B	-	-	+	+
EBER	+	+	+	+
BART	?	+	+	+
<u>Exemples</u>	Lymphocytes B mémoires	Lymphome de Burkitt	Lymphome de Hodgkin, Carcinome du nasopharynx	lignées cellulaires lymphoblastoïdes, Lymphomes associés au VIH, lymphoproliférations post-transplantation

1.2.6. Phase de réplication

1.2.6.1. Cycle lytique

La réactivation lytique intervient occasionnellement dans les lymphocytes B mémoires infectés par l'EBV. La réactivation virale spontanée peut survenir dans 2 à 5% des cellules infectées. Elle est étudiée *in vitro* dans les lignées cellulaires immortalisées par l'EBV (HADINOTO *et al*, 2008). Le passage de la phase de latence à la phase lytique peut-être influencé par l'environnement dans lequel se trouve la cellule qui devient alors permissive à la réplication virale. Le cycle lytique peut être induit par stimulation du BCR. Le cycle lytique permet, au final, l'amplification du génome viral d'un facteur 100 à 1000, aboutissant ainsi au maintien et à la diffusion de l'EBV (PETOSA *et al*, 2006 ; OLIVEIRA *et al*, 2010).

L'expression des gènes aboutissant à l'amplification du génome viral se déroule de manière ordonnée. Après induction du programme lytique, les deux gènes lytiques très précoces *BZLF1* et *BRLF1* sont exprimés. Ces gènes codent deux transactivateurs, la protéine Zta (ou ZEBRA : Z Epstein-Barr Replication Activator) et la protéine Rta, respectivement. Elles ont pour rôles d'activer certains promoteurs viraux et cellulaires conduisant à une cascade d'expression ordonnée de gènes viraux. On observe donc l'activation de l'expression des gènes précoces impliqués dans la réplication de l'ADN et dans le métabolisme, suivie par l'expression des gènes tardifs codants des protéines virales structurales pour la formation des virions (TSURUMI *et al*, 2005 ; OLIVEIRA *et al*, 2010).

1.2.6.2. Protéines du cycle lytique

1.2.6.2.1. Protéines très précoces (IEA, Immediate Early Antigen)

Les gènes BZLF1 et BRLF1 codent pour les protéines ZEBRA (*Bam*HI fragment Z Epstein-Barr Replication Activator, autrement appelé Z, Zta ou EB1) et Rta (ou R). Ce sont des facteurs de transcription déclenchant toute la cascade d'expression des gènes du cycle lytique en transactivant les promoteurs des gènes précoces ainsi que leurs propres promoteurs (CHEN *et al.*, 2009 ; IMAI *et al.*, 2012).

1.2.6.2.2. Protéines précoces (EA, Early Antigen)

Elles sont impliquées dans la réplication de l'ADN viral et dans la régulation de l'expression des protéines tardives. Nous distinguons l'ADN polymérase BALF5, la protéine de liaison à l'ADN BALF2, le complexe hélicaseprimase BBLF4-BSLF1, le facteur de processivité BMRF1 ou encore l'exonucléase alcaline BGLF5 (FORTE et LUFTIG, 2011).

1.2.6.2.3. Protéines tardives

Les protéines tardives sont exprimées après la réplication du génome, ce sont des protéines de structure impliquées dans la formation de la particule virale. Elles comprennent des antigènes de capsid tels que VCA, (Viral Capsid Antigen, BcLF1) et des antigènes de membrane comme les glycoprotéines gp110 (BALF4), gp 350/220 (BLLF1) ou gp42 (BDLF3). On trouve également la protéase (BVRF2) nécessaire à l'assemblage et à la maturation des particules virales (ROTHER *et al.*, 2010).

1.3. Carcinome gastrique et le virus d'Epstein- Barr

1.3.1. Caractéristiques oncologiques de l'EBV

Pour être oncogénique, un virus doit maintenir son génome dans la cellule sans la tuer et en la protégeant des attaques du système immunitaire. Très tôt, le rôle oncogène du virus d'Epstein-Barr fut soupçonné suite à la capacité du virus à immortaliser *in vitro* des cellules B humaines formant ainsi des lignées de cellules lymphoblastoïdes. Ces cellules comportaient le génome viral à l'état latent, sous la forme d'épisome et exprimaient différentes protéines virales. Ainsi, un virus pouvant induire une telle immortalisation *in vitro* pouvait avoir un rôle dans la lymphomagenèse *in vivo* (THOMPSON et KURZROCK, 2004).

Les cellules-hôtes forment le réservoir du virus ; par intermittence, elles peuvent entrer dans un cycle lytique permettant ainsi la réplication du virus et la libération d'un grand nombre de virions qui vont infecter d'autres cellules, il y a alors un nombre important de cellules en latence dans le sang périphérique et dans différents tissus. Une affection maligne pourrait se développer plusieurs années après la primo-infection à la condition de mutations oncogéniques accompagnées d'une diminution du système immunitaire de l'hôte, de la présence d'un second agent infectieux ou de l'existence d'autres aberrations ou mutations génétiques (BELL et RICKINSON, 2003). Plusieurs pathologies ont été associées à l'EBV dont le lymphome de Burkitt (KLAPPROTH *et al*, 2009), le lymphome de Hodgkin (JUNKER, 2005) et aussi le cancer du nasopharynx (THORLEY-LAWSON, 2005).

1.3.2. Carcinomes gastriques associés à l'EBV

1.3.2.1. Définition

Des adénocarcinomes gastriques sont associés à une infection par le virus d'Epstein-Barr et cela depuis 1990. L'association a d'abord été décrite dans une forme rare de tumeur gastrique, identique aux carcinomes EBV positifs observés dans d'autres organes dont le nasopharynx, et connus sous le nom de carcinomes indifférenciés à stroma lymphoïde (UOZAKI et FUKAYAMA, 2008). Il a ensuite été montré que tous les types histologiques classiques d'adénocarcinomes gastriques pouvaient être associés à l'infection EBV (AKIBA *et al*, 2008).

Le cancer gastrique EBV associé est défini par la présence de l'EBV dans les cellules néoplasiques. L'hybridation *in situ* EBER1 (ISH) est utilisé pour identifier le cancer gastrique EBV associé, parce qu'EBER1 est très abondante (10 millions de copies par cellule infectée). (LEE *et al*, 2009).

Le cancer gastrique associé à l'EBV présente une latence de type I qui exprime EBNA1, EBER, BART, et parfois (40% des cas) la protéine LMP2A. Des anomalies préexistantes peuvent être présentes dans les cellules épithéliales gastriques (MAEDA *et al*, 2009). Ainsi, en plus des gènes viraux, des méthylations de l'ADN de la cellule hôte ont été fréquemment observées dans le carcinome gastrique EBV positif (FUKAYAMA, 2010).

1.3.2.2. Epidémiologie du carcinome gastrique EBV positif

Contrairement au lymphome de Burkitt et au carcinome du nasopharynx, qui sont endémiques en Afrique équatoriale et en Asie du Sud-Est, le carcinome gastrique EBV positif est une maladie non endémique distribuée à travers le monde (NISHIKAWA *et al*, 2010). Cependant, il existe certaines différences dans son incidence selon les zones géographiques : elle est élevée dans certains pays occidentaux, comme l'Allemagne et les États-Unis, où elle peut atteindre 16 à 18 %, alors qu'elle est plus faible, de l'ordre de 6 à 10 %, dans la plupart des pays européens, en Amérique du Sud et en Asie, avec les taux les plus faibles en Chine 4,3%. Sur la base de l'incidence annuelle du cancer gastrique, le nombre de patients qui développent ce type de cancer est estimé entre 70 000 et 80 000 par an (LEE *et al*, 2009).

La plupart des études ont montré la prédominance masculine dans ce type de cancer, ce qui suggère que les risques dus au style de vie ou les facteurs professionnels peuvent exister chez les hommes (MURPHY *et al*, 2009). Une étude au Japon a montré que la consommation d'aliments salés et l'exposition à la poussière de bois et/ou à limaille de fer, qui peuvent induire des lésions mécaniques de la muqueuse gastrique, sont liées à un risque plus élevé de développer un cancer gastrique associé à l'EBV (CAMARGO *et al*, 2011).

1.3.3. Caractéristiques cliniques du carcinome gastrique EBV positif

Les caractéristiques cliniques du cancer gastrique EBV positif comprennent l'emplacement prépondérant dans l'estomac proximal et qui présente une histologie de type diffus (MURPHY *et al*, 2009). Certains rapports suggèrent que le cancer survient chez les patients relativement jeunes, mais les analyses n'ont pas confirmé cette observation (AKIBA *et al*, 2008 ; LEE *et al*, 2009). Le cancer gastrique EBV positif prend souvent la forme d'une tumeur ulcérée ou en forme de soucoupe accompagnée par un épaissement marqué de la paroi gastrique. Ces caractéristiques sont bien perceptibles sur échocoscopie et tomographies de l'estomac. Le cancer gastrique EBV positif montre un faible taux d'atteinte des ganglions lymphatiques à l'intérieur de la sous muqueuse, en particulier au cours de ses débuts, et a un pronostic relativement favorable par rapport au cancer gastrique EBV négatif (AKIBA *et al*, 2008 ; FUKAYAMA, 2010).

Différents résultats sont en faveur d'un rôle étiologique de l'EBV. En effet, l'infection virale est clonale et elle est observée dans toutes les cellules tumorales des carcinomes gastriques et dans l'épithélium gastrique des atrophies intestinales chroniques (FUKAYAMA, 2010). Ces résultats suggèrent que le virus infecte précocement ces cellules épithéliales. De plus, de forts titres d'anticorps anti-EBV sont détectés chez les patients. Par ailleurs, l'infection par l'EBV de lignées épithéliales primaires gastriques permet une meilleure prolifération et génère une croissance en agar, suggérant un rôle du virus dans la carcinogenèse (CORVALAN *et al*, 2006 ; KIM *et al*, 2010).

1.3.4. Histogénèse du cancer gastrique EBV positif

Des études visant à clarifier l'histogénèse du cancer gastrique EBV positif sont concentrées dans deux directions (figure 13). L'une caractérise le lignage des cellules du

carcinome et les traces des séquences morphologiques de l'infection EBV dans les cellules épithéliales gastriques, tandis que l'autre se concentre sur la progression du cancer. Ces études ont identifié plusieurs molécules, en particulier des molécules d'immuno-modulation, qui sont associées au recrutement des lymphocytes dans le stroma du cancer gastrique EBV positif (FUKAYAMA, 2010).

L'expression de plusieurs molécules qui caractérisent la différenciation cellulaire de l'épithélium gastro-intestinal peut divulguer la lignée cellulaire des cellules infectées par EBV. Les profils d'expression des protéines claudines (CLDN) qui constituent les jonctions serrées ont donc été étudiés. Les cellules néoplasiques du cancer gastrique EBV positif ont montré une haute fréquence d'expression de CLDN18 (84%) et une faible fréquence d'expression de CLDN3 (5%) (SHINOZAKI *et al*, 2009). Ce profil d'expression (CLDN18 +, 3 -) correspond à celui de l'épithélium gastrique normal chez l'adulte et le fœtus, mais pas à celui de la métaplasie intestinale (CLDN18-, 3 +). Conformément aux modes d'expression CLDN, près de la moitié des cas de cancer gastrique associés à l'EBV ont également présenté une expression des mucines conforme au type gastrique (MUC5AC, MUC6) (BARUA *et al*, 2006). Le cancer gastrique EBV positif est beaucoup plus homogène en ce qui concerne la différenciation cellulaire, ce qui indique qu'il conserve bien la nature des cellules d'origine.

Il n'a pas été précisé comment l'infection par EBV est établie dans la muqueuse de l'estomac. Le récepteur viral CD21 des lymphocytes B n'est pas exprimé sur les cellules épithéliales (YOSHIYAMA *et al*, 1997 ; CHESNOKOVA *et al*, 2009). Puisque la co-culture de la production virale des lymphocytes montre une plus grande efficacité de l'infection (jusqu'à 800 fois) que l'infection des cellules épithéliales, le contact direct de cellule à cellule est donc le mode le plus probable de la propagation du virus aux cellules épithéliales *in vivo* (IMAI *et al*, 1998 ; SHANNON-LOWE *et al*, 2011). Les cellules épithéliales infectées par EBV sont susceptibles d'initier la croissance clonale pour développer le cancer gastrique associée à l'EBV (FUKAYAMA *et al*, 1994 ; CAMARGO *et al*, 2011). La gastrite atrophique pourrait induire l'infiltration des lymphocytes porteurs d'EBV pour augmenter les chances de contact avec les cellules épithéliales, ou l'inflammation peut produire un milieu riche en cytokine pour soutenir la croissance clonale des cellules épithéliales infectées par EBV (HAYASHI *et al*, 1996 ; KANEDA *et al*, 2012).

L'infection maligne est conditionnée par la méthylation des îlots CpG (CpG island methylator phenotype : CIMP) qui est l'anomalie génétique et épigénétique la plus retrouvée dans le cancer gastrique EBV positif. Les îlots CpG sont souvent situés au niveau des promoteurs ou l'exon 5' des séquences des gènes codants, et leur méthylation conduit à la répression de la transcription, inactivant la fonction des gènes en aval. La méthylation des îlots CpG, en particulier celle des gènes suppresseurs de tumeurs, est désormais considérée comme une anomalie épigénétique dans le cancer gastrique EBV associé (FUKAYAMA, 2010). Le terme CIMP a été principalement utilisé pour décrire le carcinome du colon présentant une activité très élevée de la méthylation des îlots CpG (figure 13). Le cancer gastrique a été subdivisé en trois groupes : aucune CIMP, CIMP intermédiaire et CIMP élevée en fonction du nombre de loci méthylé, 0, 1-3, et 4 respectivement et les cancers gastriques EBV positifs présentent un CIMP élevé.

Le stade invasif du cancer gastrique EBV positif est caractérisé par l'infiltration des lymphocytes. Ces lymphocytes contiennent la prolifération des lymphocytes T cytotoxiques (SAIKI *et al*, 1996 ; VAN BEEK *et al*, 2006), qui peuvent réagir avec des protéines latentes d'EBV (KUZUSHIMA *et al*, 1999 ; FUKAYAMA et USHIKU, 2011), mais il est également vrai que l'EBV utilise plusieurs mécanismes afin de survivre aux attaques de ces cellules T (figure 13). A partir d'analyse d'un réseau d'oligo-nucléotides, une régulation à la hausse du gène codant pour l'IL1 β a été mise en évidence (CHONG *et al*, 2002 ; IIZASA *et al*, 2012). L'IL1 β a la capacité d'inhiber la sécrétion d'acide de l'estomac (EL-OMAR *et al*, 2000) et de promouvoir la croissance des lignées cellulaires du cancer gastrique. En outre, IL1 β joue un rôle dans le recrutement d'un grand nombre de lymphocytes T inefficaces, qui peuvent contrer les lymphocytes T cytotoxiques spécifiques contre des cellules épithéliales infectée par EBV.

Les lymphocytes B infectés par EBV

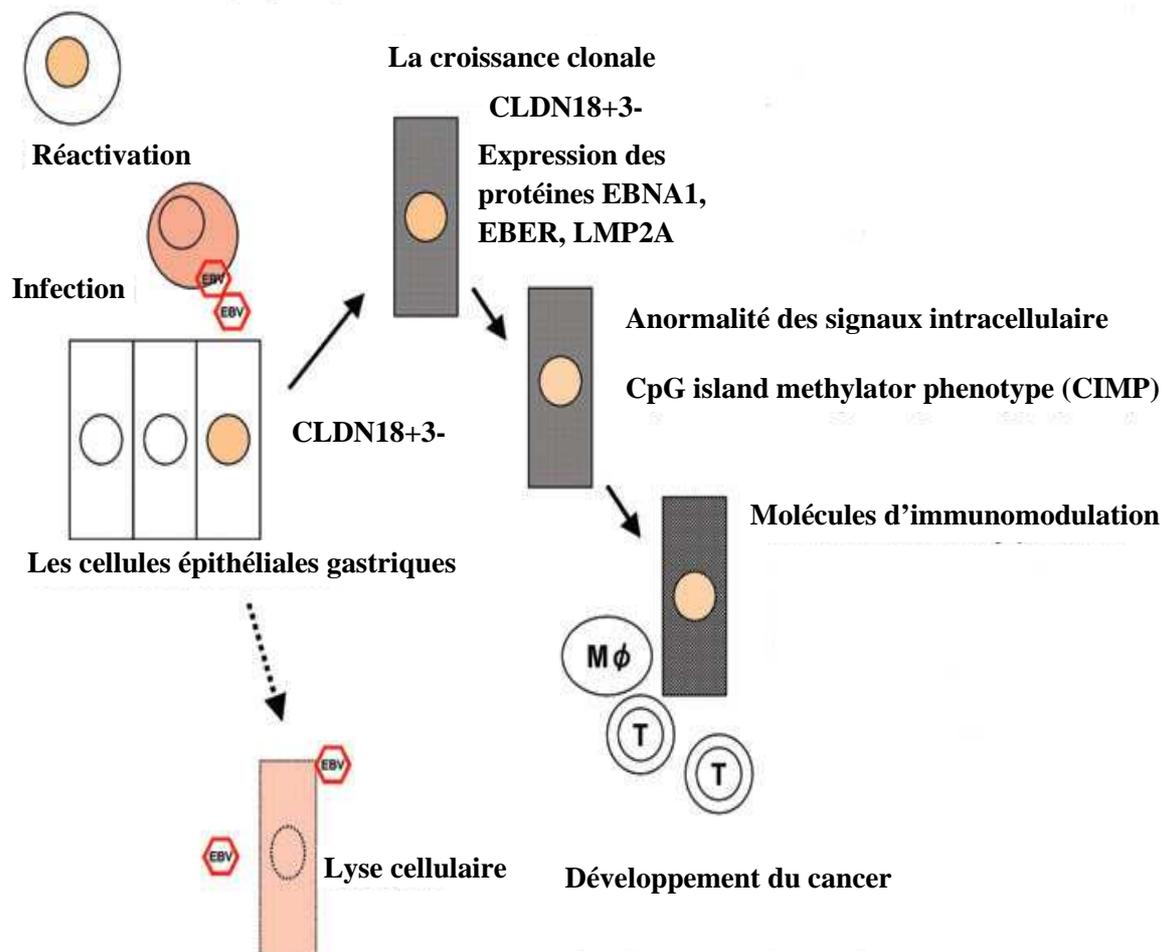


Figure 13: Représentation schématique du développement et de la progression du carcinome gastrique EBV associé (FUKAYAMA, 2010).



Matériel et méthodes

2. Matériel et méthodes

2.1. Matériel

2.1.1. Matériel biologique

Nous avons collecté 20 échantillons de sérums de patients atteints de cancer gastrique au niveau du CHU de Tizi-Ouzou, ainsi que 21 échantillons de sérums de sujets sains auprès du laboratoire central de biochimie. Toujours au niveau du même CHU, nous avons également recueilli 15 biopsies de cancer gastrique. Les échantillons de sérums de sujets atteints de cancer gastrique sont notés : S2, S3, S4, S5, S6', S7, S8, S10, S12, S13, S14, S16, S18, S19, T14, T15, T16, T17, T18 et T19. Ceux des sujets sains sont notés de 1 à 21. Les biopsies gastriques sont notées : T9, T10, T11, T12, T13, T14, T15, T16, T17, T18, T19, T20, T21, T22 et T28.

Nous avons aussi utilisé un sérum issu de cordon ombilical récupéré lors d'un accouchement à la clinique El Farabi d'Annaba, ainsi qu'un extrait protéique de cellules d'une lignée P3HR1 exprimant LMP1.

2.1.2. Appareillage

- Générateur de courant continu (Sebia) ;
- Densitomètre (Helena junior EC 24) ;
- Etuve à 37°C- 40°C ;
- Automate (Beckman coulter CX9) ;
- Chambre de migration ;
- Cuve d'électrophorèse (Hofer minive vertical electrophoresis system) ;
- Générateur électrique (Consort EV 243) ;
- Centrifugeuse de paillasse (Costar mini centrifuge) ;
- Agitateurs variés (basculant, magnétique, agitateur de tubes...) ;
- Plaque chauffante (Bioblock scientific) ;
- pH mètre (Metrohm 620) ;
- Balance de précision à 0,01 mg (SARTORIUS SE 402 E) ;
- Balance électronique de précision à 0,01g (Denver Instrument) ;
- Distillateur d'eau (PURE-HIT STILL.BHANU) ;
- Sonicateur (Advantage – Lab AL) ;
- Centrifugeuse (Sigma 4- 16 K) ;
- Lecteur ELISA (BioTek).

2.1.3. Produits chimiques et réactifs

- Solvants : acide acétique, acide chlorhydrique, acide trichloracétique, glycérol, hydroxyde de sodium, méthanol, acide périodique ... ;
- Sels et tampons : azide de sodium, chlorure de sodium, TRIS... ;

- Colorants et réactifs spécifiques : acrylamide, bleu de bromophénol, bleu de Coomassie R250, rouge ponceau, dodécyl sulfate de sodium (SDS), glycine, 2-mercaptoéthanol, N, N'méthylène-bis- acrylamide, persulfate d'ammonium, TEMED....etc.

2.2. Méthodes

2.2.1. Électrophorèse des protéines sériques sur acétate de cellulose

Nous nous sommes basés sur le mode d'emploi utilisé au laboratoire centrale de Biochimie du CHU de Tizi-Ouzou où ont été réalisées les électrophorèses des protéines sériques de notre étude. La réalisation totale de la procédure prend environ 2 heures. L'analyse s'est effectuée sur 20 échantillons de sérum de sujets atteints de cancer gastrique.

Afin d'accompagner les résultats de l'électrophorèse, nous avons déterminé la teneur en protéines totales de chaque prélèvement. Cela nous permettra d'exprimer chaque fraction en gramme par litre (g/l). Nous avons dosé les protéines totales par la méthode automatique (Beckman coulter CX9) adoptant le principe de la méthode de Biuret. Cette méthode permet d'obtenir un dosage rapide des protéines. En milieu alcalin, les ions de cuivre (Cu^{++}) réagissent avec les liaisons peptidiques des protéines et forment un complexe pourpre caractéristique, avec une coloration violette photométrique. L'intensité de coloration du complexe Cu-protéine est proportionnelle à la concentration en protéine.

2.2.1.1. Précautions à prendre lors d'une électrophorèse des protéines sériques sur acétate de cellulose

L'électrophorèse des protéines sériques doit être réalisée selon un protocole strict afin d'obtenir des tracés interprétables et similaires. Il existe de nombreux facteurs qui peuvent conduire à des erreurs d'interprétation du protéinogramme. Ainsi une mauvaise technique de prélèvement ou une mauvaise conservation de l'échantillon sanguin destiné à l'électrophorèse des protéines peut conduire à une hémolyse de l'échantillon. L'hémolyse permet la libération de l'hémoglobine dans le sérum. Des études ont révélé que l'hémoglobine migre avec les bêta globulines. De plus il y'a formation de complexes haptoglobine – hémoglobine qui vont migrer avec les alpha 2 globulines.

La réalisation de l'électrophorèse sur du plasma au lieu du sérum implique l'apparition d'une sixième bande qui va migrer entre les fractions bêta et gamma globulines.

L'utilisation d'un sérum lipémique conduit à l'apparition d'un pic au niveau de la fraction des alpha 2 globulines produit par la présence de lipides dans le sérum. Ceci peut entraîner des erreurs d'interprétation du protéinogramme puisque lors d'états inflammatoires, la présence d'un pic en alpha 2 globuline à été retrouvée.

Afin d'éviter ces différents artefacts qui peuvent fausser l'interprétation du protéinogramme, nous avons pris soin lors de cette étude de travailler uniquement sur sérum, et d'écarter tous les sérums hémolysés ou lipémiques, afin d'obtenir des tracés similaires et interprétables.

2.2.1.2. Dépôt

Avant de procéder au dépôt proprement dit, les plaques d'acétate de cellulose sont préalablement immergées dans une solution tampon durant 20 minutes. Les plaques sont ensuite pressées légèrement entre deux papiers buvards afin d'éliminer l'excès de liquide. 10 µl de sérum sont alors déposés sur la ligne de départ de cette plaque d'acétate de cellulose à l'aide d'un applicateur, chaque plaque peut contenir jusqu'à huit échantillons de sérum.

2.2.1.3. Migration électrophorétique

La cuve d'électrophorèse comporte deux compartiments contenant la solution tampon à pH 8,6 et une électrode. Ces deux compartiments sont mis en relation par deux papiers contacts conducteurs imbibés de tampon et formant des ponts. Anode et cathode sont reliées à un générateur de courant continu. La plaque d'acétate de cellulose comportant les échantillons sériques est alors disposée dans la cuve d'électrophorèse, l'acétate de cellulose vers le bas. Le couvercle de la cuve est alors refermé et la cuve est mise sous tension de 180 volts durant 16 minutes.

2.2.1.4. Coloration et décoloration

Immédiatement après la migration et sans séchage préalable, la plaque est révélée dans un bain colorant de rouge ponceau à 0,5% où elle est complètement immergée durant 6 minutes. La plaque est ensuite décolorée dans trois bains successifs d'acide acétique à 5 %, de 2 minutes chacun. À ce stade, la plaque présente des bandes de migration de couleur rose sur un fond blanc correspondant aux différentes fractions protéiques.

2.2.1.5. Eclaircissement

La plaque est transférée dans un bain de méthanol pur où on la laisse tremper durant 4 minutes. La plaque est ensuite égouttée 10 à 15 secondes, puis transférée dans une solution éclaircissante, composée d'acide acétique glacial à 29 %, de méthanol absolu à 67 % et de réactif d'éclaircissement à 4 %, où elle y reste immergée pendant 10 minutes. Elle est ensuite égouttée, puis, pour que l'éclaircissement soit complet, la plaque est séchée dans une étuve chauffée à 37-40°C durant une dizaine de minutes.

2.2.1.6. Lecture par densitomètre

A la fin de toutes ces étapes, le résultat est visible sur la plaque d'acétate de cellulose. Chaque piste d'électrophorèse implique une alternance de zones colorées et de zones claires transparentes. La plaque d'acétate de cellulose peut alors être lue par un densitomètre utilisant une longueur d'onde de 525 nm. Plus la concentration en protéines est forte dans une zone, plus la coloration est forte.

Nous avons donc évalué les concentrations des différentes catégories de protéines par mesure optique de la densité de coloration sur la bande. L'intégration des bandes colorées est faite au densitomètre, ce qui permet de la traduire sous forme de courbe (profil

électrophorétique) qui pourra être ensuite analysée et interprétée. Il faut noter que chaque bande correspond à un pic dont la hauteur est proportionnelle à l'intensité de la coloration.

2.2.2. PAGE SDS des protéines sériques en présence de β mercaptoéthanol

2.2.2.1. Conditions générales de la conduite de l'électrophorèse

Nous avons utilisé la méthode de LAEMMLI (1970) qui consiste à utiliser un système bi-phasique constitué de deux gels superposés de concentration et de pH différents : un gel de concentration à 4%, en tampon tris-HCl 0,5M pH 6,8 et un gel de séparation en tampon tris-HCl 1,5M pH 8,8. Afin de mieux séparer les protéines avec les MM de 50 à 10 kDa, nous avons mené nos analyses sur un gel de séparation de 17%. La polymérisation de ce dernier est déclenchée par le persulfate d'ammonium et le TEMED.

Le gel est immédiatement coulé entre deux plaques, l'une en verre et l'autre en alumine. Ces plaques sont plongées dans un tampon d'électrode approprié. Un peigne y est alors introduit pour assurer la formation des puits. Après polymérisation, le peigne est retiré et les puits sont prêts à recevoir le dépôt des échantillons.

2.2.2.2. Préparation des échantillons

Les échantillons répartis dans des eppendorfs sont d'abord dilués à 1/2 avec une solution RIPA (Radio Immuno Precipitation Assay). Ainsi, en fonction du taux de protéines sériques de chaque échantillon, et afin de réaliser des dépôts de 70 à 100 μ g de protéines par puits, nous avons pipeté la quantité nécessaire de sérum, additionné de 5 μ l de solution de dénaturation à 4X, contenant du SDS, du β mercaptoéthanol et du bleu de bromophénol (ajouté pour visualiser le niveau de migration des protéines), l'ensemble est ensuite ramené à 20 μ l avec du RIPA.

2.2.2.3. Dépôt des échantillons dans le gel et mise sous tension

Les échantillons sont déposés dans les puits par alternance entre les sérums des sujets sains et des sujets atteints de cancer gastrique. Un marqueur de taille Page RulerTM Plus Prestained Ladder (Fermentas LIFE SCIENCE) est utilisé. Ce kit comprend 9 protéines pré-colorées avec les MM suivantes : 250, 130, 95, 72, 55, 36, 28, 17 et 10 kDa.

La migration des protéines est réalisée à température ambiante sous une tension continue de 200 V et un courant de 20 mA pendant deux heures et demi.

2.2.2.4. Révélation des bandes électrophorétiques

A la fin de l'électrophorèse, on retire les gels, les protéines sont premièrement fixées dans une solution de TCA 12% (p/v) pendant 45 minutes, puis colorées pendant une heure par le bleu de Coomassie R250 à raison de 0,2% (P/V). Pour révéler les bandes électrophorétiques, on procède à la décoloration du gel par immersion de ce dernier dans un mélange d'eau, de méthanol et d'acide acétique dans les proportions 3,12/1,5/0,37 (v/v/v).

2.2.3. Détermination des poids moléculaires des protéines

L'existence d'une relation linéaire dans la zone de fractionnement entre le Log (PM) et la distance de migration permet la détermination des poids moléculaires des protéines.

Pour cela, nous avons fait migrer, dans les mêmes conditions, des protéines de PM connus, à savoir, celles d'un kit comprenant 9 protéines pré-colorées avec les MM suivantes : 250, 130, 95, 72, 55, 36, 28, 17 et 10 kDa. Une courbe de calibration du gel de séparation, établie en utilisant ces protéines, a été tracée (figure 14). Les PM des différentes entités protéiques sont déterminés graphiquement sur cette courbe $\text{Log (PM)}=f(\text{distance})$.

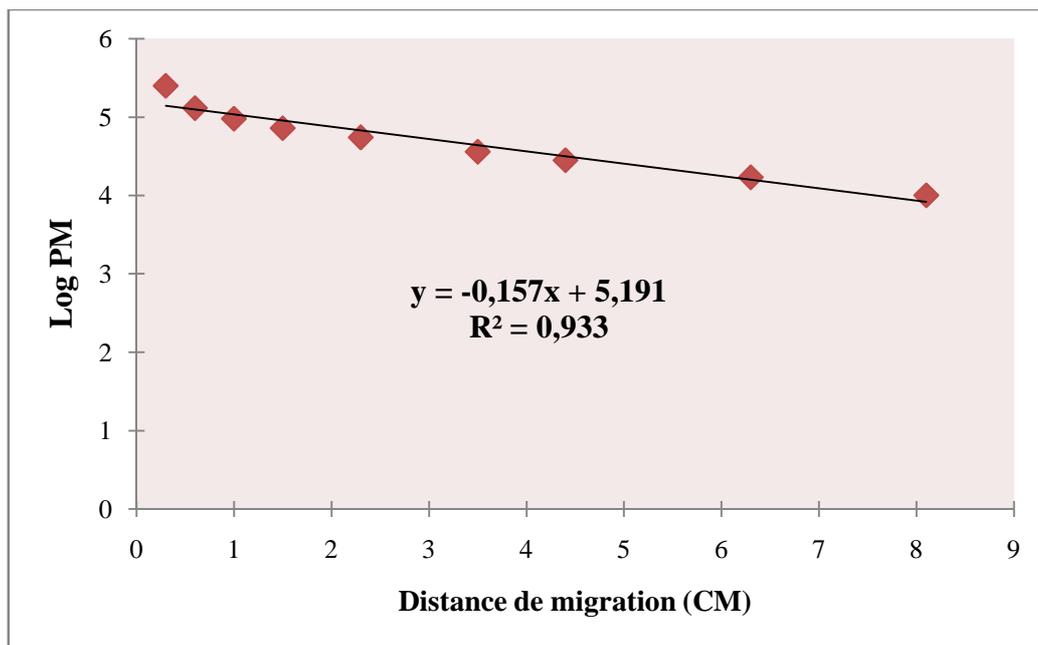


Figure 14 : Courbe de calibration du gel de séparation en PAGE-SDS.

2.2.4. Extraction des protéines tissulaires des tumeurs gastriques

Afin de réaliser la technique ELISA sur les biopsies du cancer gastrique, on procède à l'extraction des protéines tissulaires. A cet effet, on effectue un broyage du tissu pour chaque tumeur gastrique, puis on reprend les culots cellulaires dans 700 μl de RIPA additionnés de 70 μl d'anti-protéases (Trypsin Inhibitor Type I-S From Soybean).

L'échantillon est ensuite soniqué deux fois pendant une minute à une puissance de 20 W d'amplitude dans de la glace. Il est en fin centrifugé à 10000 g à 4°C pendant 15 mn. Le surnageant contenant les protéines est récupéré.

2.2.5. Recherche de la protéine de latence membranaire LMP1 par ELISA

3 µl de sérum ou d'extrait protéique complétés à 50 µl avec du PBS sont incubés toute la nuit à +4°C (coating). La plaque ELISA est ensuite lavée trois fois avec du PBS 1X additionné de tween à 1% puis trois fois avec du PBS 1X.

Après, on procède à la saturation de la plaque avec de la BSA à 2% (dans du PBS) et on incube la plaque pendant une heure à +37°C. On lave ensuite la plaque trois fois avec du PBS 1X tween 1% puis trois fois avec du PBS 1X.

100 µl d'anticorps anti LMP1 S12 monoclonal sont rajoutés dans chaque puits à raison de 0,1 µg/ml et incubés à +37°C pendant deux heures. On lave la plaque trois fois avec du PBS 1X tween 1% puis trois fois avec du PBS 1X.

On rajoute ensuite l'anticorps anti souris couplé à la peroxydase à raison de 0,1 µg/ml et on incube pendant 30 minutes à +37°C. On lave six fois la plaque avec du PBS 1X tween à 1% puis six fois avec du PBS 1X.

On rajoute ensuite 50 µl/puits de tetramethylbenzidine (TMB) et la plaque est placée à l'obscurité pendant 10 minutes à température ambiante. Pour arrêter la réaction, on ajoute 50 µl/ml d'acide phosphorique 0,1M. Et la lecture se fait à 450 nm par un lecteur ELISA.

2.2.6. Tests statistiques

2.2.6.1. Test de conformité d'une moyenne

On utilise ce test lorsqu'on désire comparer une moyenne observée à une moyenne connue dans une population de référence (ANCELLE, 2008). Le test de conformité d'une moyenne le plus courant, relatif à l'hypothèse nulle : $H_0 : m = m_0$, est également basé sur les distributions de STUDENT (DAGNELIE, 2011).

Pour réaliser ce test, on doit calculer la quantité :

$$t_{obs} = \left| \frac{\bar{x} - m_0}{\sigma/\sqrt{n}} \right| \quad \begin{array}{l} \bar{x} = \text{la DO observée pour chaque individu.} \\ m_0 = \text{la DO du témoin négatif.} \end{array}$$

On rejette l'hypothèse nulle quand : $t_{obs} \geq t_{1-\alpha/2}$

$t_{1-\alpha/2}$: valeur critique de STUDENT, tablée avec une probabilité $P = 0,975$ ou bien $\alpha = 5\%$ donc $1-\alpha/2 = 0,975$.

2.2.6.2. Test de KRUSKAL et WALLIS

Lorsque les conditions de l'ANOVA ne sont pas réunies, on recourt à un test non paramétrique de même équivalence, ce test est celui de KRUSKAL et WALLIS. C'est un test qui s'intéresse non pas aux valeurs des variables, mais aux rangs des valeurs après les avoir ordonnés, il compare ainsi les rangs moyens de chaque série. Sous l'hypothèse nulle H_0 , la différence entre les rangs moyens de chacune des séries et la moyenne générale des rangs est nulle (ANCELLE, 2008). Ce test a été réalisé par un logiciel : le statistica.



Résultats et discussion

3. Résultats et discussion

3.1. Distribution en fonction du sexe et des groupes d'âge

L'âge moyen de nos patients est de 56 ans, avec des valeurs extrêmes de 27 et 80 ans. Un maximum de fréquences est observé dans la tranche d'âge comprise entre 61 et 70 ans. La fréquence la plus basse est constatée dans la tranche d'âge allant de 20 à 30 ans (figure 15).

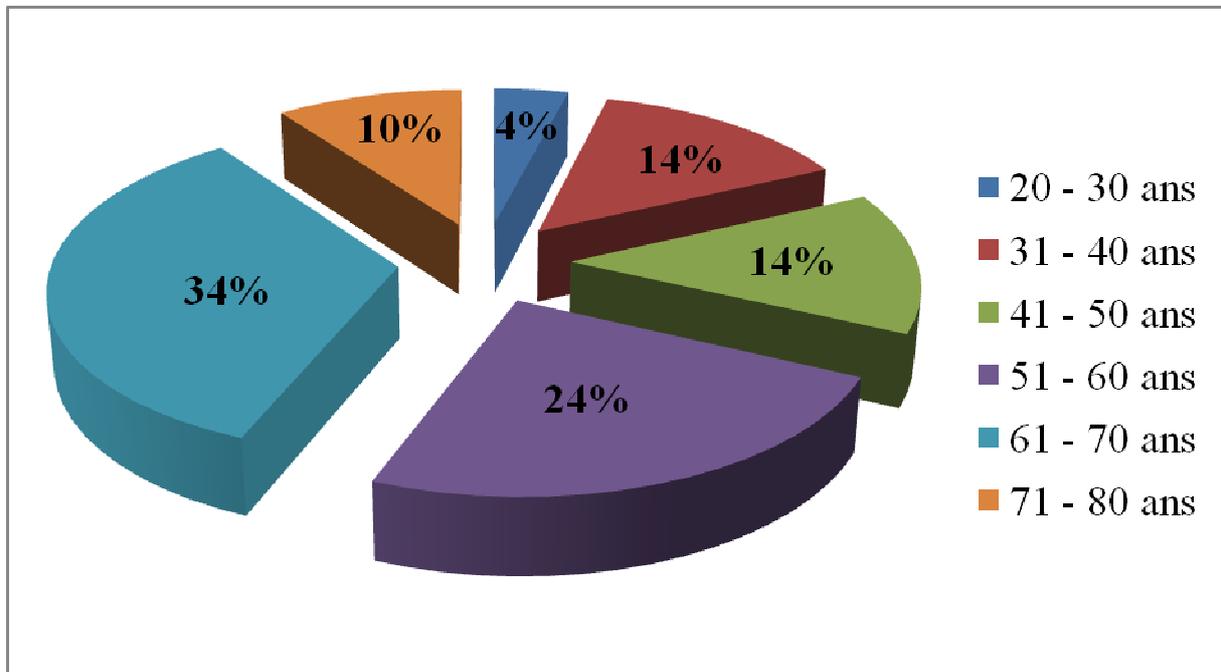


Figure 15 : Répartition selon les tranches d'âge.

Notre série a compris 11 femmes et 18 hommes soit, respectivement, 38% et 62%. Il existe une prédominance masculine avec un sexe ratio de 1,64.

La distribution en fonction du sexe et des groupes d'âge fait apparaître un pic de fréquence entre 61 et 70 ans avec un pourcentage plus élevé chez les hommes.

Il existe une prédominance masculine dans la plupart des tranches d'âge excepté celle comprise entre 20 et 30 ans et celle entre 51 et 60 ans, où on a noté une prédominance féminine. Une égalité de fréquence entre les deux sexes a été constatée chez les individus allant de 31 à 40 ans (figure 16).

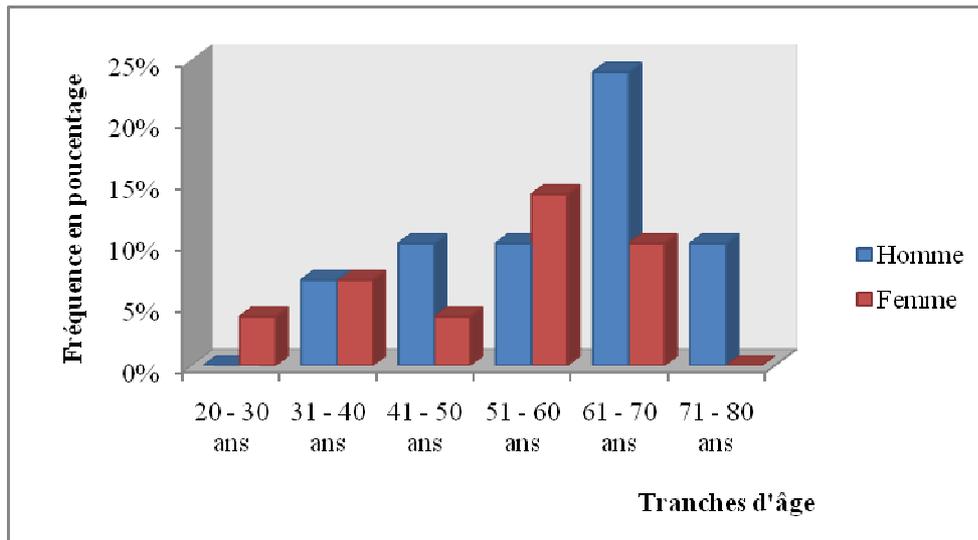


Figure 16 : Répartition en fonction du sexe et des tranches d'âge.

3.2. Etude clinique

3.2.1. Stade du cancer gastrique

La classification adoptée pour définir le stade d'avancement de la maladie est la classification TNM 1997.

Notre série est constituée d'individus avec les différents stades d'évolution de la maladie, nous avons constaté que près de 50% des patients étaient au stade II et seulement 7% d'entre eux étaient au stade I (figure 17).

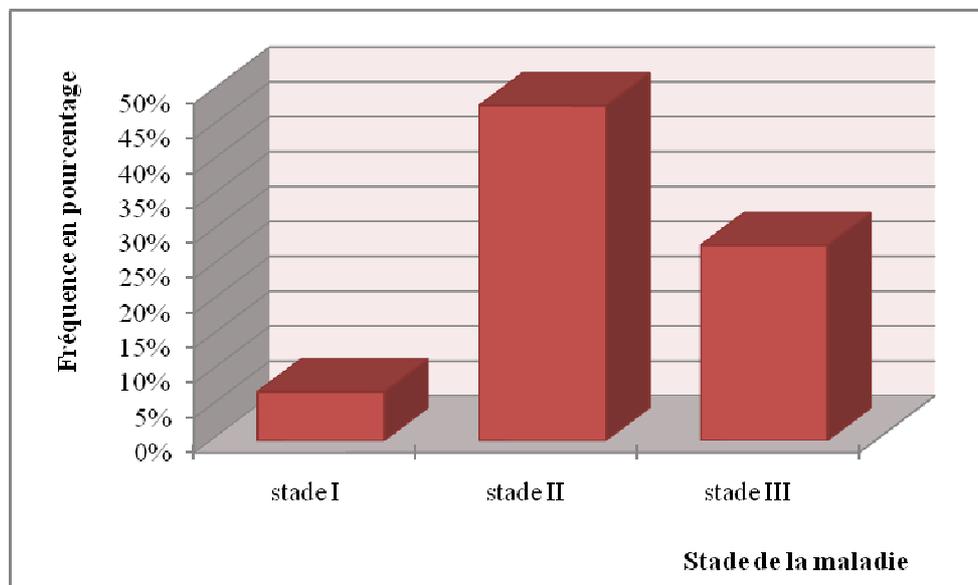


Figure 17 : Distribution selon le stade d'avancement du cancer gastrique.

L'étude épidémiologique réalisée sur notre série concorde avec les constatations déjà faites par JEMAL *et al* (2011) et aussi DE MARTEL *et al* (2013). Ces auteurs avaient constaté que les cancers de l'estomac surviennent rarement avant l'âge de 40 ans. Dans notre étude seulement 18% des patients ont moins de 40 ans, et près de 50% des individus ont plus de 60 ans. Toujours selon les mêmes auteurs, l'incidence du cancer de l'estomac augmente rapidement au-delà de 40 ans, avec un pic pendant la septième décennie avec 60% des patients de plus de 65 ans. SAIF *et al*, (2010) ont montré que le cancer gastrique est rarement détecté au début de la maladie à cause d'une symptomatologie clinique discrète, le plus souvent tardive et aspécifique, témoignant d'une maladie déjà localement avancée ou métastatique. Ceci est tout à fait en accord avec les sujets de notre série puisque seulement 7% des patients ont été diagnostiqués au stade précoce.

3.3. Etude des résultats obtenus par électrophorèse des protéines sériques sur acétate de cellulose

3.3.1. Etude du protéinogramme des protéines sériques

Après la migration, les protéines sont colorées au rouge ponceau. Une analyse densitométrique de la coloration permet d'exprimer le résultat sous forme d'une courbe. Ce tracé est dénommé électrophorégramme ou protéinogramme (annexe 2).

A pH basique, la majorité des protéines sériques sont chargées négativement. Elles migrent de la cathode vers l'anode et se séparent en cinq fractions. L'albumine qui porte une charge négative importante migre le plus loin vers l'anode. Les autres protéines forment un groupe hétérogène de protéines, se séparent en trois fractions différentes : les alpha globulines (α) qui se subdivisent en deux sous fractions : α_1 globuline et α_2 globuline, les bêta globulines (β) et les gammas globulines (γ) (figure 18).

Sur le protéinogramme, chaque fraction est repérée par la présence d'un pic. Pour l'intégration du tracé, chaque pic représente la quantité relative des protéines ou de groupes de protéines. Ces quantités sont exprimées en pourcentage du total. Utilisées conjointement au dosage des protéines totales par la réaction du Biuret, on a obtenu la concentration en g/l de chaque protéine ou groupe de protéines. Les protéinogrammes obtenus sont d'une manière générale très similaire. Ils présentent une allure conforme au tracé dit normal, référencé dans la littérature.

Les protéinogrammes ne présentent pas de modifications importantes qui pourraient être caractéristiques d'un syndrome particulier (annexe 2). Pour chacun des diagrammes électrophorétiques, on constate la présence d'un pic représentant la fraction albumine. On note aussi l'absence de pic étroit et plus élevé que celui de l'albumine dans la région des γ globulines, qui serait caractéristique d'une gammopathie monoclonale (SURICO *et al*, 1999). Aucun des tracés étudiés n'a révélé la présence de large pic dans la zone des γ globulines se confondant avec les β globulines formant ainsi un bloc β - γ globulines et qui serait caractéristique d'une gammopathie polyclonale (SURICO *et al*, 1999).

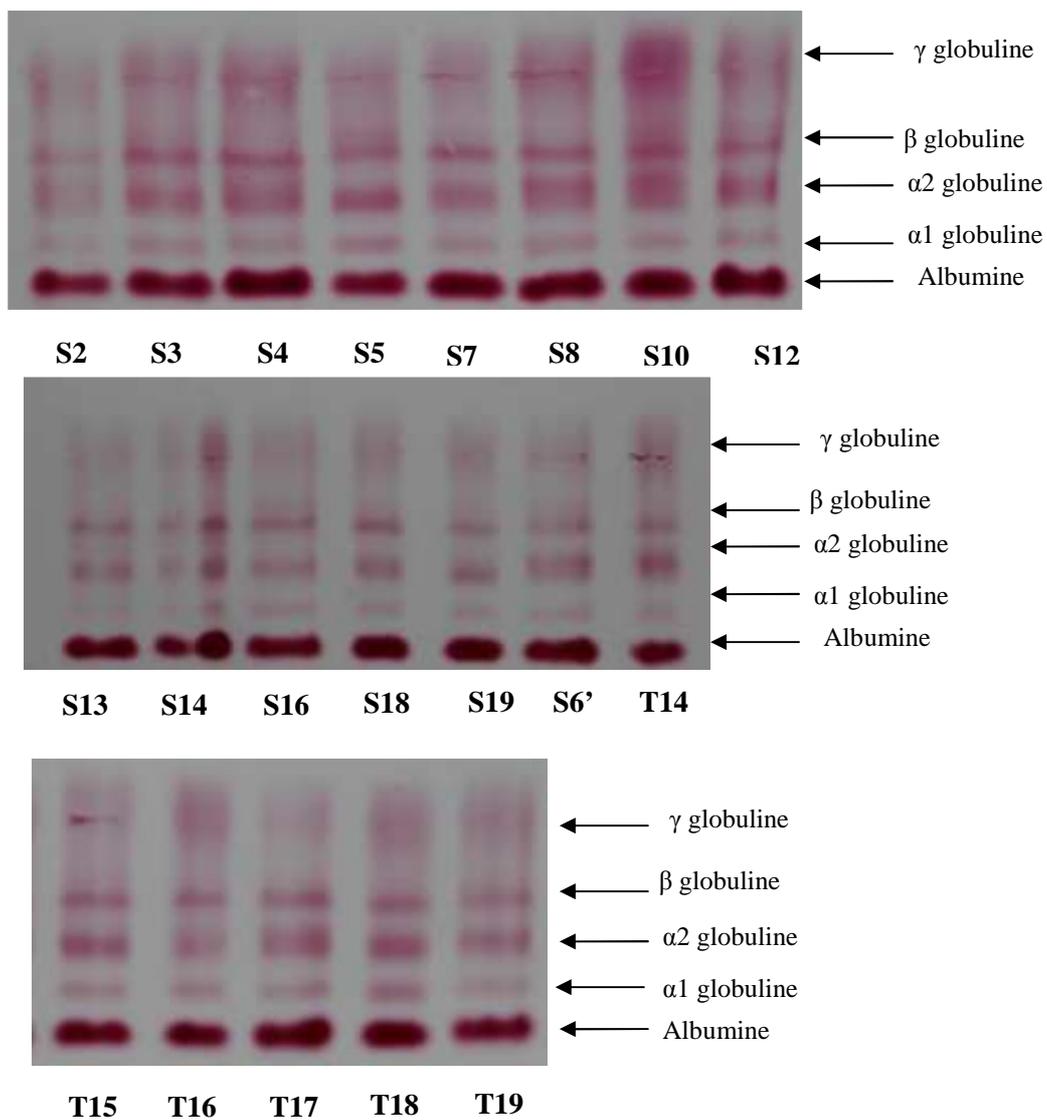


Figure 18 : Electrophorèse sur acétate de cellulose des échantillons de sérums des sujets atteints de cancer gastrique.

3.3.2. Variation de la protéinémie

Le dosage de la protéinémie totale a été réalisé par un automate en se basant sur la méthode de Biuret. Dans cette étude, pour l'interprétation des résultats, on a utilisé les valeurs référentielles utilisées dans le laboratoire central de biochimie du CHU de Tizi-Ouzou. Pour une personne adulte et saine, la protéinémie totale est comprise entre 60 et 80 g/l. En fonction de l'état physiologique ou pathologique de l'individu, cette protéinémie peut soit augmenter ou diminuer indiquant ainsi une augmentation ou une diminution d'une fraction protéique ou d'un ensemble des fractions.

Sur la totalité des individus analysés, 70% présentent des protéinémies normales comprises entre 60 et 80 g/l. Sur les 30% restant, on constate quelques hyper-protéinémies ; on a relevé deux individus avec de légères augmentations de la protéinémie avec des valeurs de 81 et 83 g/l (figure 19). On a aussi constaté une hyper-protéinémie marquée avec 103 g/l. Des protéinémies peu modifiées ont été également constatées chez deux individus avec une diminution de la protéinémie totale révélant de légères hypo-protéinémies avec 58 g/l. Le dosage a aussi révélé une importante hypo-protéinémie de 45 g/l.

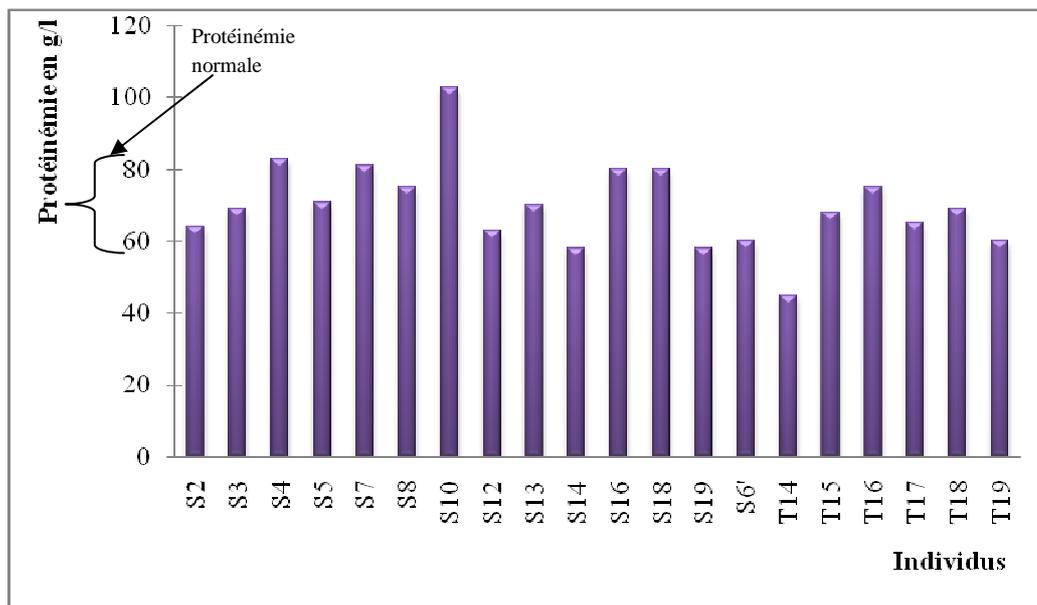


Figure 19 : Variation de la protéinémie totale.

3.3.3. Variation des différentes fractions protéiques

3.3.3.1. Variation de la concentration en albumine

L'albumine constitue la fraction anodique la plus intense. La finesse de ce pic est un bon indicateur de la qualité de l'électrophorèse. C'est une protéine de grande taille, osmotiquement active, d'une masse moléculaire (MM) approximative de 69 kDa. L'albumine est la plus abondante des protéines sériques. Elle représente 46 à 58% des protéines du sérum soit 31 à 50 g/l.

Sur les 20 patients analysés, 12 patients soit 60% des cas présentent des valeurs d'albumine correspondantes aux normes admises (figure 20). On a toutefois constaté des hypo-albuminémies chez 8 personnes. Pour certains individus, ces hypo-albuminémies sont de faibles ampleurs, ainsi les patients S3, S5, S14, S19, T15 et T19 présentent respectivement des valeurs d'albumine de 28,9 g/l, 27,4 g/l, 27,1 g/l, 28,2 g/l, 29,4 g/l et 27,2 g/l. Chez les individus S6 et T14, on a constaté d'importantes hypo-albuminémies de 22,9 g/l et 20,4 g/l respectivement.

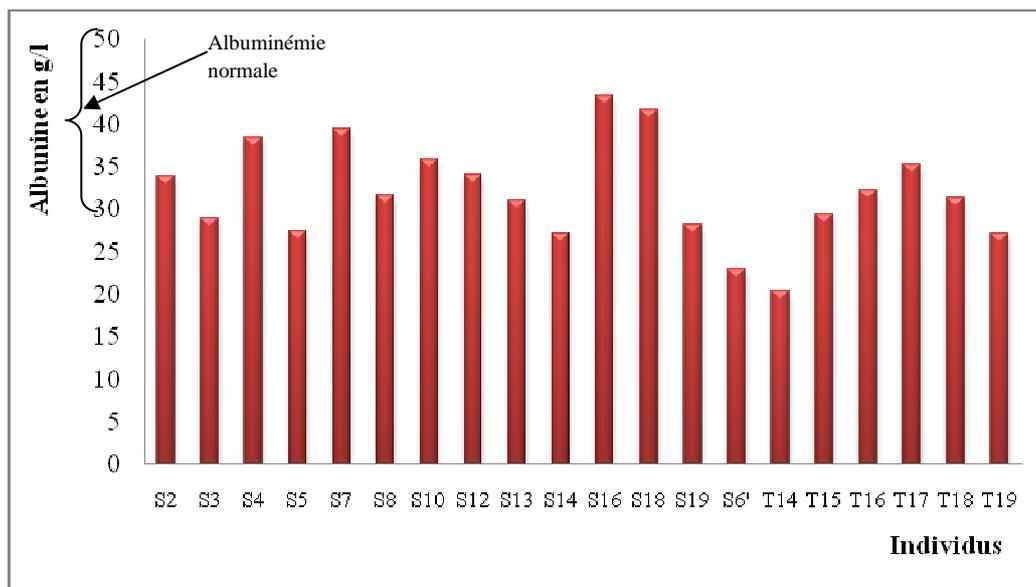


Figure 20 : Variation de la concentration sérique en albumine.

3.3.3.2. Variation de la concentration de la fraction $\alpha 1$ globuline

La fraction $\alpha 1$ globuline est une fraction très hétérogène présentant des rôles biologiques variables. Ces protéines sont principalement la pré-albumine, l'alpha foetoprotéine, l'alpha glycoprotéine acide (orosomucoïde), l'alpha 1 protéase et l'alpha 1 antitrypsine (KEREN, 2003).

Cette fraction représente de 2 à 5% du total des protéines sériques soit une concentration de 1 à 4g/l (figure 21). L'électrophorèse des protéines sériques a révélé une légère augmentation de la concentration de la fraction $\alpha 1$ globuline et cela pour trois échantillons de

sérums analysés. Ces hyper- α 1 sont respectivement de 4,5 g/l, 4,7g/l et de 5,1 g/l. Le reste des échantillons ont présenté des valeurs normales.

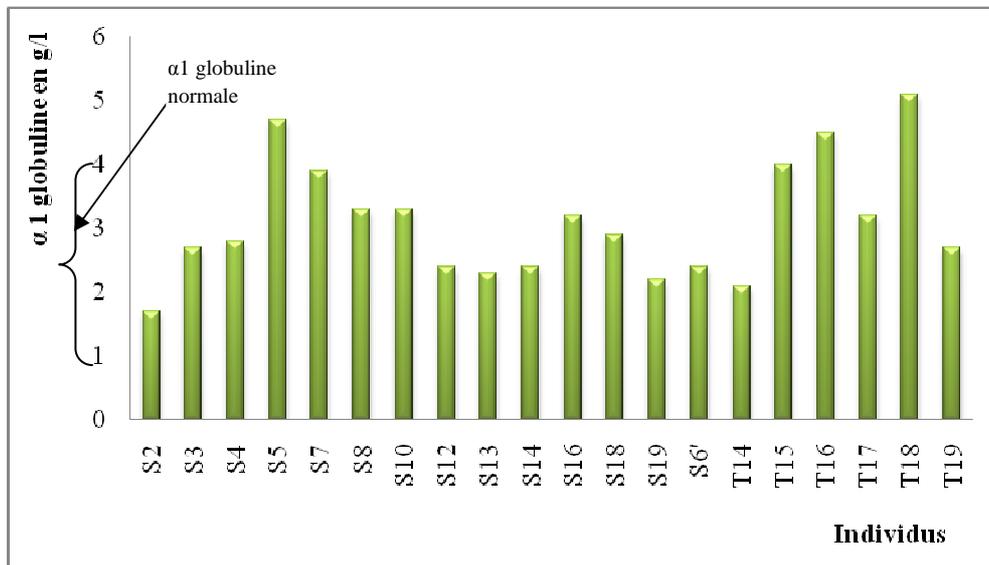


Figure 21 : Variation de la concentration sérique en alpha 1 globuline.

3.3.3.3. Variation de la concentration en alpha 2 globuline

Les α 2 globulines sont elles aussi composées d'un mélange hétérogène de protéines, on retrouve principalement l'haptoglobuline, la céruloplasmine et l'alpha 2 macroglobuline (KEREN, 2003). Cette fraction représente 11 à 16 % des protéines totales soit une concentration de 7 à 13,5 g/l.

Nous avons constaté une légère diminution de la concentration de cette fraction chez deux individus de notre série à savoir S14 et T14 avec des valeurs de 6,8 g/l. L'analyse a aussi révélé une hyper-alpha 2 chez le patient S10 avec une valeur de 15,1 g/l. Les autres patients soit 85% présentent une concentration normale (figure 22).

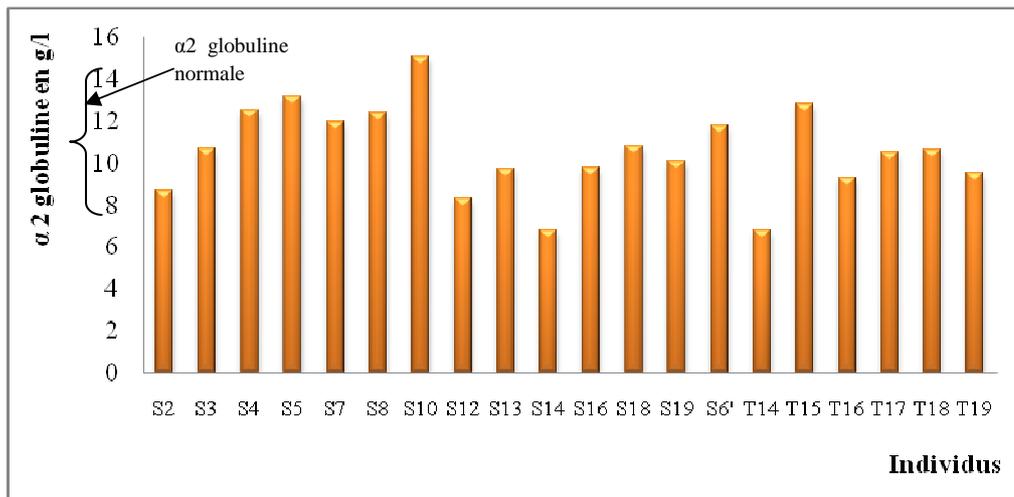


Figure 22 : Variation de la concentration sérique en alpha 2 globuline.

3.3.3.4. Variation de la concentration de la fraction bêta globuline

La fraction bêta est, comme la fraction alpha, une fraction très hétérogène constituée de protéines présentant des rôles biologiques différents. Ces protéines sont principalement la transferrine, l'hémopexine, la protéine C réactive et la bêta 2 microglobuline (KEREN, 2003). Cette fraction représente 9 à 16% des protéines totales soit une concentration de 6 à 13,5 g/l.

Quatre échantillons de notre série présentent de légères variations de la concentration de la fraction bêta globuline. Le reste des patients présentent des concentrations conformes aux normes. Ainsi, on a constaté chez le patient S3 et S5 de légères hyper-bêta globuline avec respectivement 13,8 g/l et 13,7 g/l. L'individu S10 quant à lui, présente une assez importante hyper-bêta globuline avec une concentration de 17,1 g/l. L'analyse a aussi révélé une importante hypo-bêta globuline avec une concentration de la fraction bêta globuline estimée à 3,9 g/l pour le patient T14 (figure 23).

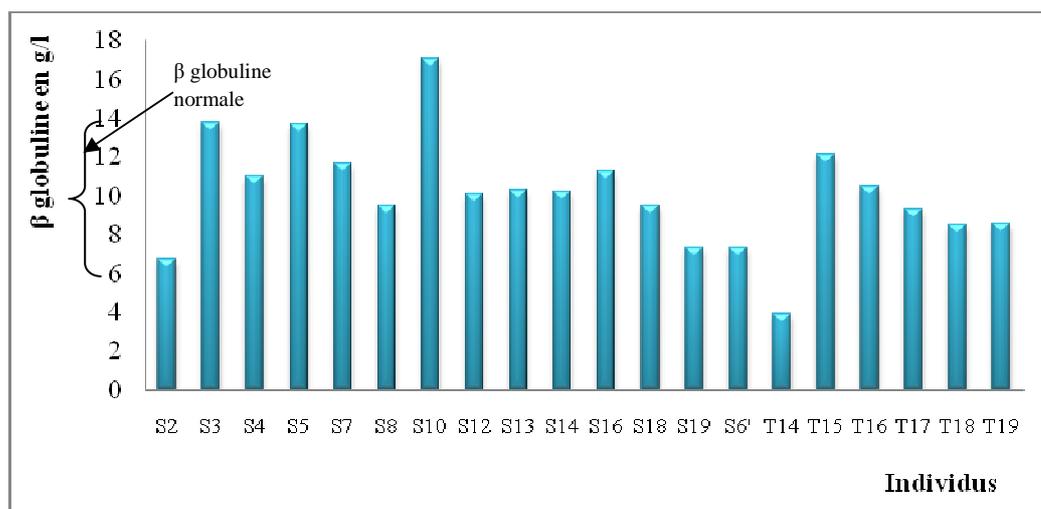


Figure 23: Variation de la concentration sérique en bêta globuline.

3.3.3.5. Variation de la concentration de la fraction gammaglobuline

La fraction gamma représente environ 13 à 21% des protéines totales soit 9 à 18 g/l. Avec des protéines d'une masse moléculaire de 15,6 kDa en moyenne. La fraction des γ globulines regroupe différentes immunoglobulines (KEREN, 2003).

Seulement 15% des patients ont présenté des hyper-gammaglobulinémies dont certaines étaient légères avec une concentration de 18,4 g/l. Cependant, le patient S10 a présenté une importante hyper-gammaglobulinémie avec 31,6 g/l. Chez 75% des individus étudiés, les valeurs étaient normales. Nous avons relevé deux hypo-gammaglobulinémies, chez le patient S12 avec une valeur de 8,2 g/l et chez le patient T17 qui a présenté une assez importante hypo-gammaglobulinémie avec une concentration de 6,7 g/l (figure 24).

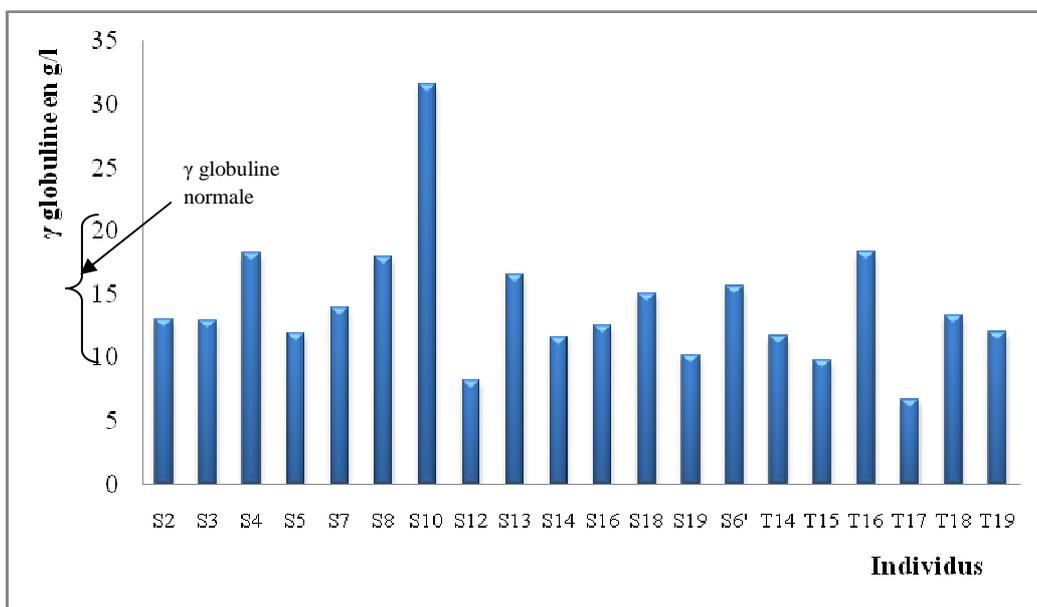


Figure 24 : Variation de la concentration sérique en gammaglobuline.

3.3.4. Interprétation de l'électrophorèse des protéines sériques

Le protéinogramme peut être caractéristique d'un syndrome bien spécifique. En cas de maladie, certaines fractions augmentent, d'autres diminuent, ce qui donne un protéinogramme caractéristique. Ainsi, une fois l'analyse systématique effectuée, il reste à interpréter les différentes anomalies mises en évidence. Cette interprétation va se réaliser selon un schéma simple basé sur la variation de la protéinémie et sur l'étude des variations des différentes fractions (JOHN, 2003).

L'analyse de la concentration en protéines totales conduit souvent à l'analyse détaillée de chacune des différentes fractions. Ainsi une hyper-protéïnémie ou une hypo-protéïnémie renvoie respectivement à l'augmentation ou à la diminution de la concentration d'une ou de plusieurs fractions protéiques.

Dans notre série, l'individu S10 qui présente une hyper-protéïnémie accentuée de 103g/l présente à la fois une hyper-alpha 2 de 15,1 g/l, une hyper-béta de 17,1 g/l et aussi une hyper-gammaglobulinémie de 31,6 g/l. De même que l'échantillon T14 présente une hypo-protéïnémie de 45 g/l avec aussi une hypo-albuminémie de 20,4 g/l et une diminution à la fois de la concentration de la fraction alpha 2 globuline et de la fraction béta globuline.

Pour l'interprétation de l'électrophorèse des protéines sériques il est important de garder à l'esprit lors de l'interprétation, que le pic d'albumine est une seule protéine et que chacune des fractions globulines représente un mélange hétérogène de protéines différentes migrant au même endroit (JOHN, 2003).

Dans ce qui va suivre, nous allons porter plus particulièrement notre attention aux modifications les plus importantes qui ont touché les protéinogrammes. Les différentes variations de faibles ampleurs qui ont été mises en évidence sont probablement dues à la présence de certains artéfacts au cours de l'analyse.

Les protéïnémies peu modifiées constatées chez certains de nos patients sont le plus souvent accompagnées d'hypo-albuminémies qui pourraient révéler le début d'un syndrome inflammatoire. L'albumine est une protéine négative de l'inflammation, dont la concentration diminue en cas de processus inflammatoire (DANIELS, 1975).

Le patient T14 qui a une hypo-albuminémie assez importante de 20,4 g/l avec une hypo-béta de 3,9 g/l. Cette hypo-protéïnémie, associée à la diminution de la fraction albumine, pourrait être caractéristique d'une insuffisance hépatique. Ainsi, MENDLER *et al* (1999) et TESSARI *et al* (2002) ont rapporté que l'insuffisance hépatique conduit à la diminution de la concentration de l'albumine, une protéine synthétisée par le foie.

La diminution de la protéïnémie est aussi rencontrée en cas de dénutrition. Des auteurs affirment que la diminution de la concentration en albumine peut aussi être causée par l'augmentation des pertes de cette protéine lors de saignements digestifs (WHICHER, 1980 ; REIF *et al*, 1991).

La symptomatologie clinique du cancer gastrique rapporte que les patients souffrent le plus souvent de douleurs localisées au niveau de l'abdomen, ces douleurs témoignent de l'atteinte de la paroi gastrique (ALLUM, 2011). Ceci est conforme aux travaux de WHICHER (1980), qui rapporte que l'hypo-protéïnémie peut être causée par l'augmentation des pertes protéiques par fuites digestives causées par les saignements gastriques. En outre, les patients atteints de cancer gastrique se plaignent aussi de nausées ainsi que de sensation précoce de satiété qui conduit à une importante perte de poids (CATALANO *et al*, 2005). Les travaux de REIF *et al* en 1991 ont confirmé que les pertes de poids des patients peuvent être associées à des hypo-protéïnémies.

L'hyper-protéïnémie constatée chez le patient S10 pourrait être causée par une hyper-gammaglobulinémie polyclonale. Elle correspond à une augmentation de toutes les classes d'Ig suite à une réponse immunitaire (SURICO *et al*, 1999). Nous avons aussi noté chez ce

patient une augmentation de la concentration de la fraction des gammaglobulines avec 31,6 g/l.

Cependant, il est nécessaire afin de mieux interpréter les résultats d'une électrophorèse de disposer de l'historique clinique de chaque patient. En plus, il faut prendre connaissance des traitements éventuellement déjà engagés par le patient ou en cours de traitement. Ainsi, par exemple, une corticothérapie modifie sensiblement les résultats de l'électrophorèse. La corticothérapie induit une augmentation sanguine en haptoglobuline, ce qui fait que les corticoïdes provoquent l'augmentation des globulines de la fraction alpha 2 (KEREN, 2003).

De plus, le cas d'hypo-protéïnémie et celui d'hyper-protéïnémie sont des cas isolés, presque la quasi-totalité des patients ont présenté des protéinogrammes normaux avec des protéïnémies et des concentrations de chaque fraction protéique conformes aux valeurs référentielles utilisées. Les patients atteints de cancer gastrique n'ont pas présenté de profils électrophorétiques caractéristiques de la maladie qui pourraient permettre aux praticiens de poser un premier diagnostic.

3.4. Etude des profils protéiques des protéines sériques obtenus par PAGE-SDS

3.4.1. Caractérisation des protéines sériques

Le sérum humain renferme une diversité en protéines avec des concentrations très différentes, ce qui fait toute la difficulté d'une étude spécifique de ces protéines ainsi que l'appréciation souhaitée de leur rôle dans la pathologie étudiée (SZAFRANSKI *et al*, 2004).

Les bandes protéiques identifiées par la PAGE-SDS en présence de β mércaptoéthanol peuvent être divisées en bandes protéiques majeures et en bandes mineures. Les bandes majeures constituent celles qui sont pratiquement toujours observées dans les sérums humains normaux. Les bandes mineures sont celles qui apparaissent faiblement ou pas du tout dans un sérum normal, mais qui peuvent être caractéristiques d'un profil électrophorétique renvoyant à une situation clinique donnée (SZAFRANSKI *et al*, 2004).

L'analyse des profils protéiques obtenus nous a permis de mettre en évidence des bandes protéiques bien focalisées et intenses, assez bien séparées du reste des bandes. Ces bandes sont notées : bande A, B, C, D, E, F, G et H selon l'ordre croissant de leur migration. Sur l'électrophorègramme figure aussi des zones délimitées par des intervalles de masses moléculaires (figure 25). Ces zones sont constituées le plus souvent de bandes protéiques de faibles intensités avec des positions très proches les unes les autres, ce qui ne permet pas une bonne séparation de ces dernières. Ces zones sont notées de (a) à (c).

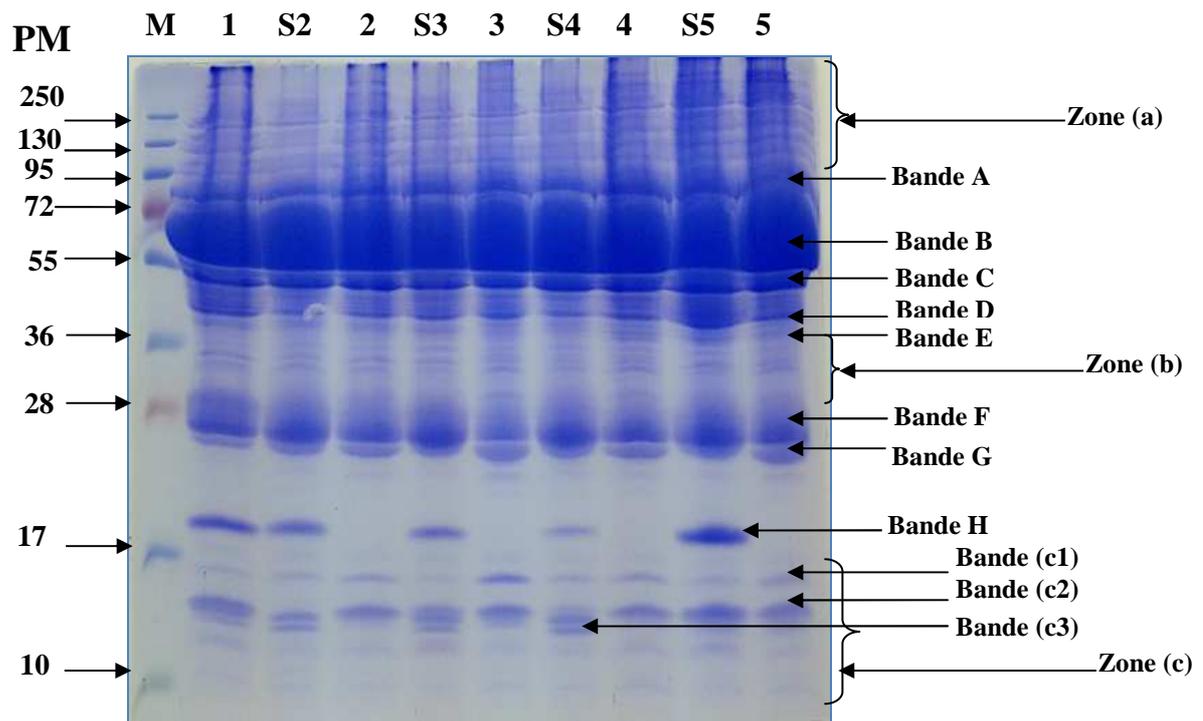


Figure 25 : Diagramme électrophorétique obtenu par PAGE-SDS en présence de β mercaptoéthanol des échantillons de sérum de sujets sains : 1, 2, 3, 4 et 5 et des patients avec un cancer gastrique : S2, S3, S4 et S5.

La zone (a) est constituée de bandes protéiques assez condensées les unes les autres. Les entités protéiques détectées dans cette zone sont de faible intensité, sans doute, en raison de leurs faibles concentrations sériques. Elles présentent des MM au-delà de 250 kDa et allant jusqu'à 95 kDa. Des travaux ont répertorié plusieurs protéines sériques dans cette zone de poids moléculaire (PM). Il nous est difficile d'évoquer l'ensemble de ces protéines, nous allons nous intéresser à quelques unes de ces dernières.

La fibronectine est une protéine de faible intensité avec une grande MM estimée selon BEVILACQUA *et al* (1981) à 440 kDa. Cette protéine a une concentration sérique normale de 0,19 à 0,35 g/l.

Le C4 du complément est une glycoprotéine de 206 kDa avec une concentration de 0,1 à 0,4 g/l. D'après JOHNSON *et al* (1999), cette protéine est visible sur une électrophorèse des protéines sériques quand elle est augmentée comme chez les patients présentant une réaction inflammatoire aiguë.

L'alpha 2 macroglobuline est synthétisée principalement par le foie avec des concentrations sériques de 1,3 à 3 g/l. Elle a une MM de 720 kDa, il s'agit d'une molécule tétramérique, composée de quatre sous unités identiques de 180 kDa chacune (PETERSEN, 1993).

Une autre protéine avec un haut poids moléculaire a été rapportée par VEZINA *et al* en 1988. Il s'agit de l'apolipoprotéine avec une masse moléculaire estimée à 150 kDa.

La protéine C réactive avec une MM estimée à 135 kDa. C'est une bande discrète avec une concentration normale dans le sérum inférieure à 0,02 g/l. Le taux de cette protéine peut augmenter considérablement d'après AUFWEBER *et al* (1991) et aussi selon MIETTINEN *et al* (1993) et cela au cours de réponses inflammatoires aiguës atteignant des concentrations supérieures à 1 g/l.

La céruloplasmine est une protéine de 131 kDa, c'est une protéine de transport produite par le foie avec une faible concentration sérique comprise entre 0,14 et 0,46 g/l. (WALLACH, 2000).

C3 du complément est normalement présent dans le sérum à une concentration de 0,9 jusqu'à 1,8 g/l. D'après PRATT *et al* (2002) le C3 est constitué de deux chaînes, une chaîne alpha et une chaîne bêta qui sont liées par des ponts disulfures. La chaîne alpha a une plus grande masse moléculaire estimée à 110 kDa. (TACK *et al*, 1979 ; BARNUM *et al*, 1990).

La bande A est très intense et bien focalisée, localisée aux alentours de 79 kDa. Cette protéine pourrait correspondre à la transferrine. Les travaux de KAMBOH *et al* (1987) ainsi que ceux de KASVOSVE *et al* (2000) témoignent que la transferrine est une glycoprotéine d'une seule chaîne polypeptidique avec une MM de 76,5 kDa et une concentration sérique normale estimée entre 2,4 et 4,8 g/l.

La bande B est très dense, diffuse, aussi très intense, avec une MM estimée à 67,5 kDa. Cette bande correspondrait probablement à l'albumine qui est une protéine non glycosylée avec une seule chaîne polypeptidique, avec une masse moléculaire de 69 kDa (BEHREINS *et al*, 1975). L'intensité de la bande est expliquée dans les travaux de FUNG *et al* (2000) par la concentration sérique de cette protéine qui occupe près de 60% des protéines sériques totales soit une concentration de 31 à 50 g/l.

Il est cependant essentiel de mentionner qu'il existe une protéine sérique d'un PM similaire, il s'agit de l'alpha 1 antichymotrypsine avec une concentration sérique faible comparée à l'albumine (estimée entre 0,3 et 0,6 g/l), ceci pourrait expliquer qu'elle soit masquée par l'albumine dans les profils (LILJA *et al*, 1992).

La bande C est dense et très intense avec une MM de 54,4 kDa. Elle pourrait correspondre aux chaînes lourdes des Ig. FRAZER *et al* (1999) rapportent que les Ig forment avec l'albumine les protéines sériques majoritaires, ce qui explique l'intensité de la bande C. Les Ig sont constituées de deux chaînes lourdes et deux chaînes légères. Les chaînes lourdes ont une MM aux alentours de 50 kDa (FRAZER *et al*, 1999).

La bande D a une masse moléculaire de 47 kDa, C'est une bande assez localisée et intense. Elle pourrait correspondre à l'alpha 1 antitrypsine avec une légère différence de MM comparée à celle rapportée par KHAN *et al* (2002) qui l'ont situé autour de 52 kDa, elle est constituée d'une seule chaîne polypeptidique avec une concentration sérique normale chez l'adulte de 0,9 à 2 g/l.

La bande E présente un MM de 45 kDa, elle correspondrait probablement à l'alpha 1 glycoprotéine acide, plus communément appelée orosomucoïde. RITCHIE *et al* (2000) ont présenté cette protéine comme étant une glycoprotéine avec une concentration sérique normale comprise entre 0,5 à 1,5 g/l et une MM de 43 kDa.

La zone (b) présente des protéines avec une MM allant de 42 à 30 kDa. Ces bandes sont de faibles intensités, cela est probablement dû à leurs faibles concentrations sériques. Certaines protéines avec des masses moléculaires comprises dans l'intervalle sus-cité ont été mentionnées dans certains travaux. On prend pour exemple, la glyceraldehyde 3-phosphate avec 38 kDa (RYOICHI *et al*, 1996), IGF binding protein avec 34 kDa (KIDDY et HAMILTON, 1999) et aussi l'adipocyte complement-related protein avec une masse moléculaire de 30 kDa (TSAO *et al*, 2002).

La bande F est située au tour de 28 kDa, c'est une bande diffuse et très intense. Elle pourrait correspondre aux chaînes légères des Ig dont la MM, telle rapportée par FRAZER *et al* (1999), est de l'ordre de 25 kDa.

La bande G présente une MM de 25 kDa, cette bande pourrait correspondre au TNF α dont la MM selon LAFONTAU et BERLAN (2003) est de 26 kDa.

La bande H présente une MM de 18,4 kDa et qui pourrait correspondre au retinol binding protein dont la masse moléculaire a été estimée à 20 kDa dans les travaux de SENOO *et al* (1990).

La zone (c) est constituée de protéines de faibles masses moléculaires comprises entre 17 et 10 kDa, elle présente pour la plupart des bandes de faibles intensités. On constate la présence de la bande (c1) avec une MM de 14,8 kDa. Cette bande est assez intense et pourrait correspondre soit à l'apolipoprotéine A2 avec 17 kDa (DURBIN et JONAS, 1997) ou encore à l'interleukine 2 avec 15 kDa (ZICARIA *et al*, 1995).

La bande (c2) qui a migré aux alentours de 13 kDa pourrait correspondre aux monomères constitutifs de la pré-albumine. C'est une protéine de 55 kDa, structurellement, c'est un tétramère symétrique composé de quatre monomères, chacun avec une MM de 13,7 kDa (HAMILTON et BENSON, 2001 ; KANDA *et al*, 1974).

La bande (c3) avec une masse moléculaire de 11 kDa correspondrait probablement à la bêta 2 microglobuline qui est une protéine constituée d'une seule chaîne polypeptidique avec une masse moléculaire de 11,8 kDa (SZAFRANSKI *et al*, 2004).

L'objectif majeur de l'étude des profils protéiques obtenus par PAGE-SDS est la détermination de bio-marqueurs, dont la mesure aurait pour effet de distinguer l'apparition de l'état pathologique. Pour un bio-marqueur, pour être cliniquement valable, il doit non seulement être histologiquement spécifique, mais aussi facilement détectable. Le sérum est potentiellement le spécimen le plus précieux pour la recherche des bio-marqueurs (ARDEKANI *et al*, 2002). En effet, vu que le sérum perfuse en permanence les tissus, on pourrait s'attendre à ce que l'apparition ou la présence de la maladie peut être déterminée par la mesure de la présence altérée ou de l'abondance des espèces moléculaires constitutives du sérum.

L'analyse du sérum est, cependant, analytiquement difficile en raison de la forte dynamique de la gamme des protéines le constituant. De plus, la teneur en protéines sériques, est dominée par un groupe de protéines telles que l'albumine, la transferrine, l'haptoglobine, les immunoglobulines (Ig) et des lipoprotéines (TURNER et HULME, 1970). Ainsi, on trouve que l'albumine et les Ig occupent respectivement près de 60% et 25% des protéines sériques totales. Aussi, ces protéines majeures ont tendance à masquer des protéines mineures de poids moléculaire similaire ou avoisinant le leur.

Une alternative à ce problème peut être envisagée par l'étude du protéome sérique à faible masse moléculaire et qui est la fraction en protéines et en peptides à partir de laquelle les protéines de haut poids moléculaire ont été retirées. Cette fraction est constituée de plusieurs classes de protéines physiologiquement importantes, telles que les cytokines, les chimiokines, les hormones peptidiques, ainsi que les fragments protéolytiques de protéines plus grandes.

Les protéines sériques humaines et les peptides de faible poids moléculaire et d'autres petits composants ont été associés à des conditions pathologiques telles que le cancer (PETRICOIN *et al*, 2002). Malheureusement, tout ceci nous conduit au fait que l'analyse du protéome sérique dépasse les capacités d'analyse des méthodes protéomiques traditionnelles notamment la PAGE-SDS, utilisée dans la présente étude, rendant ainsi la détection de protéines sériques de faible abondance extrêmement difficile.

La réduction de la complexité de notre échantillon dans le but d'appauvrir le niveau de protéines abondantes est ainsi une première étape essentielle dans cette analyse. Les techniques d'affinité utilisant des colonnes avec des anticorps anti-humain de l'albumine sérique ou l'utilisation de la protéine A ont été développées pour éliminer des protéines abondantes telles que l'albumine et les immunoglobulines à partir du sérum, avant l'analyse protéomique (ADKINS *et al*, 2002 ; STRELTSOVA *et al*, 2002 ; RADHAKRISHNA, 2003). Cependant, il est possible qu'un nombre important de protéines ou de peptides de faibles poids moléculaire soit enlevé de façon concomitante par ces procédés. Il est bien connu que l'albumine joue un rôle de support et de transport à l'intérieur du sang et se lie à des espèces physiologiquement importantes, tels que les hormones, les cytokines, et les lipoprotéines, ces méthodes sont également susceptibles de retirer les protéines ou peptides liés à ces protéines cibles (BURTIS et ASHWOOD, 2001).

3.4.2. Comparaison des profils électrophorétiques obtenus

L'analyse des profils électrophorétiques obtenus par PAGE-SDS pour les différents échantillons de sérums analysés, aussi bien ceux des sujets sains que ceux des sujets atteints de cancer gastrique, présentent d'une manière générale une certaine similitude et homogénéité concernant la présence des différentes bandes et zones précédemment sus-citées.

On note, cependant, que certaines bandes ou zones sont nettement moins apparentes dans certains profils. Ainsi, dans les échantillons de sérums qu'on a fait migrer dans le gel 2, on trouve que la bande A et les bandes qui constituent la zone b sont moins intenses comparées à celles obtenues dans les autres profils (figure 26). Les sérums qui ont migré dans le gel 3 présentent la bande D avec moins d'intensité que dans les autres profils obtenus (figure 27).

On a également constaté des différences concernant la bande H de 18 kDa, cette protéine présente une certaine disparité pour les profils protéiques des individus atteints de cancer gastriques mais aussi pour ceux des individus sains. On retrouve que cette protéine revient chez 65 % des patients (figure 25, 26, 27, 28 et 29). Cette même protéine présente également des disparités dans les profils des sujets sains, on la retrouve présente dans seulement 43 % des cas.

Les profils protéiques obtenus révèlent aussi des différences concernant la zone c. Comme il a été déjà évoqué, cette zone présente des bandes intenses et bien focalisées et aussi d'autres avec de faibles intensités. Dans cette zone, on constate que plusieurs profils présentent des bandes bien focalisées et de bonnes intensités, tandis que d'autres présentent des bandes d'intensité moindre. Ces différences sont aussi bien valables pour les sujets sains que pour les sujets malades (figure 25, 26, 27, 28 et 29).

De plus, on constate chez 20 % des individus atteints de cancer gastrique la présence d'une bande supplémentaire, fine et assez focalisée. Cette dernière est mise en évidence entre la bande F et la bande G (figure 26).

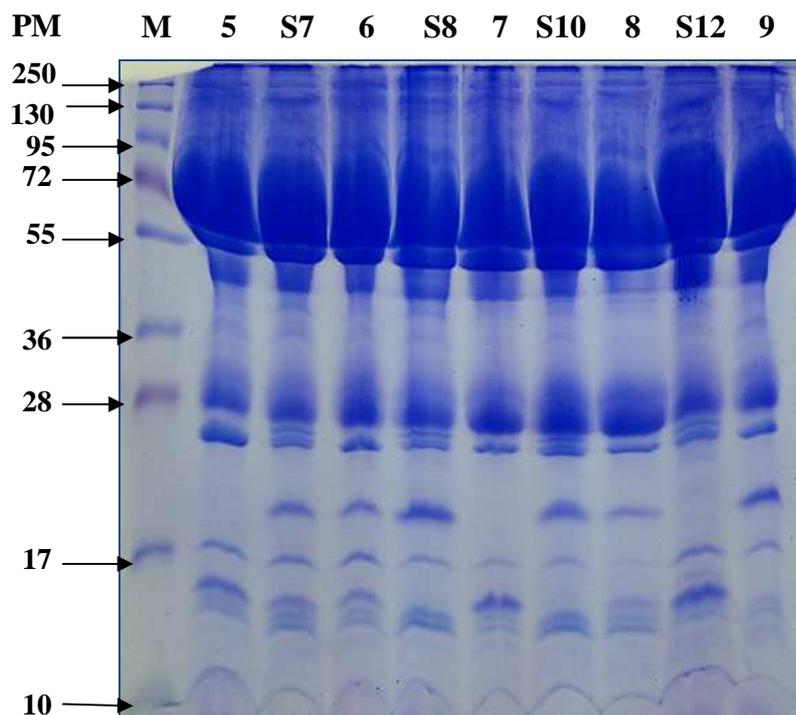


Figure 26 : Diagramme électrophorétique obtenu par PAGE-SDS en présence de β mercaptoéthanol des échantillons de sérum de sujets sains : 5, 6, 7, 8 et 9 et des patients avec un cancer gastrique : S7, S8, S10 et S12.

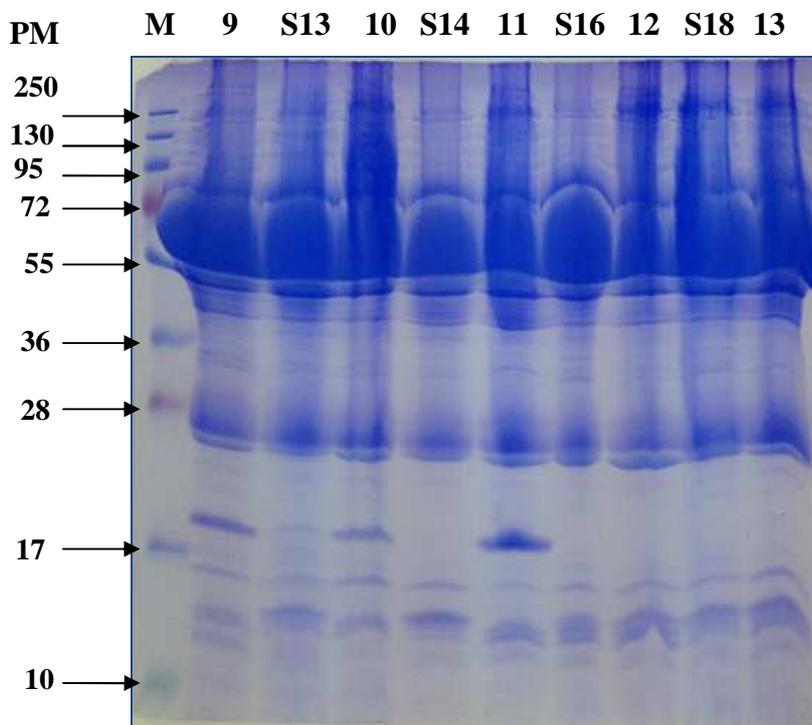


Figure 27 : Diagramme électrophorétique obtenu par PAGE-SDS en présence de β mercaptoéthanol des échantillons de sérum de sujets sains : 9, 10, 11, 12 et 13 et des patients avec un cancer gastrique : S13, S14, S16 et S18.

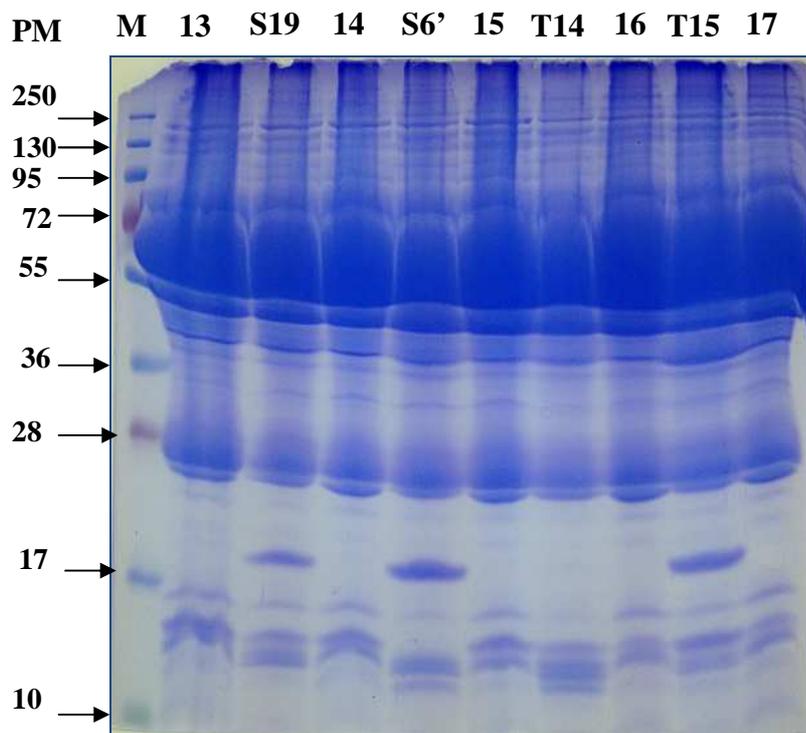


Figure 28 : Diagramme électrophorétique obtenu par PAGE-SDS en présence de β mercaptoéthanol des échantillons de sérum de sujets sains : 13, 14, 15, 16 et 17 et des patients avec un cancer gastrique : S19, S6', T14 et T15.

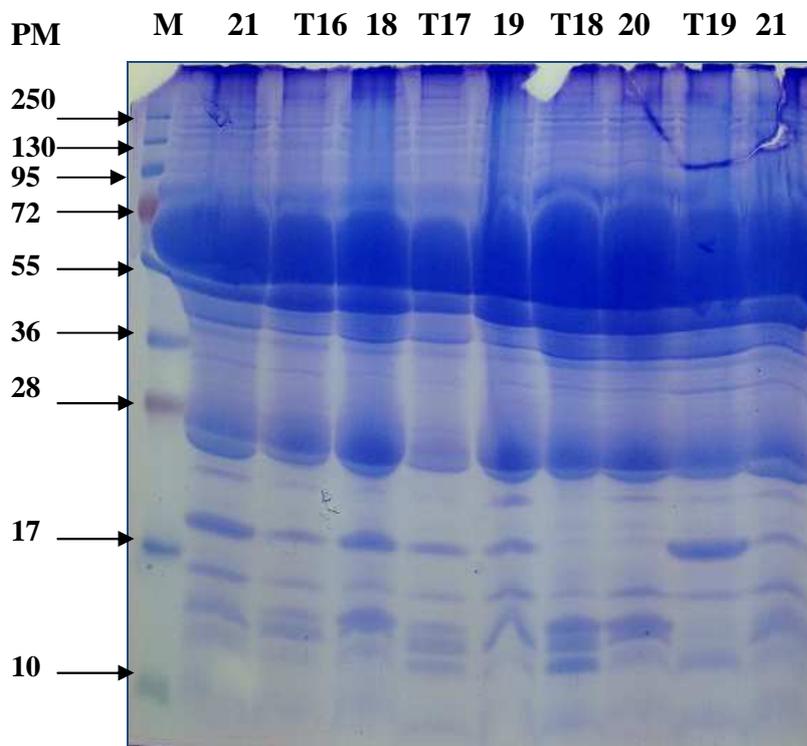


Figure 29 : Diagramme électrophorétique obtenu par PAGE-SDS en présence de β mercaptoéthanol des échantillons de sérum de sujets sains : 18, 19, 20 et 21 et des patients avec un cancer gastrique : T16, T17, T18 et T19.

Les différences constatées dans les profils électrophorétiques se présentent aussi bien chez les individus atteints de cancer gastrique que chez les individus sains, ceci pourrait s'expliquer par le fait que certaines protéines sériques présentent des polymorphismes génétiques. Nous citons pour exemple le cas de l'haptoglobine, sur une électrophorèse des protéines sériques, cette protéine présente un modèle relativement complexe qui provoque souvent une confusion dans le profil électrophorétique. Cette glycoprotéine présente un poids moléculaire et une migration électrophorétique variable. Il existe trois principaux phénotypes de cette protéine résultant de l'expression de deux allèles codominantes : Hp1 et Hp2. L'haptoglobine Hp1-1 présente une masse moléculaire de 86 kDa, les haptoglobines Hp2-1 et Hp2-2 présentent respectivement des masses moléculaires de 120 et 160 kDa. (VAN LENTE, 1991 ; LANGLOIS *et al*, 1996).

Ces différences constatées pourraient aussi s'expliquer par la dégradation de certaines protéines à cause d'une mauvaise conservation des échantillons de sérum. Ceci se manifesterait par l'apparition de fragments ou de polypeptides de différent poids moléculaire. Vu que cette dégradation n'est pas contrôlée, ces fragments pourraient être différents d'un échantillon à un autre.

La protéine LMP1 est une protéine membranaire considérée comme l'oncogène majeur d'EBV. Grâce à sa signalisation, LMP1 présente des propriétés immortalisantes et transformantes, et elle est responsable de nombreux changements phénotypiques dans les cellules infectées par l'EBV (AHSAN et KANDA, 2005). L'expression de LMP1 conduit au détournement et à la dérégulation chronique de voies de signalisation cellulaire et de leurs gènes cibles impliqués notamment dans des processus prolifératifs (EDWARDS *et al*, 2004 ; DAWSON *et al*, 2012). Cette protéine constituerait donc un bio-marqueur potentiel pour le diagnostic du cancer gastrique EBV positif. Cependant, avec une masse moléculaire approximative de 63 kDa, cette protéine se retrouve dans la zone de masse moléculaire des protéines sériques majeures notamment l'albumine avec 66 kDa, ce qui rend difficile sa mise en évidence dans les profils électrophorétiques obtenus par PAGE-SDS. Pour cette raison, nous avons recherché cette protéine par le test ELISA.

3.5. Analyse quantitative de LMP-1 par ELISA

3.5.1. Révélation de l'expression de la LMP-1 par le test ELISA

Nous avons estimé la valeur de la LMP-1 par l'utilisation du test ELISA, qui est le mieux indiqué pour un diagnostic clinique. Cette recherche est réalisée sur l'ensemble des échantillons de sérums et des extraits protéiques obtenus des biopsies de patients atteints de cancer gastrique, et également sur des échantillons de sérums de sujets sains.

Au cours de cette analyse, nous avons utilisé comme témoin négatif du sérum issu de cordon ombilical, qui est censé ne contenir aucune protéine du virus d'Epstein Barr, puisque pas encore contaminé par ce dernier. Nous avons aussi utilisé comme témoin positif un extrait protéique de cellules d'une lignée P3HR1, exprimant LMP-1.

L'estimation de la valeur de LMP-1 est faite en comparant la densité optique observée pour chaque échantillon de sérum ou extrait protéique avec celle observée pour le témoin négatif. Ainsi, tous les échantillons analysés qui présentent des densités optiques supérieures à celle observée pour le témoin négatif sont considérées comme positifs pour LMP-1.

L'analyse du sérum des patients atteints de cancer gastrique a montré que 50% des patients étaient positifs à l'expression de LMP-1. La densité optique observée pour chacun de ces échantillons est largement supérieure à celle observée pour le témoin négatif et qui est estimée à $0,184 \pm 0,009$. L'estimation de LMP-1 a révélée des DO allant de $(0,499 \pm 0,014)$ chez le patient S8 jusqu'à $(0,815 \pm 0,014)$ pour l'individu T14 (figure 30). Certains individus considérés présentent des DO supérieures à celle observée pour le témoin négatif, cependant, cette différence est faiblement significative. Ainsi, tous les échantillons qui présentent des DO allant de $(0,187 \pm 0,004)$ jusqu'à $(0,256 \pm 0,007)$ sont considérés négatifs à l'expression de LMP-1.

L'analyse statistique utilisant le test de conformité d'une moyenne a été réalisé afin de confirmer la positivité des résultats par rapport au témoin négatif. Ce test a permis de confirmer les résultats énoncés précédemment. Ainsi, les échantillons positifs à l'expression de LMP-1 c'est-à-dire les échantillons : S2, S3, S4, S6', S8, S14, S18, S19, T14 et T17 ont tous présenté des t observés (t_{obs}) supérieurs au t théorique ($t_{théor}$), ce qui signifie que l'hypothèse nulle $H_0 : m = m_0$ est rejetée exprimant ainsi la non-conformité de ces échantillons au témoin négatif (tableau V).

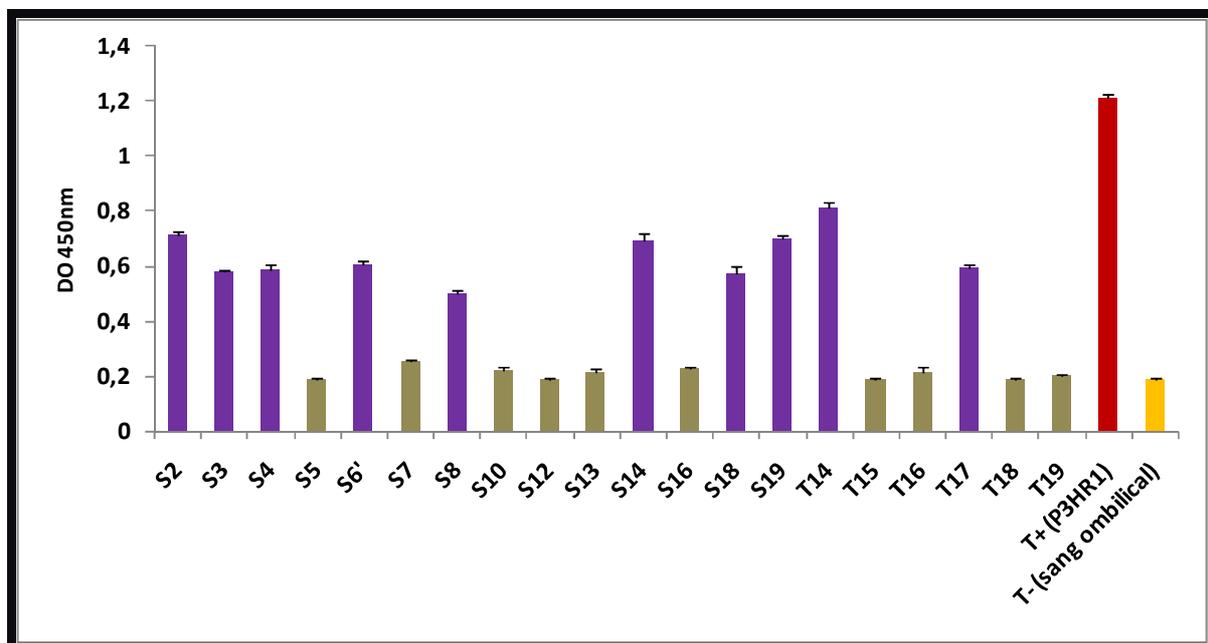


Figure 30 : Détection de la LMP-1 avec le test ELISA dans le sérum de patients atteints de cancer gastrique.

Tableau V : Résultats statistiques obtenus par le test de conformité d'une moyenne pour les échantillons de sérums des patients atteints de cancer gastrique.

Individu	Valeur de LMP-1	t_{obs}	$t_{\text{théor}}$	Conclusion
S2	0,711	70,65	4,303	$t_{\text{obs}} > t_{\text{théor}}$: H_0 est rejetée
S3	0,577	83,22	4,303	$t_{\text{obs}} > t_{\text{théor}}$: H_0 est rejetée
S4	0,586	56,40	4,303	$t_{\text{obs}} > t_{\text{théor}}$: H_0 est rejetée
S5	0,189	2,55	4,303	$t_{\text{obs}} < t_{\text{théor}}$: H_0 est acceptée
S6'	0,605	56,40	4,303	$t_{\text{obs}} > t_{\text{théor}}$: H_0 est rejetée
S7	0,256	2,49	4,303	$t_{\text{obs}} < t_{\text{théor}}$: H_0 est acceptée
S8	0,499	47,57	4,303	$t_{\text{obs}} > t_{\text{théor}}$: H_0 est rejetée
S10	0,233	1,69	4,303	$t_{\text{obs}} < t_{\text{théor}}$: H_0 est acceptée
S12	0,187	1,41	4,303	$t_{\text{obs}} < t_{\text{théor}}$: H_0 est acceptée
S13	0,213	1	4,303	$t_{\text{obs}} < t_{\text{théor}}$: H_0 est acceptée
S14	0,692	41,01	4,303	$t_{\text{obs}} > t_{\text{théor}}$: H_0 est rejetée
S16	0,229	1,54	4,303	$t_{\text{obs}} < t_{\text{théor}}$: H_0 est acceptée
S18	0,571	31,58	4,303	$t_{\text{obs}} > t_{\text{théor}}$: H_0 est rejetée
S19	0,703	81,12	4,303	$t_{\text{obs}} > t_{\text{théor}}$: H_0 est rejetée
T14	0,815	91,86	4,303	$t_{\text{obs}} > t_{\text{théor}}$: H_0 est rejetée
T15	0,191	2,41	4,303	$t_{\text{obs}} < t_{\text{théor}}$: H_0 est acceptée
T16	0,216	3,97	4,303	$t_{\text{obs}} < t_{\text{théor}}$: H_0 est acceptée
T17	0,592	51,36	4,303	$t_{\text{obs}} > t_{\text{théor}}$: H_0 est rejetée
T18	0,189	1,43	4,303	$t_{\text{obs}} < t_{\text{théor}}$: H_0 est acceptée
T19	0,199	3,84	4,303	$t_{\text{obs}} < t_{\text{théor}}$: H_0 est acceptée
moyenne	0,422	4,78	2,093	$t_{\text{obs}} > t_{\text{théor}}$: H_0 est rejetée

Concernant l'estimation de LMP-1 dans les extraits protéiques des biopsies gastriques, les résultats étaient similaires à ceux observés dans les sérums des patients atteints de la maladie. En effet, près de 54% des patients étaient positifs à l'expression de LMP-1, avec des DO allant de $(0,401 \pm 0,012)$ pour l'échantillon T17 jusqu'à $(0,885 \pm 0,019)$ pour l'échantillon T10. Les patients T11, T12, T16, T18, T20, T21 et T28 négatifs à l'expression de la LMP-1, présentent des DO avoisinantes celle observée pour le témoin négatif, estimée à $(0,179 \pm 0,003)$ (figure 31).

De la même manière que précédemment, le test de conformité d'une moyenne a été utilisé afin de confirmer les résultats observés. Ainsi, les patients positifs à l'expression de la LMP-1 présentent des t_{obs} supérieurs au $t_{\text{théor}}$. L'hypothèse nulle $H_0 : m = m_0$ est donc rejetée exprimant ainsi la non-conformité de ces échantillons au témoin négatif. Cependant, lorsque les échantillons présentent des t_{obs} qui sont inférieurs au $t_{\text{théor}}$, l'hypothèse nulle H_0 est acceptée, et ceci montre bien que ces échantillons sont négatifs à l'expression de LMP-1, puisqu'ils sont tous conformes au témoin négatif (tableau VI).

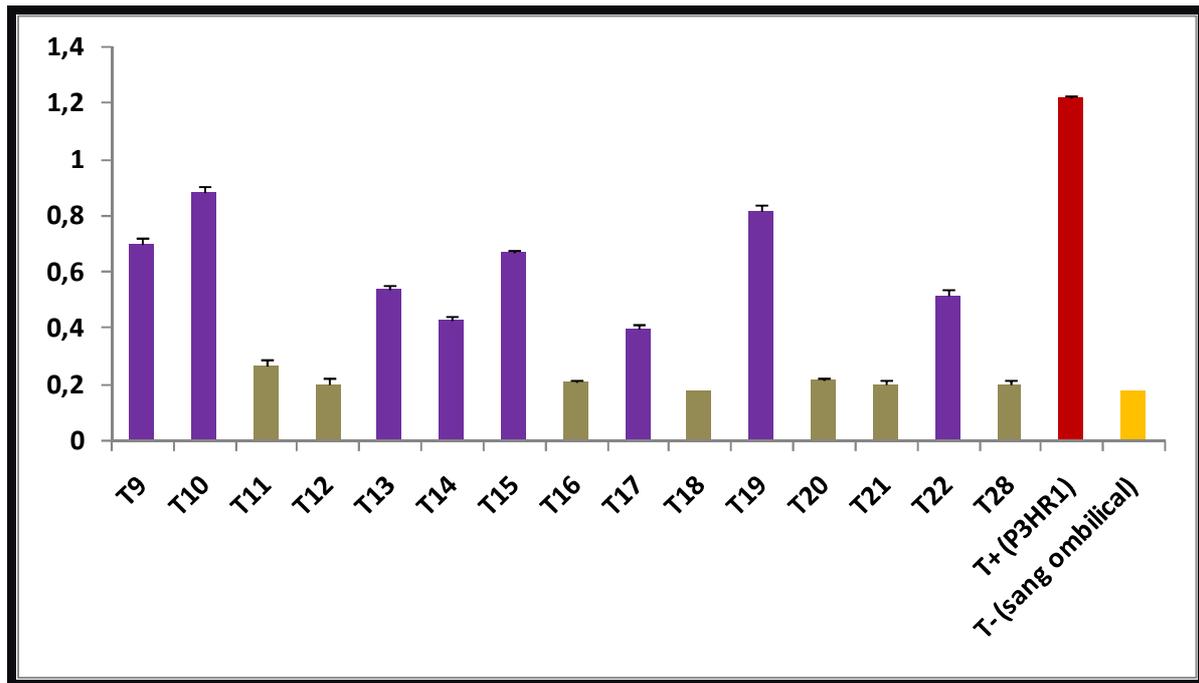


Figure 31 : Détection de la LMP-1 avec le test ELISA dans les extractions protéiques des biopsies des patients atteints de cancer gastrique.

Tableau VI : Résultats statistiques obtenus par le test de conformité d'une moyenne pour les échantillons d'extraits protéiques des patients atteints de cancer gastrique.

Individus	Valeur de LMP-1	t_{obs}	$t_{théor}$	Conclusion
T9	0,698	38,09	4,303	$t_{obs} > t_{théor}$: H_0 est rejetée
T10	0,885	62,38	4,303	$t_{obs} > t_{théor}$: H_0 est rejetée
T11	0,266	3,01	4,303	$t_{obs} < t_{théor}$: H_0 est acceptée
T12	0,204	2,41	4,303	$t_{obs} < t_{théor}$: H_0 est acceptée
T13	0,537	45,72	4,303	$t_{obs} > t_{théor}$: H_0 est rejetée
T14	0,43	33,08	4,303	$t_{obs} > t_{théor}$: H_0 est rejetée
T15	0,667	97,80	4,303	$t_{obs} > t_{théor}$: H_0 est rejetée
T16	0,208	4,04	4,303	$t_{obs} < t_{théor}$: H_0 est acceptée
T17	0,401	34,92	4,303	$t_{obs} > t_{théor}$: H_0 est rejetée
T18	0,177	2,45	4,303	$t_{obs} < t_{théor}$: H_0 est acceptée
T19	0,814	41,92	4,303	$t_{obs} > t_{théor}$: H_0 est rejetée
T20	0,214	1,22	4,303	$t_{obs} < t_{théor}$: H_0 est acceptée
T21	0,201	1,88	4,303	$t_{obs} < t_{théor}$: H_0 est acceptée
T22	0,519	34,02	4,303	$t_{obs} > t_{théor}$: H_0 est rejetée
T28	0,201	2,93	4,303	$t_{obs} < t_{théor}$: H_0 est acceptée
moyenne	0,428	4,17	2,145	$t_{obs} > t_{théor}$: H_0 est rejetée

Nous avons aussi effectué une estimation de l'expression de LMP-1 dans les sérums de sujets sains, et cela dans le but de vérifier si l'expression de LMP-1 était spécifique aux patients atteints de cancer gastrique. Les résultats obtenus montrent que sur l'ensemble des échantillons analysés, seuls deux d'entre eux ont présenté des DO supérieures à celle du témoin négatif estimée à $(0,184 \pm 0,009)$. Ainsi, près de la quasi-totalité des sujets sains sont négatifs à l'expression de LMP-1 (figure 32).

Le test de conformité d'une moyenne appliqué sur les échantillons de sérums de sujets sains confirme les résultats annoncés ci-dessus. En effet, à l'exception des deux échantillons 7 et 20 qui ont présenté des DO supérieures à celle du témoin négatif et qui sont respectivement de $(0,535 \pm 0,01)$ et de $(0,399 \pm 0,018)$, le reste des échantillons présentent tous des t_{obs} qui sont inférieurs au $t_{théor}$, ce qui signifie que l'hypothèse nulle H_0 est acceptée. De plus, la moyenne des DO observées a aussi présenté un t_{obs} inférieur au $t_{théor}$. Ceci revient à dire que ces échantillons sont tous conformes au témoin négatif, ils sont de ce fait négatifs à l'expression de LMP-1 (tableau VII).

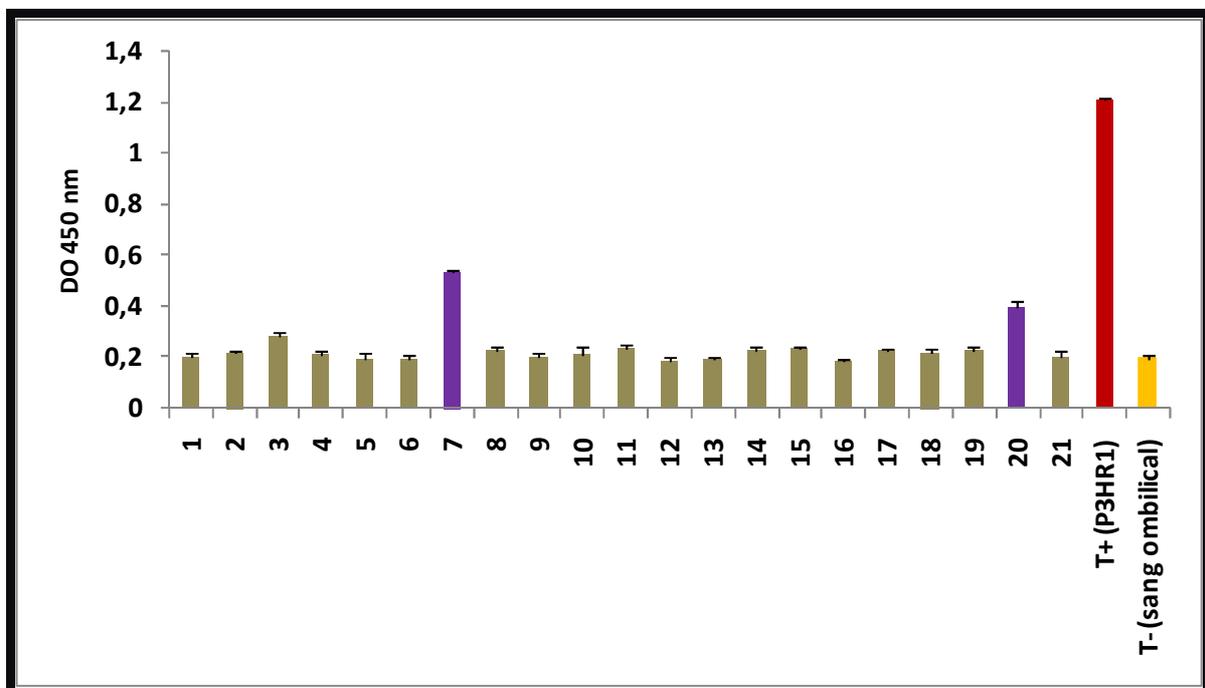


Figure 32 : Détection de la LMP-1 avec le test ELISA dans le sérum des sujets sains.

Tableau VII : Résultats statistiques obtenus par le test de conformité d'une moyenne pour les échantillons de sérums des sujets sains.

Individus	Valeur de LMP-1	t_{obs}	$t_{théor}$	Conclusion
1	0,205	1,91	4,303	$t_{obs} < t_{théor}$: H_0 est acceptée
2	0,217	4,15	4,303	$t_{obs} < t_{théor}$: H_0 est acceptée
3	0,283	1,56	4,303	$t_{obs} < t_{théor}$: H_0 est acceptée
4	0,206	1,18	4,303	$t_{obs} < t_{théor}$: H_0 est acceptée
5	0,197	0,41	4,303	$t_{obs} < t_{théor}$: H_0 est acceptée
6	0,194	0,086	4,303	$t_{obs} < t_{théor}$: H_0 est acceptée
7	0,535	68,41	4,303	$t_{obs} > t_{théor}$: H_0 est rejetée
8	0,229	2,99	4,303	$t_{obs} < t_{théor}$: H_0 est acceptée
9	0,199	0,60	4,303	$t_{obs} < t_{théor}$: H_0 est acceptée
10	0,213	1,66	4,303	$t_{obs} < t_{théor}$: H_0 est acceptée
11	0,236	3,64	4,303	$t_{obs} < t_{théor}$: H_0 est acceptée
12	0,184	1,32	4,303	$t_{obs} < t_{théor}$: H_0 est acceptée
13	0,190	0,97	4,303	$t_{obs} < t_{théor}$: H_0 est acceptée
14	0,225	2,71	4,303	$t_{obs} < t_{théor}$: H_0 est acceptée
15	0,234	3,47	4,303	$t_{obs} < t_{théor}$: H_0 est acceptée
16	0,186	0,59	4,303	$t_{obs} < t_{théor}$: H_0 est acceptée
17	0,227	2,88	4,303	$t_{obs} < t_{théor}$: H_0 est acceptée
18	0,216	1,95	4,303	$t_{obs} < t_{théor}$: H_0 est acceptée
19	0,222	2,46	4,303	$t_{obs} < t_{théor}$: H_0 est acceptée
20	0,399	17,47	4,303	$t_{obs} > t_{théor}$: H_0 est rejetée
21	0,202	0,76	4,303	$t_{obs} < t_{théor}$: H_0 est acceptée
moyenne	0,238	2,06	2,086	$t_{obs} < t_{théor}$: H_0 est acceptée

La révélation de l'expression de LMP-1 dans les extraits protéiques des biopsies gastriques et dans les échantillons de sérums des sujets atteints de cancer gastrique, et son absence dans les sérums des sujets sains confirme l'association du cancer gastrique au virus d'Epstein Barr et un possible rôle oncogénique de LMP-1 dans l'installation du cancer.

L'association du cancer gastrique au virus d'Epstein Barr a été rapportée par plusieurs auteurs. L'incidence de cette association varie selon les auteurs, elle a été estimée par BURKE *et al* (1990), SHIBATA et WEISS (2000) et aussi par VAN BEEK *et al* (2002) entre 6 à 16% de cas de cancer gastrique répertoriés. Et notre étude a révélé cette association dans près de 50% des cas étudiés. Puisque EBER1 est très abondante dans les cellules infectées par EBV, l'hybridation *in situ* EBER1 (ISH) est la technique la plus utilisée pour l'identification du cancer gastrique EBV associé (LEE *et al*, 2009).

La protéine LMP-1 considérée comme l'oncogène majeur d'EBV avec des propriétés immortalisantes et transformantes (AHSAN et KANDA, 2005), n'a pas été jusqu'à présent associée au cancer gastrique EBV positif. Les travaux de FUKAYAMA *et al* (2008) et ceux de MAEDA *et al* (2009) montrent que le cancer gastrique EBV positif présente une latence

de type I qui exprime EBNA1, EBER, BART et parfois (40% des cas) la protéine LMP2A et où l'expression de LMP-1 et de EBNA2 est absente.

Toutefois, il est essentiel de mentionner que les travaux de MEIJ *et al* en 2000 ont montré que la majorité des protéines LMP-1 se localisent au niveau de l'appareil de Golgi. HOUALI *et al* (2007) ont rapporté que LMP-1 est associée aux exosomes sous forme de vésicules et qu'elle est sécrétée sous cette forme dans les cellules épithéliales. La protéine LMP-1 prend naissance au départ au niveau de la machinerie cellulaire (noyau puis cytoplasme) puis elle est conduite au niveau membranaire pour former la structure transmembranaire qui lui est spécifique. Il est probable qu'une certaine quantité de la protéine LMP-1 se complexe aux exosomes dans le but d'activer certaines voies de signalisation telle que NF-Kb. Ainsi, il sera préférable d'orienter la recherche de cette protéine vers sa détection dans les exosomes. L'anticorps anti LMP-1 utilisé dans la présente étude est l'anti LMP1 S12 monoclonal qui permet d'identifier LMP-1 aussi bien au niveau membranaire que complexée aux exosomes.

Les cas négatifs à l'expression de LMP-1 présentent probablement des cancers gastriques EBV négatifs. Il est vrai qu'un rôle oncologique d'EBV a été mis en évidence concernant la carcinogenèse du cancer gastrique, cependant, ce virus n'est pas le seul facteur incriminé dans l'installation de cette pathologie. Des études semblent indiquer qu'*Helicobacter pylori* pourrait constituer un facteur étiologique du cancer gastrique (NAUMAUN et CRABTREE ; 2004), conjointement à la place que prennent les facteurs alimentaires et environnementaux. Ces études affirment qu'une diète riche en sel provoque une gastrite atrophique ou une dysplasie et favorise la carcinogenèse gastrique.

C'est dans ce sens qu'un modèle de carcinogenèse gastrique a été proposé par CORREA en 1992 et peut être schématisé de la façon suivante. Une gastrite superficielle chronique ancienne, potentiellement liée à une infection à *Helicobacter pylori*, voir à une diète trop riche en sel, pourrait déterminer l'apparition d'une gastrite atrophique chronique avec métaplasie intestinale. Celle-ci s'accompagne d'une diminution de la masse cellulaire pariétale, provoquant une réduction de la sécrétion d'acide gastrique, source d'une prolifération bactérienne, d'une diminution de l'absorption de l'acide ascorbique et d'une augmentation de la gastrinémie, facteur inducteur potentiel de la prolifération cellulaire épithéliale gastrique. L'inflammation chronique déterminerait également une destruction cellulaire épithéliale d'où une augmentation de la production de radicaux libres, une réduction de la concentration intraluminaire d'acide ascorbique et une augmentation du renouvellement cellulaire. Ces événements fournissent un milieu idéal pour accroître le risque carcinogène chez les sujets à risque.

3.5.2. Relation entre l'âge du patient atteint de cancer gastrique et l'expression de LMP-1

Afin de mettre en évidence une relation possible entre l'âge du patient atteint de cancer gastrique et l'expression de LMP-1, nous avons soumis l'ensemble des valeurs de LMP-1 obtenues par le test ELISA, à une analyse par un test statistique non paramétrique équivalent à l'analyse de la variance (ANOVA), qui est le test de KRUSKAL et WALLIS et où la variante indépendante est l'âge du patient.

Les résultats de ce test montrent que l'expression de LMP-1 est indépendante de l'âge du patient atteint du cancer gastrique. Pour les deux types d'échantillons analysés, il n'existe pas de différences significatives pour l'expression de LMP-1 en fonction de l'âge de l'individu. Pour les échantillons de sérums des patients malades, nous avons obtenu une probabilité de 0,266 et qui est de 0,35 pour les extraits protéiques des biopsies gastriques (tableau VIII et IX). Dans les deux cas la probabilité d'acceptation est supérieure à 0,05, ce qui signifie que l'hypothèse nulle $H_0 : m_1 = m_2 = \dots = m_n$ est acceptée.

Tableau VIII : Test de KRUSKAL et WALLIS pour les échantillons de sérums des sujets malades (variante indépendante : l'âge du patient au moment du diagnostic).

ANOVA de Kruskal-Wallis par Rangs; LMP1 (Feuille de données Var. indépendante (classement) : AGE Test de Kruskal-Wallis : $H(2, N=20) = 2,646190$ $p = ,266$			
Dépend. : LMP1	Code	N Actifs	Somme Rangs
AGE1	101	3	37,0000
AGE2	102	12	139,0000
AGE3	103	5	34,0000

Tableau IX : Test de KRUSKAL et WALLIS pour les échantillons des extraits protéiques des biopsies gastriques (variante indépendante : l'âge du patient au moment du diagnostic).

ANOVA de Kruskal-Wallis par Rangs; LMP1 (Feuille de données Var. indépendante (classement) : AGE Test de Kruskal-Wallis : $H(2, N=15) = 2,096601$ $p = ,350$			
Dépend. : LMP1	Code	N Actifs	Somme Rangs
AGE1	101	1	2,50000
AGE2	102	7	64,50000
AGE3	103	7	53,00000

Le virus d'EBV est transmis par la salive au moment de l'adolescence, mais il est vrai que dans les pays en voie de développement, la primo-infection par EBV se manifeste précocement, le plus souvent chez des enfants de moins de trois ans et qui sont infectés par le biais de leurs mamans (HOCHBERG *et al*, 2004). Cette infection précoce n'a pas l'air d'influencer le rôle oncogénique du virus dans l'installation du cancer gastrique. La présente étude a clairement permis de mettre en évidence qu'il n'existe aucune relation de dépendance entre l'âge du patient atteint du cancer gastrique et l'expression de LMP-1 et donc entre l'âge

du patient et de l'association de la pathologie à l'EBV. Les travaux d'AKIBA *et al* en 2008 et ceux de LEE *et al* en 2009 ont suggéré que le cancer gastrique EBV positif survient chez les patients relativement jeunes, mais il est essentiel de mentionner que des méta-analyses n'ont pas confirmé cette observation.

3.5.3. Relation entre le stade du cancer gastrique et l'expression de LMP-1

Puisque LMP-1 pouvait servir comme bio-marqueur potentiel pour le diagnostic du cancer gastrique, il nous est paru essentiel de rechercher l'existence d'une relation de dépendance entre l'expression de la protéine et le stade d'avancement de la maladie. Pour ce fait, nous avons de la même manière que précédemment, soumis les valeurs de LMP-1 obtenues par le test ELISA au test de KRUSKAL et WALLIS où le stade de la maladie représente la variante indépendante.

Pour les échantillons de sérums des patients malades, nous avons obtenu une probabilité de 0,245 et qui est de 0,512 pour les extraits protéiques des biopsies gastriques (tableau X et XI). Dans les deux cas la probabilité d'acceptation est supérieure à 0,05, ce qui signifie que l'hypothèse nulle $H_0 : m_1 = m_2 = \dots = m_n$ est acceptée. Ainsi, ce test a confirmé qu'il n'existe aucune relation de dépendance entre l'expression de LMP-1 et le stade d'avancement de la maladie.

Tableau X : Test de KRUSKAL et WALLIS pour les échantillons de sérums des sujets malades (variante indépendante : stade d'avancement de la maladie).

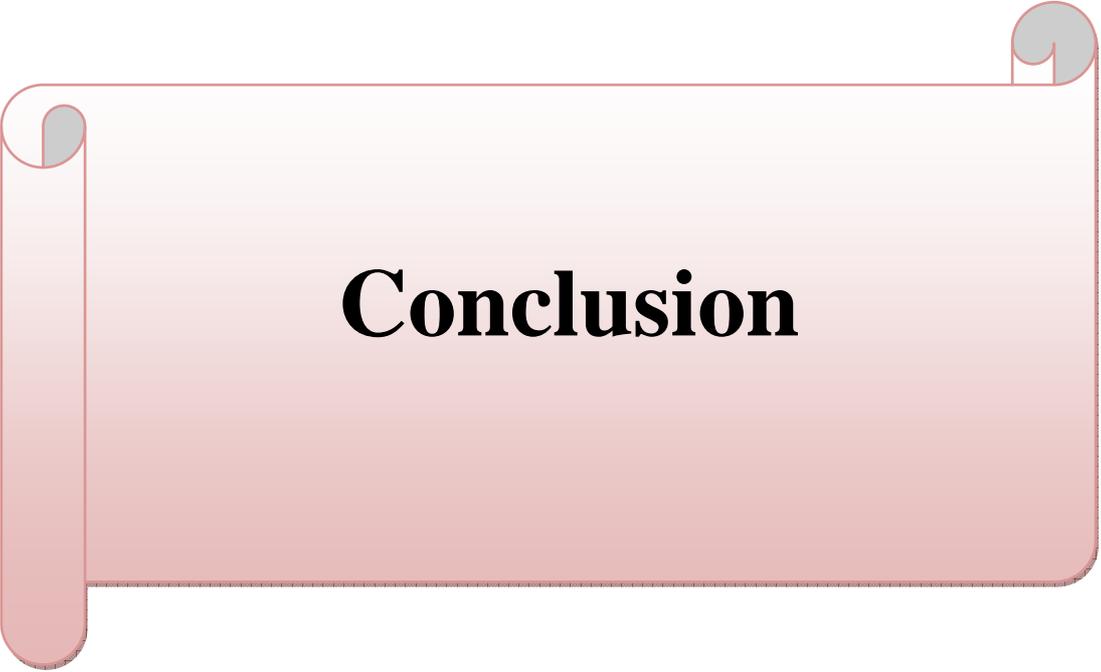
ANOVA de Kruskal-Wallis par Rangs; LMP1 (Feuille de données Var. indépendante (classement) : STADE Test de Kruskal-Wallis : H (2, N= 20) =2,812987 p =,245			
Dépend. : LMP1	Code	N Actifs	Somme Rangs
STADE1	104	3	41,0000
STADE2	105	11	125,0000
STADE3	106	6	44,0000

Tableau XI : Test de KRUSKAL et WALLIS pour les échantillons des extraits protéiques des biopsies gastriques (variante indépendante : stade d'avancement de la maladie).

ANOVA de Kruskal-Wallis par Rangs; LMP1 (Feuille de données Var. indépendante (classement) : STADE Test de Kruskal-Wallis : H (2, N= 15) =1,335719 p =,512			
Dépend. : LMP1	Code	N Actifs	Somme Rangs
STADE1	104	5	40,00000
STADE2	105	6	40,00000
STADE3	106	4	40,00000

Notre étude a montré que l'expression de la protéine LMP-1 est indépendante du stade d'avancement du cancer gastrique, ceci reviendrait à dire que l'installation d'EBV se fait très précocement dans les cellules épithéliales gastriques et elle persiste ainsi tout au long de la maladie. Il est clair qu'EBV, du fait qu'il est oncogénique, permet de maintenir son génome dans la cellule infectée sans la tuer tout en la protégeant des attaques du système immunitaire (THOMPSON et KURZROCK, 2004), ceci pourrait expliquer les constatations faites par AKIBA *et al* en 2008 et par FUKAYAMA en 2010 concernant le pronostic relativement favorable du cancer gastrique EBV positif par rapport au cancer gastrique EBV négatif.

Conformément au résultat de la présente étude, différents travaux sont en faveur d'un rôle étiologique de l'EBV, ces études suggèrent que le virus infecte précocement les cellules épithéliales gastriques permettant une meilleure prolifération, suggérant un rôle du virus dans la carcinogenèse (CORVALAN *et al*, 2006 ; KIM *et al*, 2010). Du moment que la LMP-1 est précocement exprimée chez les patients atteints du cancer gastrique, cette protéine pourrait très probablement servir comme bio-marqueur pour le diagnostic précoce des cancers gastriques EBV positifs.



Conclusion

Conclusion

Ce travail nous a permis de comparer les protéinogrammes des patients atteints de cancer gastrique avec ceux d'individus sains. Les protéinogrammes obtenus sont, d'une manière générale, très similaires et ils présentent une allure conforme aux tracés dits normaux. Les seules modifications qui suscitent de l'intérêt sont les hypo-protéïnémies qui peuvent être causées par l'augmentation des pertes protéiques par fuites digestives causées par les saignements gastriques ou encore par les pertes de poids constatées chez les individus présentant un cancer gastrique. La diminution en albumine peut également être observée lors de processus inflammatoire et aussi causée par l'augmentation des pertes de cette protéine lors de saignements digestifs.

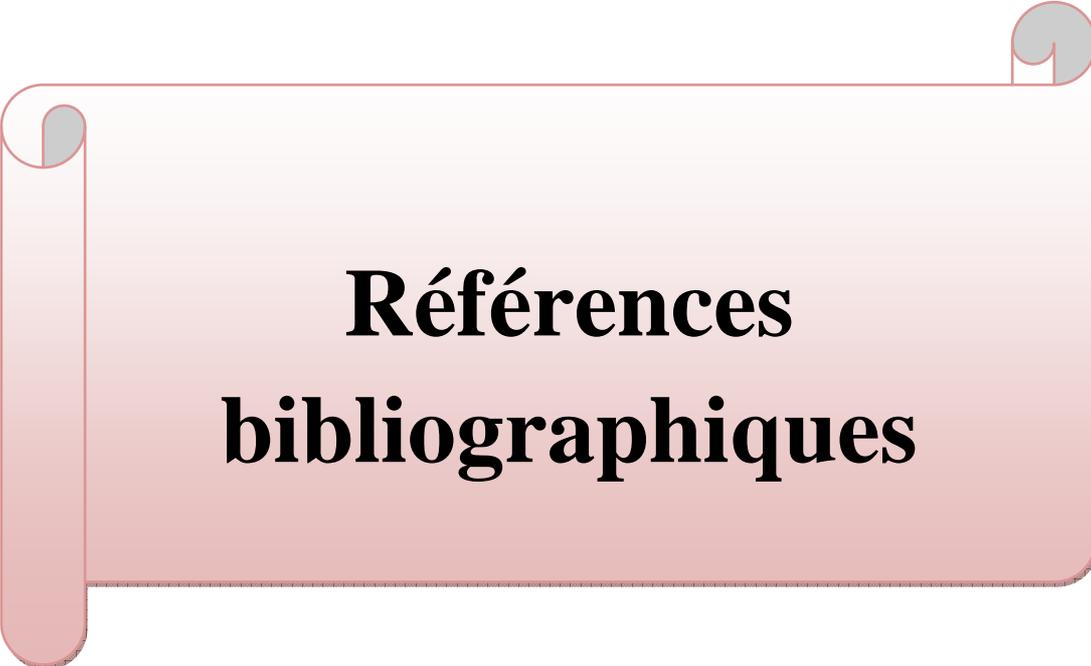
Les investigations précédentes qui se sont portées sur l'étude du sérum ont montré la difficulté à identifier les différentes protéines sériques et mettre en évidence un protéome caractéristique d'une pathologie. Comme nous l'avons déjà mentionné, cette difficulté résulte d'une part de la grande diversité des protéines présentes dans le sérum en plus des variabilités génétiques que peuvent présenter ces dernières. De plus, la teneur en protéines sériques est dominée par un groupe de protéines telles que l'albumine, la transferrine, l'haptoglobine, les immunoglobulines et des lipoprotéines. La comparaison des profils protéiques des patients atteints de cancer gastrique avec ceux des individus sains nous a permis de mettre en évidence la présence d'une bande supplémentaire entre 28 et 25 kDa chez les sujets malades, qui n'existe pas dans les profils protéiques des individus sains. Cependant, il est difficile d'associer cette bande protéique au cancer gastrique surtout que cette dernière n'est présente que chez 20% des cas. De même que pour la protéine de 18 kDa qu'on retrouve chez 65% des individus malades contre 43% de cas chez les individus sains.

La détection de l'expression de la protéine LMP-1 dans les biopsies gastriques et aussi dans les sérums des patients atteints de cancer gastrique nous permet d'associer le cancer gastrique à l'EBV, d'autant plus qu'il y a absence d'expression de LMP-1 dans les sérums des individus sains. L'expression de LMP-1 sans distinction de l'âge du patient ni du stade d'avancement du cancer gastrique pourrait présenter une alternative pour le diagnostic. Ainsi, LMP-1 semble être un candidat potentiel pour un diagnostic précoce et fiable des cancers gastriques EBV positifs. De plus, la détection de LMP-1 dans les sérums des individus malades offre un outil à la fois simple au vue de la technique utilisée, et surtout non contraignante pour le patient souvent soumis à des prélèvements de biopsies.

En perspectives de ce travail, il serait intéressant :

- D'étudier l'expression de LMP1 sur un nombre de patients beaucoup plus important ;
- De voir quelles sont les voies de signalisation contrôlées positivement ou négativement par LMP1 ;

- D'étudier les protéomes sériques avec des techniques qui permettront la réduction de la complexité de l'échantillon de sérum, dans le but d'appauvrir le niveau de protéines abondantes afin d'identifier la nature des protéines qui présentent des différences d'expression entre les sujets malades et les sains ;
- D'évaluer le rôle étiologique de l'EBV dans l'installation du cancer gastrique et son rôle dans la carcinogenèse, mais aussi arriver à comprendre et cerner la carcinogenèse des cancers gastriques EBV négatifs.



Références bibliographiques

Les références bibliographiques

ADKINS J.N, VARNUM S.M, AUBERRY K.J, MOORE R.J, ANGELL N.H, SMITH R.D, SPRINGER D.L POUNDS J.G. (2002). Toward a human blood serum proteome: analysis by multidimensional separation coupled with mass spectrometry. *Molecular Cellular Proteomics*, **1**, 947–955.

AHSAN N et KANDA T. (2005). Epstein-Barr virus transforming protein LMP1 plays a critical role in virus production. *Journal of Virology*, **79**(7), 4415-4424.

AKIBA S, KORIYAMA C, HERRERA-GOEPFERT R et EIZURU Y. (2008). Epstein-Barr virus associated gastric carcinoma: epidemiological and clinicopathological features. *Cancer Science*, **99**, 195–201.

ALLUM W.A. (2011). Tumours of the stomach. *Surgery*, **29**(11), 575-580.

ANCELLE T. (2008). Statistique Epidémiologie. MALOINE, 2^{ème} Ed, Paris.

APARICIO T, YACOB M, KARILA-COHEN P et RENÉ E. (2004). Adénocarcinome gastrique : notions fondamentales, diagnostic et traitement. *EMC-Chirurgie*, **1**, 47–66.

ARDEKANI A.M, LIOTTA L.A et PETRICOIN E.F. (2002). Clinical potential of proteomics in the diagnosis of ovarian cancer. *Molecular Diagnostics*, **2**, 312–320.

AUFWEBER E, JORUP-RONSTROM C, EDNER A et HANSSON LO. (1991). C-reactive protein sufficient as screening test in bacterial vs. viral infections. *Journal of Infection*, **23**, 216–220.

BAJAJ B.G, MURAKAMI M, CAI Q, VERMA S.C, LAN K et ROBERTSON E.S. (2008). Epstein-Barr virus nuclear antigen 3C interacts with and enhances the stability of the c-Myc oncoprotein. *Journal of Virology*, **82**(8), 4082-4090.

BALASSIANO K, LIM S, JENAB M, OVERVAD K, TJONNELAND A, BOUTRON-ROUAULT M.C, F CLAVEL-CHAPELON F et CANZIAN F. (2011). Aberrant DNA methylation of cancer-associated genes in gastric cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Cancer Letters*, **311**, 85–95.

BARBER M.R, FITZGERALD C et CALDAS C. (2006). Familial gastric cancer aetiology and pathogenesis. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, **20**(4), 721-734.

BARNUM S.R, FEY G et TACK B.F. (1990). Biosynthesis and genetics of C3. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, **153**, 23–43.

BARTH S, PFUHL T, MAMIANI A, EHSES C, ROEMER K, KREMMER E, JAKER C, HOCK J, MEISTER G et GRASSER F.A. (2008). Epstein-Barr virus-encoded microRNA miR-BART2 down-regulates the viral DNA polymerase BALF5. *Nucleic Acids Research*, **36**, 666-675.

BARUA R.R, UOZAKI H et CHONG J.M. (2006). Phenotype analysis by MUC2, MUC5AC, MUC6, and CD10 expression in Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma. *Journal of Gastroenterology*, **41**, 733–739.

BEALES IL et CALAM J. (1998). Interleukin 1 beta and tumour necrosis factor alpha inhibit add secretion in cultured rabbit parietal cells by multiple pathways. *Gut*, **42**, 227-234.

BEHREINS P.O, SPIEKERMAN A.N et BROWN J.R. (1975). Structure of human serum albumin. *Federation Proceedings Research*, **34**, 591.

BEGHELLI S, DE MANZONI G, BARBI S, TOMEZZOLLI A, ROVILLO F et DI GREGORIO C. (2006). Microsatellite instability in gastric cancer is associated with better prognosis in only stage II cancers. *Surgery*, **139**, 347–356.

BELL A et RICKINSON A.B. (2003). Epstein-Barr virus, the TCL-1 oncogene and Burkitt's lymphoma. *Trends in Microbiology*, **11**(11), 495-497.

BELL A.I et K GROVES K. (2006). Analysis of Epstein-Barr virus latent gene expression in endemic Burkitt's lymphoma and nasopharyngeal carcinoma tumour cells by using quantitative real-time PCR assays. *Journal of General Virology*, **87**(10), 2885-2890.

BEVILACQUA M.P, AMRANI D, MOSESSON M.W et BIANCO C. (1981). Receptors for cold-insoluble globulin (plasma fibronectin) on human monocytes. *Journal of Experimental Medicine*, **153**, 42–60.

BJELAKOVIC G, NIKOLOVA D et SIMONETTI RG. (2004). Antioxidant supplements for prevention of gastrointestinal cancers: a systematic review and meta-analysis. *Lancet*, **364**, 1219-1228.

BLASER MJ. (1995). Infection with *Helicobacter pylori* strains possessing *cagA* is associated with an increased risk of developing adenocarcinoma of the stomach. *Cancer Research*, **55**, 2111-2115.

BORZA C.M et HUTT-FLETCHER L.M. (2002). Alternate replication in B cells and epithelial cells switches tropism of Epstein-Barr virus. *Nature Medicine*, **8**(6), 594-599.

BROWN J, HARDING S, BETHUNE A et ROSATO M. (1998). Longitudinal study of socio-economic differences in the incidence of stomach, colorectal and pancreatic cancers. *Population Trends*, **94**, 35–41.

BUCK M, BURGESS A, STIRZAKER R, KRAUER K et SCULLEY T. (2006). Epstein-Barr virus nuclear antigen 3A contains six nuclear-localization signals. *Journal of General Virology*, **87**(10), 2879-2884.

BULTEMA R et LONGNECKER R. (2009). Epstein-Barr virus LMP2A accelerates MYC-induced lymphomagenesis. *Oncogene*, **28**(11), 1471-1476.

BURGESS A, BUCK M, KRAUER K et SCULLEY T. (2006). Nuclear localization of the Epstein-Barr virus EBNA3B protein. *Journal of General Virology*, **87** (4), 789-793.

BURKE A.P, YEN T.S, SHEKITKA K.M et SOBIN L. (1990). Lymphoepithelial carcinoma of the stomach with Epstein– Barr virus demonstrated by polymerase chain reaction. *Mod. Path*, **3**, 370-380.

BURTIS C. A et ASHWOOD E.R. (2001). Fundamentals of Clinical Chemistry. W. B. Saunders Company, 5th Ed, Philadelphia.

CAMARGO M.C, MURPHY G, KORIYAMA C, PFEIFFER R.M, KIMW.H, HERRERA–GOEPFERT R, CORVALAN A.H, CARRASCAL E, ABDIRAD A, ANWAR M, HAO Z, KATTOOR J, YOSHIWARA–WAKABAYASHI E, EIZURU Y, RABKIN C.S et AKIBA S.(2011). Determinants of Epstein–Barr virus–positive gastric cancer: An international pooled analysis. *British Journal of Cancer*, **105**, 38–43.

CANAAN A, HAVIV I, URBAN A.E, SCHULZ V.P, HARTMAN S, ZHANG Z, PALEJEV D, DEISSEROTH A.B, LACY J, SNYDER M, GERSTEIN M, et WEISSMAN S.M. (2009). EBNA1 regulates cellular gene expression by binding cellular promoters. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **106**, 22421-22426.

CARNEIRO P, FERNANDES M.S, FIGUEIREDO J , CALDEIRA J, CARVALHO J, PINHEIRO H, LEITE M et MELO S. (2012). E-cadherin dysfunction in gastric cancer - Cellular consequences, clinical applications and open questions. *FEBS Letters*, **586**, 2981-2989.

CATALANO V, LABIANCA R, BERETTA G.D, GATTA G, BRAUD F et VAN CUTSEM E. (2005). Gastric cancer. *Oncology/Hematology*, **54**, 209–241.

CHEN A, DIVISCONTE M, JIANG X, QUINK C et WANG F. (2005). Epstein-Barr virus with the latent infection nuclear antigen 3B completely deleted is still competent for B-cell growth transformation in vitro. *Journal of Virology*, **79**(7), 4506-4509.

CHEN C, LI D et GUO N. (2009). Regulation of cellular and viral protein expression by the Epstein-Barr virus transcriptional regulator Zta: implications for therapy of EBV associated tumors. *Cancer Biology and Therapy*, **8**(11), 987-995.

CHESNOKOVA L.S, NISHIMURA S.L et HUTT–FLETCHER L.M. (2009). Fusion of epithelial cells by epstein–barr virus proteins is triggered by binding of viral glycoproteins ghgl to integrins alphavbeta6 or alphavbeta8. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **106**, 20464–20469.

CHOI M.G, NOH J.H, AN J.Y, HONG S.K, PARK S.B, BAIK Y.H, KIM K.M, SOHN T.S et KIM S. (2009). Expression Levels of Cyclin G2, But Not Cyclin E, Correlate With Gastric Cancer Progression. *Journal of Surgical Research*, **157**, 168–174.

CHOI J.S, SEO J, JUNG E.J, KIM E.J, LEE G.K et KIM W.H. (2012). C-MYC amplification in mucinous gastric carcinoma: a possible genetic alteration leading to deeply invasive tumors. *Anticancer Research*, **32**(11), 5031-5037.

CHONG J.M, Sakuma K et Sudo M. (2002). Interleukin-1beta expression in human gastric carcinoma with Epstein-Barr virus infection. *Journal of Virology*, **76**, 6825–6831.

CHOY E.Y, SIU K.L, KOK K.H, LUNG R.W, TSANG C.M, TO K.F, KWONG D.L, TSAO S.W, JIN D.Y. (2008). An Epstein-Barr virus-encoded microRNA targets PUMA to promote host cell survival. *Journal of Experimental Medicine*, **205**(11), 2551-2560.

CHUN A.O. (2006). E-cadherin in gastric cancer. *World Journal of Gastroenterology*, **12**, 199–203.

CHYOU PH. (1990). A case-cohort study of diet and stomach cancer. *Cancer Research*, **50**, 7501-7504.

CORREA P. (1992). Human gastric carcinogenesis: a multistep and multifactorial process: First American cancer society award lecture on cancer epidemiology and prevention. *Cancer Research*, **52**, 6735–6740.

CORSO G, VELHO S , PAREDES J, PEDRAZZANI C, MARTINS D, MILANEZI F, PASCALE V , VINDIGNI C, PINHEIRO H , LEITE M, MARRELLI D, SOUSA S, CARNEIRO F, OLIVEIRA C, ROVIELLO F et SERUCA R. (2011). Oncogenic mutations in gastric cancer with microsatellite instability. *European Journal of Cancer*, **47**,443-451.

CORSO G, SERUCA R et ROVIELLO F. (2012). Gastric cancer carcinogenesis and tumor progression. *Annali Italiani di Chirurgia*, **83**(3), 172-176.

CORVALAN A, DING S et KORIYAMA C. (2006). Association of a distinctive strain of Epstein-Barr virus with gastric cancer. *International Journal of Cancer*,**118**, 1736-1742.

D’ELIA L, ROSSI G, IPPOLITO R, CAPPUCCIO F.P et STRAZZULLO P. (2012). Habitual salt intake and risk of gastric cancer: A meta-analysis of prospective studies. *Clinical Nutrition*, **31**, 489-498.

DAGNELIE P. (2011). Statistique Théorique et Appliquée : 2- inférence statistique à une et à deux dimensions. De boeck, 3^{ème} Ed, Paris.

DANIELS J.C. (1975). Carrier Protein Abnormalities; in: “Serum Protein Abnormalities, Diagnostic and Clinical Aspects”. Little, Brown & Co, Boston.

DAVISON A.J. (2010). Herpesvirus systematic. *Veterinary Microbiology*, **143**, 52–69.

DAWSON C.W, PORT R.J et YOUNG L.S. (2012). The role of the EBV-encoded latent membrane proteins LMP1 and LMP2 in the pathogenesis of nasopharyngeal carcinoma (NPC). *Seminars in Cancer Biology*, **22**, 144– 153

DE MARTEL C, FORMAN D et PLUMMER M. (2013). Gastric Cancer: Epidemiology and Risk Factors. *Gastroenterology Clinics of North America*, **42**(2), 219–240.

DESAI N et RODRIGUES C. (2013). Serology of herpes viruses. *Pediatric Infectious Disease*, **5**, 35-37.

DILLENSEGER J.P. (2011). Atlas D'anatomie Générale et Radiologique. ELSEVIER / MASSON, Paris.

DRAKE IM, DAVIES MJ, MAPSTONE NP, DIXON MF, SCHORAH CJ et WHITE KL. (1996). Ascorbic acid may protect against human gastric cancer by scavenging mucosal oxygen radicals. *Carcinogenesis*, **17**, 559–562.

DURBIN D.M. et JONAS A. (1997). The effect of apolipoprotein A-II on the structure and function of apolipoprotein A-I in a homogeneous reconstituted high density lipoprotein particle. *Journal of Biological Chemistry*, **272**, 31333-31339.

EBERT, M.P. (2002). Increased beta-catenin mRNA levels and mutational alterations of the APC and beta-catenin gene are present in intestinal-type gastric cancer. *Carcinogenesis*, **23**, 87– 91.

ECKER D. J, SAMPATH R, WILLETT P, WYATT J.R, SAMANT V, MASSIRE C, HALL T.A, HARI K, MCNEIL J.A, BUCHEN-OSMOND C et BUDOWLE B. (2005). The Microbial Rosetta Stone Database: a compilation of global and emerging infectious microorganisms and bioterrorist threat agents. *BMC Microbiology*, **5**, 19.

EDWARDS R.H, SITKI-GREEN D, MOORE D.T, et RAAB-TRAUB N. (2004). Potential selection of LMP1 variants in nasopharyngeal carcinoma. *Journal of Virology*, **78**, 868-881.

EDWARDS R.H, MARQUITZ A.R, et RAAB-TRAUB N. (2008). Epstein-Barr virus BART microRNAs are produced from a large intron prior to splicing. *Journal of Virology*, **82**, 9094-9106.

EKSTROM AM, HELD M et HANSSON LE. (2001). Helicobacter pylori in gastric cancer established by CagA immunoblot as a marker of past infection. *Gastroenterology*, **121**, 784-791.

EL-OMAR E.M, CARRINGTON M et CHOW W.H. (2000). Interleukin-1 polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer. *Nature*, **404**, 398–402.

ESLICK GD, LIM LL, BYLES JE, XIA HH et TALLEY NJ. (1999). Association of *Helicobacter pylori* infection with gastric carcinoma: a meta-analysis. *American Journal of Gastroenterology*, **94**, 2373–2379.

ETO K, OHYAMA S, YAMAGUCHI T, WADA T, SUZUKI Y, MITSUMORI N, KASHIWAGI H, ANAZAWA S, YANAGA K et URASHIMA M. (2006). Familial clustering in subgroups of gastric cancer stratified by histology, age group and location. *Journal of Cancer Surgery*, **32**, 743-748.

FARAJI EI et FRANK BB. (2002). Multifocal atrophic gastritis and gastric carcinoma. *Gastroenterology Clinics*, **31**(2), 499-516.

FERLAY J, SHIN HR, BRAY F, FORMAN D, MATHERS C et PARKIN DM. (2012). Cancer Incidence and Mortality Worldwide. *IARC Cancer Base* No. 10.

FITZGERALD R.C et CALDAS C. (2004). Clinical implications of E-cadherin associated hereditary diffuse gastric cancer. *Gut*, **53**, 775-778.

FORTE E et LUFTIG M.A. (2011). The role of microRNAs in Epstein-Barr virus latency and lytic reactivation. *Microbes and Infection*, **87**, 155-160.

FRAZER J.K et CAPRA J.D. (1999). Immunoglobulins: structure and function; in: "Fundamental Immunology". Lippincott-Raven, Philadelphia.

FUKAYAMA M. (2010). Epstein-Barr virus associated gastric carcinoma. *Pathology International*, **60**, 337–350.

FUKAYAMA M et USHIKU T. (2011). Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma. *Pathology – Research and Practice*, **207**, 529– 537.

FUKAYAMA M, HAYASHI Y et IWASAKI Y. (1994). Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma and Epstein-Barr virus infection of the stomach. *Laboratory Investigation*, **71**, 73–81.

FUKUDA M et LONGNECKER R. (2007). Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A mediates transformation through constitutive activation of the Ras/PI3-K/Akt Pathway. *Journal of Virology*, **81**(17), 9299-9306.

FUNG Y.S, SUN D.X et YEUNG C.Y. (2000). Capillary electrophoresis for determination of free and albumin-bound bilirubin and the investigation of drug interaction with bilirubin-bound albumin. *Electrophoresis*, **21**, 403–410.

GALVAN-PORTILLO M. V, ONˆATE-OCANˆ A L. F, PEˆREZ-PEˆREZ G. I, CHEN J, HERRERA-GOEPFERT R, CHIHU-AMPARAN L, FLORES-LUNA L, MOHAR-BETANCOURT A et LOˆPEZ-CARRILLO L. (2010). Dietary folate and vitamin B12 intake before diagnosis decreases gastric cancer mortality risk among susceptible MTHFR 677TT carriers. *Nutrition*, **26**, 201-208.

GAO Y, HUA N, HAN X. Y, DING T, GIFFEN C, GOLDSTEIN A.M et TAYLOR P.R. (2011). Risk factors for esophageal and gastric cancers in Shanxi Province, China: A case–control study. *Cancer Epidemiology*, **35**, e91–e99.

GONZALEZ CA, PERA G et AGUDO A. (2003). Smoking and the risk of gastric cancer in the European prospective investigation into cancer and nutrition (EPIC). *International Journal of Cancer*, **107**, 629–634.

GRAZIANO F, HUMAR B et GUILFORD P. (2003). The role of E-cadherin gene (CDH1) in diffuse gastric cancer susceptibility: from the laboratory to clinical practice. *Annals Oncology*, **14**, 1705–1713.

GRULICH A.E et VAJDIC C.M. (2005). The epidemiology of non-Hodgkin lymphoma. *Pathology*, **37**(6), 409-419.

HADINOTO V, SHAPIRO M, GREENOUGH T.C, SULLIVAN J.L, LUZURIAGA K et THORLEY-LAWSON D.A. (2008). On the dynamics of acute EBV infection and the pathogenesis of infectious mononucleosis. *Blood*, **111**, 1420-1427.

HADINOTO V, SHAPIRO M, SUN C.C et THORLEY-LAWSON D.A. (2009). The dynamics of EBV shedding implicate a central role for epithelial cells in amplifying viral output. *PLOS Pathogens*, **5**(7), e1000496.

HAENSZEL W, KURIHARA M, SEGI M et LEE RK. (1972). Stomach cancer among Japanese in Hawaii. *Journal of National Cancer Institute*, **49**, 969–988.

HAMILTON J.A et BENSON M.D. (2001). Transthyretin: a review from a structural perspective. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **58**, 1491–1521.

HAYASHI K, Teramoto N, Akagi T, Sasaki Y et Suzuki T. (1996). In situ detection of Epstein-Barr virus in the gastric glands with intestinal metaplasia. *American Journal of Gastroenterology*, **91**, 1481.

HAYASHI T, HORIUCHI A, SANO K, HIRAOKA N, KASAI M, ICHIMURA T, SUDO T, NISHIMURA R, ISHIKO O, SHIOZAWA T, KANAI Y, YAEGASHI N, ABURATANI H, KONISHI I. (2012). Potential role of LMP2 as an anti-oncogenic factor in human uterine leiomyosarcoma: Morphological significance of calponin h1. *FEBS Letters*, **586**, 1824–1831.

HE M.L, LUO M.X, MARIE C. LIN M.C et KUNG H.F. (2012). MicroRNAs: Potential diagnostic markers and therapeutic targets for EBV-associated nasopharyngeal carcinoma. *Biochimica and Biophysica Acta*, **1825**, 1–10.

HEBNER C, LASANEN J, BATTLE S, AIYAR A. (2003). The spacing between adjacent binding sites in the family of repeats affects the functions of Epstein-Barr nuclear antigen 1 in transcription activation and stable plasmid maintenance. *Journal of Virology*, **311**, 263-274.

HENNEQUIN C, QUERO L et MINEUR L. (2008). Cancer de l'estomac : doses et volumes-cibles. *Cancer/Radiothérapie*, **12**, 659–662.

HOCHBERG D.T, SOUZA M, CATALINA J.L, SULLIVAN K, LUZURIAGA M et THORLEY-LAWSON D.A. (2004). Acute infection with Epstein-Barr virus targets and overwhelms the peripheral memory B-cell compartment with resting, latently infected cells. *Journal of Virology*, **78**(5), 194-204.

HOUALI K, WANG X, SHIMIZU Y, DJENNAOUI D, NICHOLLS J, FIORINI S, BOUGUERMOUH A et OOKA T. (2007). A new diagnostic marker for secreted Epstein-Barr Virus-encoded LMP1 and oncoproteins in the serum and saliva of patients with nasopharyngeal carcinoma. *Clinical Cancer Research*, **13** (17), 4993-5000.

IIZASA H, NANBO A, NISHIKAWA J, JINUSHI M et YOSHIYAMA H.(2012). Epstein-Barr Virus (EBV)-associated Gastric Carcinoma. *Viruses*, **4**, 3420-3439.

IMAI S, NISHIKAWA J et TAKADA K. (1998). Cell-to-cell contact as an efficient mode of Epstein-Barr virus infection of diverse human epithelial cells. *J. Virol*, **72**, 4371–4378.

IMAI S, KURODA M, YAMASHITA R ISHIURA Y. (2005). Therapeutic inhibition of Epstein-Barr virus-associated tumor cell growth by dominant-negative EBNA1. *Uirusu*, **55**, 239-249.

IMAI K, INOUE H, TAMURA M, CUENO M.E, INOUE H, TAKEICHI O, KUSAMA K, SAITO I et OCHIAI K. (2012). The periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis* induces the Epstein-Barr virus lytic switch transactivator ZEBRA by histone modification. *Biochimie*, **94**, 839-846.

ISOBE Y, SUGIMOTO K, TAMAYOSE K, EGASHIRA M, KANEKO T, TAKADA K et OSHIMI K. (2004). Epstein-Barr virus infection of human natural killer cell lines and peripheral blood natural killer cells. *Cancer Research*, **64**(15), 2167-2174.

JEMAL A, BRAY F, CENTER MM, FERLAY J, WARD E et FORMAN D. (2011). Global Cancer Statistics. *Cancer Journal for Clinicians*, **61**, 69–90.

JOAQUIN M. RODRÍGUEZ SANTIAGO, MITSURU SASAKO et JAVIER OSORIOA. (2011). TNM-7th edition 2009 (UICC/AJCC) and Japanese Classification 2010 in Gastric Cancer. Towards simplicity and standardisation in the management of gastric cancer. *Cirugia Espanola*, **89**(5), 275–281.

JOHANNSEN E, LUFTIG M, CHASE M.R, WEICKSEL S, CAHIR-MCFARLAND E, ILLANES D, SARRACINO et D KIEFF E. (2004). Proteins of purified Epstein-Barr virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **101**, 16286-16291.

JOHN R.P, ANTHONY O.O, AMIN M et DEBORAH A.P. (2003). Capillary electrophoresis and its application in the clinical laboratory. *Clinica Chimica Acta*, **330**, 1 -30.
JOHNSON A.M, ROHLFS E.M et SILVERMAN L.M. (1999). Proteins ; in : “Textbook of Clinical Chemistry”, WB Saunders, Philadelphia.

JUNKER A.K. (2005). Epstein-Barr virus. *Pediatrics Rev*, **2**-(3), 79-84.

KAMBOH M.I et FERRELL R.E. (1987). Human transferrin polymorphism. *Human Heredity*, **37**, 65–81.

KANDA Y, GOODMAN D.S, CANFIELD R.E et MORGAN F.J. (1974). The amino acid sequence of human plasma prealbumin. *Journal of Biological Chemistry*, **249**, 6796–6805.

KANEDA A, MATSUSAKA K, ABURATANI H et FUKAYAMA M. (2012). Epstein–Barr virus infection as an epigenetic driver of tumorigenesis. *Cancer Research*, **72**, 3445–50.

KASHUBA E, MATTSSON K, KLEIN G et SZEKELY L. (2003). p14ARF induces the relocation of HDM2 and p53 to extranucleolar sites that are targeted by PML bodies and proteasomes. *Molecular Cancer*, **2**, 18.

KASVOSVE I, DELANGHE J.R et GOMO Z.A. (2000). Transferrin polymorphism influences iron status in blacks. *Clinical Chemistry*, **46**, 1535–1539.

KELLY G.L, BELL A et RICKINSON A. (2002). Epstein-Barr virus-associated Burkitt lymphomagenesis selects for downregulation of the nuclear antigen EBNA2. *Nature Medicine*, **8**, 1098-1104.

KELLY G.L, MILNER A.E, BALDWIN G.S, BELL A.I et RICKINSON A.B. (2006). Three restricted forms of Epstein-Barr virus latency counteracting apoptosis in c-myc-expressing Burkitt lymphoma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **103**, 14935-14940.

KENNEDY G, KOMANO J et SUGDEN B. (2003). Epstein-Barr virus provides a survival factor to Burkitt's lymphomas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **100**(24), 14269-14274.

KEREN D.F. (2003). Protein Electrophoresis in Clinical Diagnosis. HODDER ARNOLD, first Ed, Euston Road, London.

KHAN H, SALMAN K.A et AHMED S. (2002). Alpha-1 antitrypsin deficiency in emphysema. *Journal of Association of Physicians India*, **50**, 579–582.

KIDDY D. S et HAMILTON D. (1999). Diet induced changes in sex hormone binding globulin and free testosterone in women with normal or polycystic ovaries: Correlation with serum insulin and insulin-like growth factor-1. *Clinical Endocrinology*, **31**, 757-764.

KIM S.W, SHIN HC et KIM IY. (2010). Epstein-Barr virus-associated lymphoepithelioma-like gastric carcinoma presenting as a submucosal mass: CT findings with pathologic correlation. *Korean Journal of Radiology*, **11**, 697-700.

KIM S. S, RUIZ V. E, CARROLL J.D et MOSS S.F. (2011). Helicobacter pylori in the pathogenesis of gastric cancer and gastric lymphoma. *Cancer Letters*, **305**, 228–238.

KLAPPROTH, K, SANDER S, MARINKOVIC D, BAUMANN B et WIRTH T. (2009). The IKK2/NF- κ B pathway suppresses MYC-induced lymphomagenesis. *Blood*, **114**, 2448-2458.

KLEIN E et NAGY N. (2010). Restricted expression of EBV encoded proteins in vitro infected CLL cells. *Seminars in Cancer Biology*, **20**, 410–415.

KLEIN G, KLEIN E et KASHUBA E (2010). Interaction of Epstein-Barr virus (EBV) with human B-lymphocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **396**, 67–73.

KODAMA M, KODAMA T, SUZUKI H et KONDO K. (1984). Effect of rice and salty rice diets on the structure of mouse stomach. *Nutrition and Cancer*, **6**, 135–147.

KUZUSHIMA K, NAKAMURA S et NAKAMURA T. (1999). Increased frequency of antigen-specific CD8(+) cytotoxic T lymphocytes infiltrating an Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma. *Journal of Clinical Investigation*, **104**, 163–171.

LAEMMLI U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature*, **227**, 680-684.

LAFONTAN M. et BERLAN M. (2003). Issue regional differences in adipocyte biology provide new pathophysiological insights. *Trends in pharmacological Sciences*, **24**, 276-283.

LANGLOIS M.R et DELANGHE J.R. (1996). Biological and clinical significance of haptoglobin polymorphism in humans. *Clinical Chemistry*, **42**, 1589–1600.

LEE J.H. (2002). Inverse relationship between APC gene mutation in gastric adenomas and development of adenocarcinoma. *American Journal of Pathology*, **161**, 611–618.

LEE J.H, KIM S.H, HAN S.H, AN J.S, LEE E.S et KIM Y.S. (2009). Clinicopathological and molecular characteristics of Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma: a meta-analysis. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, **24**, 354–365.

LILJA H, COCKETT A.T et ABRAHAMSSON P.A. (1992). Prostate specific antigen predominantly forms a complex with alpha 1-antichymotrypsin in blood. Implications for procedures to measure prostate specific antigen in serum. *Cancer*, **70**, 230–234.

LIN J et JOHANNSEN E. (2002). Epstein-Barr virus nuclear antigen 3C putative repression domain mediates coactivation of the LMP1 promoter with EBNA-2. *Journal of Virology*, **76**(1), 232-242.

LING P.D, PENG R.S, NAKAJIMA A, YU J.H, TAN J, MOSES S.M, YANG W.H, ZHAO B, KIEFF E, BLOCH K.D et BLOCH D.B. (2005). Mediation of Epstein-Barr virus EBNA-LP transcriptional coactivation by Sp100. *Journal of European Molecular Biology*, **24**, 3565-3575.

LIU C.D, CHENG C.P, FANG J.S, CHEN L.C, ZHAO B, KIEFF E et PENG C.W. (2013). Modulation of Epstein-Barr Virus Nuclear Antigen 2-dependent transcription by protein arginine methyltransferase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **430**, 1097–1102.

LO A.K, TO K.F, LO K.W, LUNG R.W, HUI J.W, LIAO G et HAYWARD S.D. (2007). Modulation of LMP1 protein expression by EBV-encoded microRNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **104**(41), 16164-16169.

LOCHHEAD P et EL- OMAR E. M. (2007). Helicobacter pylori infection and gastric cancer. *Best Practice and Research Clinical Gastroenterology*, **21**(2), 281-297.

LONGNECKER R. (2000). Epstein-Barr virus latency: LMP2, a regulator or means for Epstein-Barr virus persistence? *Cancer Research*, **79**, 175-200.

LONGNECKER R et NEIPEL F. (2007). Introduction to the human γ -herpesviruses; in: “Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis”. Cambridge University Press. Cambridge.

LOUGHREY M, TRIVETT M, LAD S, MURRAY W, TURNER H et WARING P. (2004). Diagnostic application of Epstein-Barr virus-encoded RNA in situ hybridization. *Pathology*, **36**(4), 301-308.

LUNG R.W, TONG J.H, SUNG Y.M, LEUNG P.S, NG D.C, CHAU S.L, CHAN A.W, NG E.K, LO K.W et TO K.F. (2009). Modulation of LMP2A expression by a newly identified Epstein-Barr virus-encoded microRNA miR-BART22. *Neoplasia*, **11**, 1174-1184.

MACHIDA-MONTANI A, SASAZUKI S et INOUE M. (2004). Association of *Helicobacter pylori* infection and environmental factors in non-cardiac gastric cancer in Japan. *Gastric Cancer*, **7**(1), 46-53.

MACSWEEN K et CRAWFORD D.H. (2003). Epstein-Barr virus-recent advances. *Lancet Infectious Diseases*, **3**(3), 131-40.

MAEDA E, AKAHANE M, UOZAKI H, KATO N, HAYASHI N, FUKAYAMA M et OHTOMO K. (2009). CT appearance of Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma. *Abdominal Imaging*, **34**, 618–625.

MANCAO C et HAMMERSCHMIDT W. (2007). Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A is a B-cell receptor mimic and essential for B-cell survival. *Blood*, **110**(10), 3715-3721.

MARQUITZ A.R et RAAB-TRAUB N. (2012). The role of miRNAs and EBV BARTs in NPC. *Seminars in Cancer Biology*, **22**, 166– 172.

MEIJ P, VERVOORT M.B, MEIJER L.M, BLOEMENA E et MIDDELDROP J.M (2000). Production monitoring and purification of EBV encoded latent membrane protein 1 expressed and secreted by recombinant baculovirus infected insect cells. *Journal of Virology Methods*, **90**, 193- 204.

MENDLER M.H, CORBINAIS S et SAPEY T. (1999). In patients with cirrhosis, serum albumin determination should be carried out by immunonephelometry rather than by protein electrophoresis. *European Journal of Gastroenterology and Hepatology*, **11**, 1405–1411.

MIDDELDORP J.M, BRINK A.A, VAN DEN BRULE A.J et MEIJER C.J. (2003). Pathogenic roles for Epstein-Barr virus (EBV) gene products in EBV-associated proliferative disorders. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, **45**, 1-36.

MIEHLKE S, KIRSCH C, AGHA-AMIRI K, GUNTHER T, LEHN N, MALFERTHEINER P. (2000). The *Helicobacter pylori* vacA s1, m1 genotype and cagA is associated with gastric carcinoma in Germany. *International Journal of Cancer*, **87**, 322–327.

MIETTINEN A.K, HEINONEN P.K, LAIPPALA P et PAAVONEN J. (1993). Test performance of erythrocyte sedimentation rate and C-reactive protein in assessing the severity of acute pelvic inflammatory disease. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, **169**, 1143–1149.

MINEUR L, JAEGLEA E, POINTREAU Y, DENISC F. (2010). Cancer de l'estomac *Cancer/Radiothérapie*, **14**(1), S84–S93.

MITOMI H, FUKUI N, KISHIMOTO I, TANABE S, KIKUCHI S, SAITO T, HAYASHI T et YAO T. (2011). Role for p16^{INK4a} in progression of gastrointestinal stromal tumors of the stomach: alteration of p16^{INK4a} network members. *Human Pathology*, **42**(10), 1505-1513.

MORE H, HUMAN B, WEBER W, WARD R, CHRISTIAN A et LINTOTT C. (2007). Identification of seven novel germline mutations in the human E-cadherin (CDH1) gene. *Human Mutation*, **28**, 203–211.

MORRISON J. A et RAAB-TRAUB N. (2005). Roles of the ITAM and PY motifs of Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A in the inhibition of epithelial cell differentiation and activation of beta-catenin signaling. *J Virol*, **79**(4), 2375-2382.

MULLEN M.M, HAAN K.M, LONGNECKER R et JARDETZKY T.S. (2002). Structure of the Epstein-Barr virus gp42 protein bound to the MHC class II receptor HLA-DR1. *Molecular cell*, **9**, 375-385.

MULLER A.M.S, IHORST G, MERTELSMANN R, et ENGELHARDT M. (2005). Epidemiology of on-Hodgkin's lymphoma (NHL) : trends, geographic distribution and etiology. *Annals of Hematology*, **84**(1), 1-12.

MUROMOTO R, IKEDA O, OKABE K, TOGI S, KAMITANI S, FUJIMURO M, HARADA S, ORITANI K et MATSUDA T. (2009). Epstein–Barr virus-derived EBNA2 regulates STAT3 activation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **378**, 439–443

MURPHY G, PFEIFFER R, CAMARGO M.C et RABKIN C.S. (2009). Meta-analysis shows that prevalence of Epstein-Barr virus-positive gastric cancer differs based on sex and anatomic location. *Gastroenterology*, **137**, 824–833.

NAESS O, CLAUSSEN B et THELLE DS. (2005). Four indicators of socioeconomic position: relative ranking across causes of death. *Scandinavian Journal of Public Health*, **33**, 215-221.

NAUMAUN M et CRABTREE JE. (2004). Helicobacter pylori-induced epithelial cell signalling in gastric carcinogenesis. *Trends Microbiology*, **151**, 105-114.

NICOLAS J.C et SEIGNEURIN J.M. (2002). Herpesviridae : virus Epstein-Barr. *Virologie médicale*, **4**, 523-534.

NICOLAS J.C, MARCECHAL V et DEHEE A. (1997). Le virus Epstein-Barr. *Bulletin de L'Academie Nationale De Meecine*, **181**(6), 981-997.

NISHIKAWA J, SAITO M, KIYOTOKI S, HAMABE K, OKAMOTO T, YANAI H et SAKAIDA I. (2010). Epstein–Barr virus associated gastric carcinoma. *Biotherapy*, **24**, 429–434.

PANG M.F et LIN K.W. (2009). The signaling pathways of Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 2A (LMP2A) in latency and cancer. *Cellular and Molecular Biology Letters*, **14**(2), 222-247.

PAREDES J, FIGUEIREDO J, ALBERGARIA A, OLIVEIRA P, CARVALHO J, RIBEIRO A.S, CALDEIRA J, COSTA A.M, SIMOES-CORREIA J et OLIVEIRA M.J. (2012). Epithelial E- and P-cadherins: Role and clinical significance in cancer. *Biochimica and. Biophysica. Acta*, **1826**, 297–311.

PARK D.Y, YANG H.K, KIM T.Y et KIM Y.J. (2011). Identification of DNA methylation changes associated with human gastric cancer. *BMC Medical Genomics*, **4**, 82-96.

PARSONNET J. (1997). Risk for gastric cancer in people with CagA positive or CagA negative *Helicobacter pylori* infection. *Gut*, **40**, 297-301.

PEGTEL D.M et SUBRAMANIAN A. (2005). Epstein-Barr-virus-encoded LMP2A induces primary epithelial cell migration and invasion: possible role in nasopharyngeal carcinoma metastasis. *Journal of Virology*, **79**(24), 15430-15442.

PELETEIRO B, LOPES C, FIGUEIREDO C et LUNET N. (2011). Salt intake and gastric cancer risk according to *Helicobacter pylori* infection, smoking, tumour site and histological type. *British Journal of Cancer*, **104**, 198–207.

PENG R et MOSES S.C. (2005). The Epstein-Barr virus EBNA-LP protein preferentially coactivates EBNA2-mediated stimulation of latent membrane proteins expressed from the viral divergent promoter. *Journal of Virology*, **79**(7), 4492-4505.

PETERSEN C.M. (1993). Alpha 2-macroglobulin and pregnancy zone protein. Serum levels, alpha 2-macroglobulin receptors, cellular synthesis and aspects of function in relation to immunology. *Danish Medical Bulletin*, **40**, 409–446.

PETOSA C, MORAND P, BAUDIN F, MOULIN M, ARTERO J.B et MULLER C.W. (2006). Structural basis of lytic cycle activation by the Epstein-Barr virus ZEBRA protein. *Molecular Cell*, **21**(4), 565-572.

PETRICOIN E.F, ARDEKANI A.M, HITT B.A, LEVINE P.J, FUSARO V.A, STEINBERG S.M, MILLS G.B, SIMONE C, FISHMAN D.A, KOHN E.C et LIOTTA, L. A. (2002). Use of proteomic patterns in serum to identify ovarian cancer. *Lancet*, **359**, 572–577.

PFEFFER S, ZAVOLAN M et GRÄSSER F.A. (2004). Identification of virus-encoded microRNAs. *Science*, **304**(5671), 734-736.

PRATT G. (2002). Molecular aspects of multiple myeloma. *Molecular Pathology*, **55**, 273–283.

QU Y, DANG S et HOU P. (2013). Gene methylation in gastric cancer. *Clinica Chimica Acta*, **424**, 53–65.

RADHAKRISHNA S. TIRUMALAI K.C. CHAN D. A. PRIETO H.J. ISSAQ T.P et TIMOTHY D.V. (2003). Characterization of the Low Molecular Weight. Human Serum Proteome. *Molecular & Cellular Proteomics*, **2** (10), 1096–1103, 2003.

REIF S, JAIN A, SANTIAGO J et ROSSI T. (1991). Protein losing enteropathy as a manifestation of Henoch–Schonlein purpura. *Acta Paediatrica Scandinavica*, **80**, 482–485.

REISINGER J, RUMPLER S, LION T et AMBROS PF. (2006). Visualization of episomal and integrated Epstein-Barr virus DNA by fiber fluorescence in situ hybridization. *International Journal of Cancer*, **118**(7), 1603-1608.

RESENDE C, RISTIMÄKI A et MACHADO J. C. (2010). Genetic and epigenetic alteration in gastric carcinogenesis. *Helicobacter*, **1**, 34-39.

RIBOLI E et NORAT T. (2003). Epidemiologic evidence of the protective effect of fruit and vegetables on cancer risk. *American Journal of Clinical Nutrition*, **78**, 559S - 569S.

RICKINSON A.B et KIEFF E. (2001). Epstein-Barr Virus and its Replication; in : “Fields Virology”. Lippincott Williams and Wilkins, 4th Ed, Philadelphia.

RICKINSON A.B et KIEFF E. (2007). Fields Virology, Fields BN, Lippincott- Raven, 5th Ed, Philadelphia.

RITCHIE R.F, PALOMAKI G.E, NEVEUX L.M, NAVOLOTSKAIA O, LEDUE T.B et CRAIG W.Y. (2000). Reference distributions for the positive acute phase serum proteins, alpha1-acid glycoprotein (orosomuroid), alpha1-antitrypsin, and haptoglobin: a practical, simple, and clinically relevant approach in a large cohort. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, **14**, 284–292.

ROTH A.D. (2003). Curative treatment of gastric cancer: towards a multidisciplinary approach? *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, **46**, 59-100.

ROTHER R, LIGUORI L, VILLEGAS-MENDEZ A, MARQUES B, GRUNWALD D, DROUET E et LENORMAND J.L. (2010). Characterization of the cell-penetrating properties of the Epstein-Barr virus ZEBRA transactivator. *Journal of Biological Chemistry*, **285**(26), 20224-20233.

ROWE C.L, HISAE MATSUURA H, JARDETZKY T.S et LONGNECKER R. (2011). Investigation of the function of the putative self-association site of Epstein–Barr virus (EBV) glycoprotein 42 (gp42). *Journal of Virology*, **415**, 122–131.

ROWE C.L, CONNOLLY S.A, CHEN J, JARDETZKY T.S et LONGNECKER R. (2013). A soluble form of Epstein-Barr virus gH/gL inhibits EBV-induced membrane fusion and does not function in fusion. *Journal of Virology*, **436**, 118–126.

RYOICHI I, KATSUYOSHI S, ATSUSHI H, PAUL S, NOBUO K et DE-MAW C. (1996). Evidence that glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is involved in age-induced apoptosis in mature cerebellar neurons in culture. *Journal of Neurochemistry*, **66**, 928-935.

SAHA A, MURAKAMI M, KUMAR P, BAJAJ B, SIMS K et ROBERTSON E.S. (2009). Epstein-Barr virus nuclear antigen 3C augments Mdm2-mediated p53 ubiquitination and degradation by deubiquitinating Mdm2. *Journal of Virology*, **83**(9), 4652-4669.

SAIF M.W, MAKRILIA N, ZALONIS A, MERIKAS M et SYRIGOS K. (2010). Gastric cancer in the elderly. *European Journal of Surgical Oncology*, **36**, 709-717.

SAIKI Y, OTANI H, NAITO Y, MIYAZAWA M et NAGURA H. (1996). Immunophenotypic characterization of Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma: massive infiltration by proliferating CD8+ T-lymphocytes. *Laboratory Investigation*, **75**, 67–76.

SATO A.K, SEXTON D.J, MORGANELLI L.A, COHEN E.H, WU Q.L, CONLEY G.P, STRELTSOVA Z, LEE S.W, DEVLIN M, DEOLIVEIRA D.B, ENRIGHT J, KENT R.B, WESCOTT C.R, RANSOHOFF T.C, LEY A.C et LADNER R.C. (2002). Development of mammalian serum albumin affinity purification media by peptide phage display. *Biotechnology Progress*, **18**, 182–192.

SENOO H, STANG E, NILSSON A, KINDBERG G.M, BERG T, ROOS N, NORUM K.R et BLOMHOFF R. (1990). Internalization of retinol-binding protein in parenchymal and stellate cells of rat liver. *Journal of Lipid Research*, **31**, 1229-1239.

SERAFINI M, BELLOCCO R, WOLK A et EKSTROM AM. (2002). Total antioxidant potential of fruit and vegetables and risk of gastric cancer. *Gastroenterology*, **123**, 985–991.

SHANNON-LOWE C.D, NEUHIERL B, BALDWIN G, RICKINSON A.B. et DELECLUSE H.J. (2006). Resting B cells as a transfer vehicle for Epstein-Barr virus infection of epithelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **103**(18), 7065-7070.

SHIBATA D et WEISS L.M. (1992). Epstein– Barr virus-associated gastric adenocarcinoma. *American Journal of Pathology*, **140**, 769–774.

SHIMOYAMA T, YOSHIMURA T, MIKAMI T, FUKUDA S, CRABTREE JE et MUNAKATA A. (1998). Evaluation of *Helicobacter pylori vacA* genotype in Japanese patients with gastric cancer. *Journal of Clinical Pathology*, **51**, 299–301.

SHINOZAKI A, USHIKU T, MORIKAWA T, HINO R, SAKATANI T, UOZAKI U FUKAYAMA M. (2009). Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma: a distinct carcinoma of gastric phenotype by claudin expression profiling. *Journal of Histochemistry Cytochemistry*, **57**, 775–785.

SONALI S et MASTER M.D. (2004). Gastric Carcinoma. *Disease -a- Month*, **50**, 532-539.

SURICO G, MUGGEO P, MUGGEO V, LUCARELLI A, NOVIELLI C, CONTI V, RIGILLO N. (1999). Polyclonal hypergammaglobulinemia at the onset of acute myeloid leukemia in children. *Annals of Hematology*, **78**, 445–448.

SUZUKI R, SHIOTA S E et YAMAOKA Y. (2012). Molecular epidemiology, population genetics, and pathogenic role of *Helicobacter pylori*. *Infection, Genetics and Evolution*, **12**, 203–213.

SZAFRANSKI C, BAILEY J, TURCK C.W, NICOL G, MARTOSELLA J, et ZOLOTARJOVA N. (2004). Enhancing analytical access to low-abundant proteins in the human plasma proteome, *Pharmaceutical Genomics*, **29**, 40–46.

SZAKONYI G, KLEIN M.G et HANNAN J.P. (2006). Structure of the Epstein-Barr virus major envelope glycoprotein. *Nature Structural and Molecular Biology*, **13**(11), 996-1001.

TACK B.F, MORRIS S.C et PRAHL J.W. (1979). Third component of human complement: structural analysis of the polypeptide chains of C3 and C3b. *Biochemistry*, **18**, 1497–1503.

TALBOT S.J et CRAWFORD D.H. (2004). Viruses and tumours - an update. *Eur. J. Cancer*, **40**(13), 1998-2005.

TESSARI P, BARAZZONI R, KIWANUKA E, DAVANZO G, DE PERGOLA G, ORLANDO R, VETTORE M et ZANETTI M. (2002). Impairment of albumin and whole body postprandial protein synthesis in compensated liver cirrhosis. *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism*, **282**, 304–311.

THOMPSON M.P et KURZROCK R. (2004). Epstein-Barr virus and cancer. *Clin. Cancer Research*, **10**(1), 803-821.

THORLEY-LAWSON D.A (2005). EBV the prototypical human tumor virus - just how bad is it? *Allergy and Clinical immunology*, **116**, 251-261.

THORLEY-LAWSON D.A. (2005). EBV Persistence and Latent Infection in vivo; in: “Epstein Barr Virus”. Caister Academic Press, Wymondham.

TSAO T, MURREY H.E, HUG C, LEE D.H et LODISH H.F. (2002). Oligomerization state-dependent activation of NF-KB signaling pathway by adipocyte complement-related protein of 30 kDa (Acrp30). *Journal of Biological Chemistry*, **277**, 29359-29362.

TSUBONO Y, TAKAHASHI T, IWASE Y, IITOI Y, AKABANE M et TSUGANE S. (1997). Nutrient consumption and gastric cancer mortality in five regions of Japan. *Nutrition and Cancer*, **27**, 310–315.

TSURUMI T, FUJITA M et KUDOH A. (2005). Latent and lytic Epstein-Barr virus replication strategies. *Reviews in Medical Virology*, **15**, 3-15.

TURNER M.W et HULME B. (1970). The Plasma Proteins: An Introduction, Pitman Medical & Scientific Publishing Co., Ltd., London.

UOZAKI H et FUKAYAMA M. (2008). Epstein-Barr virus associated gastric carcinoma-viral carcinogenesis through epigenetic mechanisms. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, **1**, 198–216.

VAN BEEK J et BRINK A.A. (2003). In vivo transcription of the Epstein-Barr virus (EBV) BamHIA region without associated in vivo BARF0 protein expression in multiple EBV-associated disorders. *Journal of General Virology*, **84**(10), 2647-2659.

VAN BEEK J, ZUR HAUSEN A, KRANENBARG E.K, WARRING R.J, BLOEMENA E, CRAANEN M.E, VAN DE VELDE C.J, MIDDELDROP J.M, MEIJER C.J et VAN DEN BRULE A.J. (2002). A rapid and reliable enzyme immunoassay PCR-based screening method to identify EBV-carrying gastric carcinomas. *Mod. Path*, **15**, 870–877.

VAN BEEK J, ZUR HAUSEN A et SNEL SN. (2006). Morphological evidence of an activated cytotoxic T-cell infiltrate in EBV-positive gastric carcinoma preventing lymph node metastases. *American Journal of Surgical Pathology*, **30**, 59-65.

VAN LENTE F. (1991). The diagnostic utility of haptoglobin. *Clinical Immunology*, **11**, 135–138.

VERDECCHIA A, MARIOTTO A et GATTA G. (2003). Comparison of stomach cancer incidence and survival in four continents. *European Journal of Cancer*, **39**, 1603-1609.

VEZINA C.A, MILNE R.W, WEECH P.K et MARCEL Y.L. (1988). Apolipoprotein distribution in human lipoproteins separated by polyacrylamide gradient gel electrophoresis. *Journal of Lipid Research*, **29**, 573-585.

WATANABE A, MARUO S, ITO T, ITO M, KATSUMURA K.R et TAKADA K. (2010). Epstein-Barr virus-encoded Bcl-2 homologue functions as a survival factor in Wp-restricted Burkitt LYMPHOMA cell line P3HR-1. *Journal of Virology*, **84**, 2893-2901.

WALLACH J. (2000). Interpretation of Diagnostic Tests. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.

WEN S, MOSS S.F. (2009). Helicobacter pylori virulence factors in gastric carcinogenesis. *Cancer Letters*, **282**, 1–8.

WHICHER J.T. (1980). The interpretation of electrophoresis. *British Journal of Hospital Medicine*, **24**, 348–356.

WHITING JL, SIGURDSSON A, ROWLANDS DC, HALLISSEY MT et FIELDING JW. (2002). The long-term results of endoscopic surveillance of premalignant gastric lesions. *Gut*, **50**, 378–381.

WIECH T, NIKOLOPOULOS E, LASSMAN S, HEIDT T, SCHÖPFLIN A, SARBIA M, WERNER M, SHIMIZU Y, SAKKA E, OOKA T et ZUR HAUSEN A. (2008). Cyclin D1 expression is induced by viral BARF1 and is overexpressed in EBV-associated gastric cancer. *Virchows Archiv*, **452**(6), 621-627.

WU Z.Z, CHOW K.P, KUO T.C, CHANG Y.S et CHAO C.C. (2011). Latent membrane protein 1 of Epstein–Barr virus sensitizes cancer cells to cisplatin by enhancing NF- κ B p50 homodimer formation and downregulating NAPA expression. *Biochemical Pharmacology*, **82**, 1860–1872.

YAJIMA M, KANDA T et TAKADA K. (2005). Critical role of Epstein-Barr Virus (EBV)-encoded RNA in efficient EBV-induced B-lymphocyte growth transformation. *Journal of Virology*, **79**(7), 4298-307.

YANG S, GUO X, DEBNATH G, MOHANDAS N et AN X. (2009). Protein 4.1R links E-cadherin/ β -catenin complex to the cytoskeleton through its direct interaction with β -catenin and modulates adherens junction integrity. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1788**, 1458–1465.

YASHIRO M, NISHIOKA N et HIRAKAWA K. (2005). K-ras mutation influences macroscopic features of gastric carcinoma. *Journal of Surgical Research*, **124**, 74-78.

YASUI W, SENTANI K, SAKAMOTO N, ANAMI K, NAITO Y et OUE N. (2011). Molecular pathology of gastric cancer: Research and practice. *Pathology – Research and Practice*, **207**, 608– 612.

YEH J.S, MUNN S.E et PLUNKETT T.A. (2000). Coexistence of acanthosis nigricans and the sign of Leser-Trelat in a patient with gastric adenocarcinoma: A case report and literature review. *Journal of American Academy of Dermatology*, **42**(2), 357-362.

YENAMANDRA P, SOMPALLA R, KLEINA G et KASHUBA E. (2009). Comparative analysis of the Epstein-Barr virus encoded nuclear proteins of EBNA-3family Surya. *Biology and Medicine*, **39**, 1036 – 1042.

YOKOTA J, YAMAMOTO T et MIYAJIMA N. (1988). Genetic alterations of the c-erbB-2 oncogene occur frequently in tubular adenocarcinoma of the stomach and are often accompanied by amplification of the v-erbA homologue. *Oncogene*, **2**, 283-287.

YOSHIYAMA H, IMAI S, SHIMIZU N et TAKADA K. (1997). Epstein-Barr virus infection of human gastric carcinoma cells: implication of the existence of a new virus receptor different from CD21. *Journal of Virology*, **71**, 5688–5691.

YOUNG L.S et MURRAY P.G. (2003). Epstein-Barr virus and oncogenesis: from latent genes to tumours. *Oncogene*, **22**(33), 5108-5121.

YOUNG L.S et RICKINSON A.B. (2004). Epstein-Barr virus: 40 years on. *Nature Reviews Cancer*, **4**, 757-768.

ZHANG Z, XU G, MA M, YANG J et LIU X. (2012). Dietary Fiber Intake Reduces Risk for Gastric Cancer: A Meta-analysis. *Anticancer Research*, **32**(11), 5031-5037.

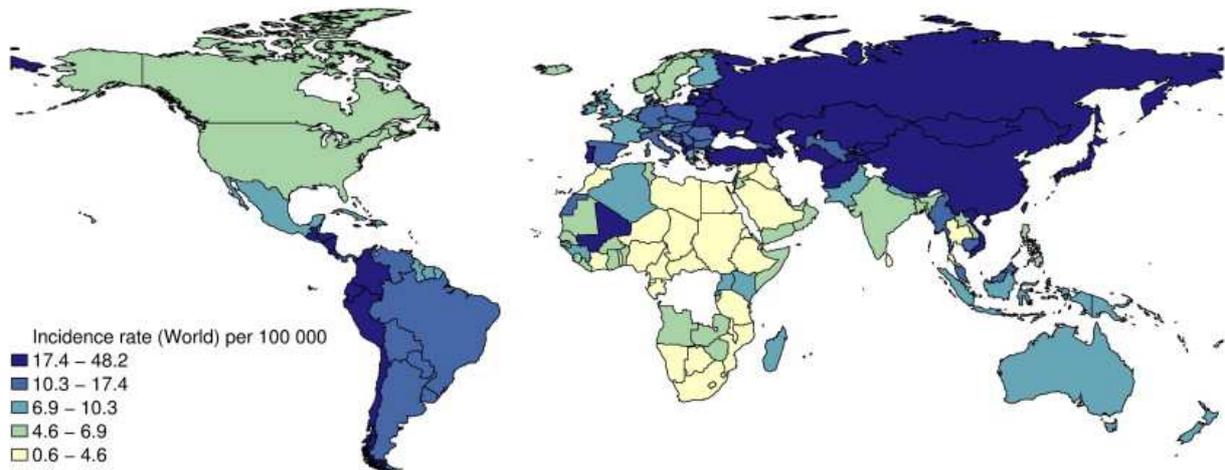
ZICARIA A, TICCONIB C, PASETTOB N, LASARDOA A, SALERNOA A, PONTIERIA, G et PICCONEC E. (1995). Interleukin-2 in human amniotic fluid during pregnancy and parturition: implications for prostaglandin E2release by fetal membranes. *Journal of Reproductive Immunology*, **29**, 197-208.



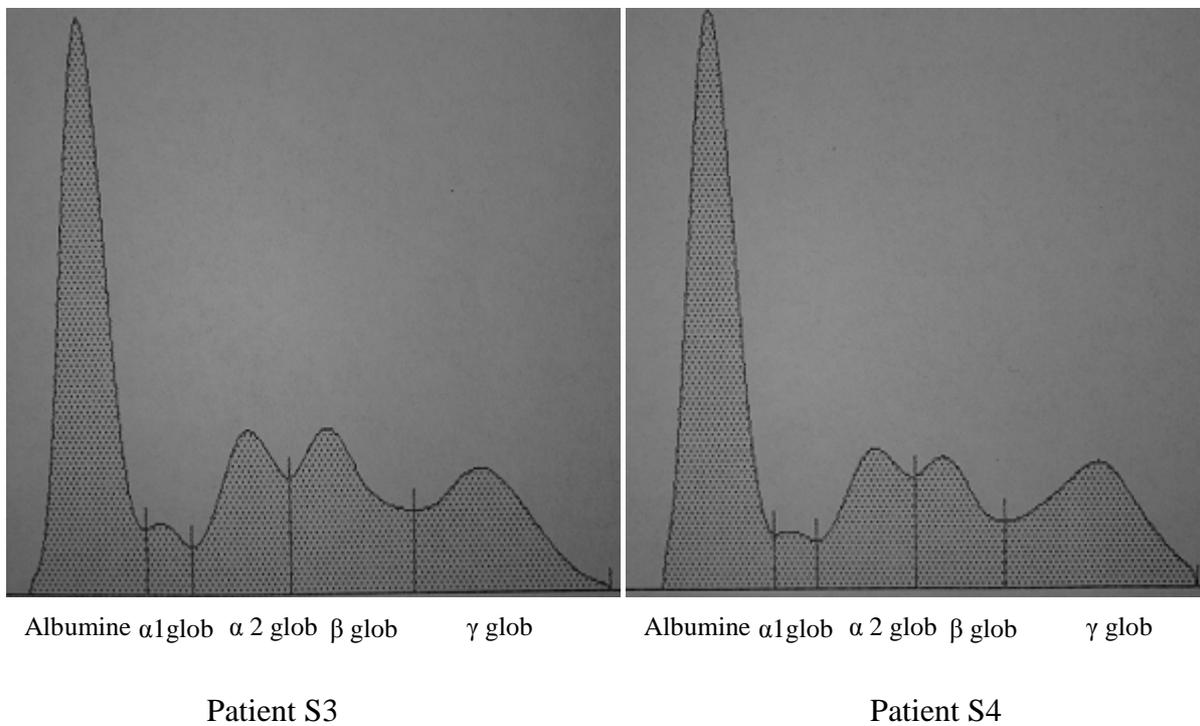
Annexes

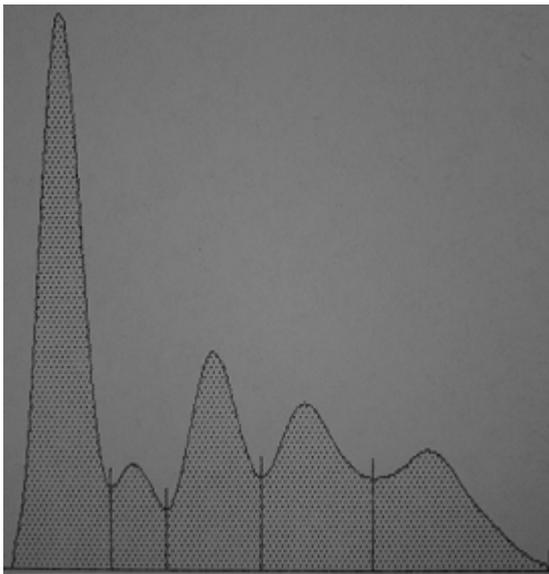
Annexes

Annexe 1 : Distribution géographique du cancer gastrique chez les individus de sexe masculin (FERLAY *et al*, 2012)



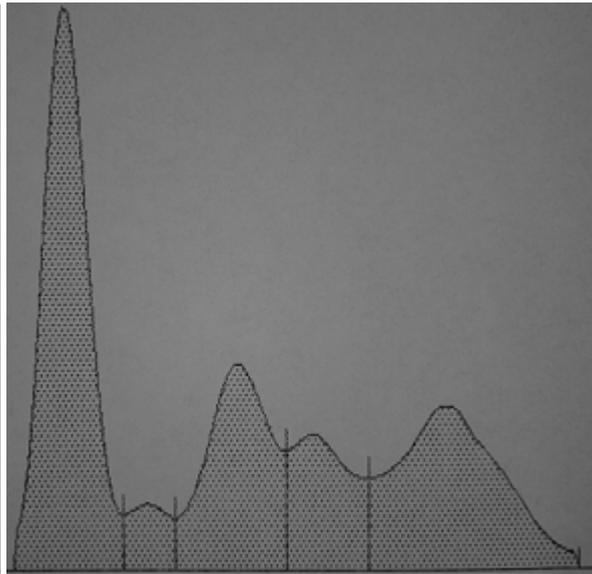
Annexe 2 : Les protéinogrammes obtenus par électrophorèse sur acétate de cellulose pour les différents échantillons de sérums des sujets atteints de cancer gastrique.





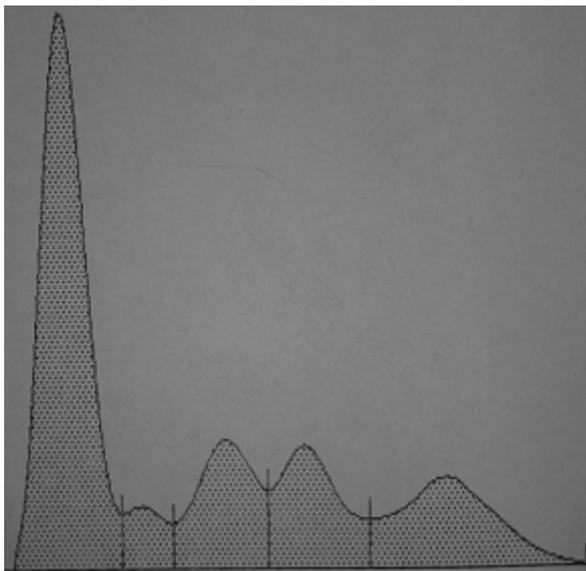
Albumine $\alpha 1$ glob $\alpha 2$ glob β glob γ glob

Patient S5



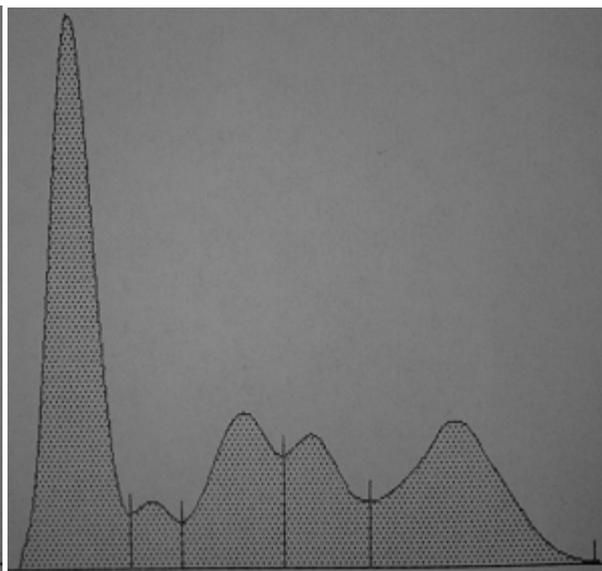
Albumine $\alpha 1$ glob $\alpha 2$ glob β glob γ glob

Patient S6'



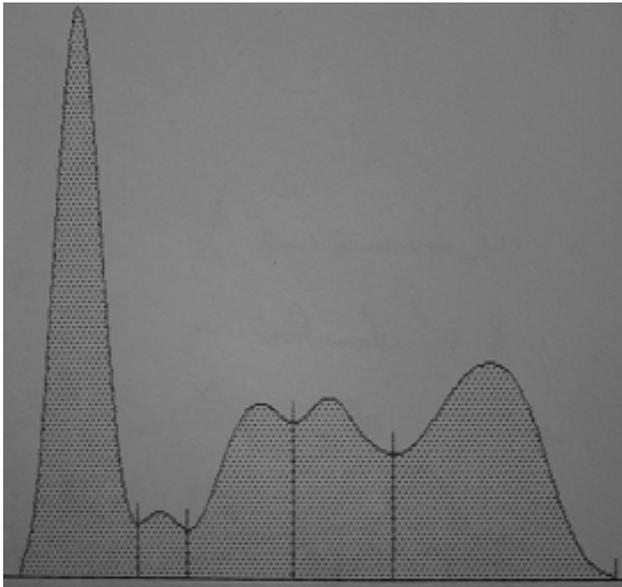
Albumine $\alpha 1$ glob $\alpha 2$ glob β glob γ glob

Patient S7



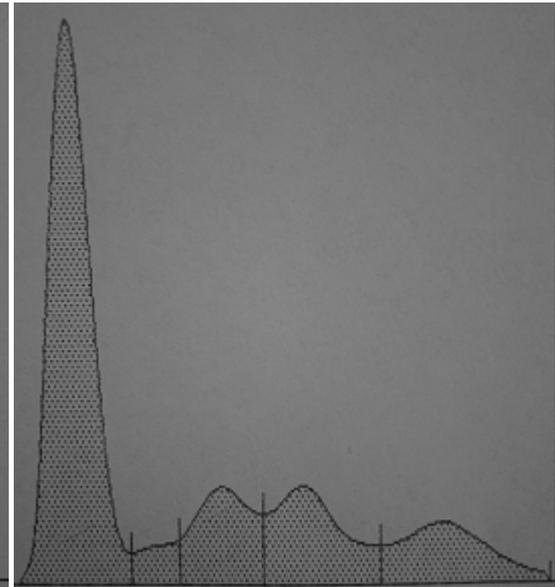
Albumine $\alpha 1$ glob $\alpha 2$ glob β glob γ glob

Patient S8



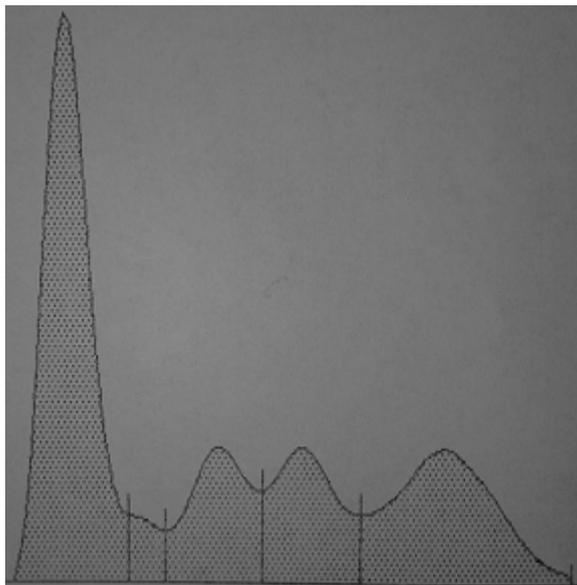
Albumine α 1glob α 2 glob β glob γ glob

Patient S10



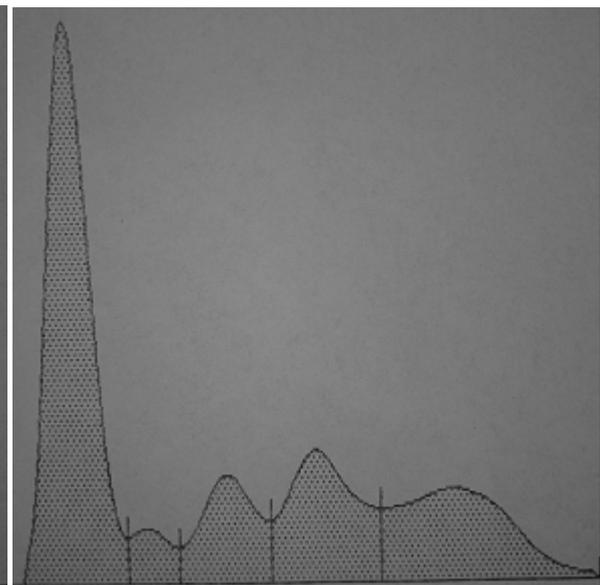
Albumine α 1glob α 2 glob β glob γ glob

Patient S12



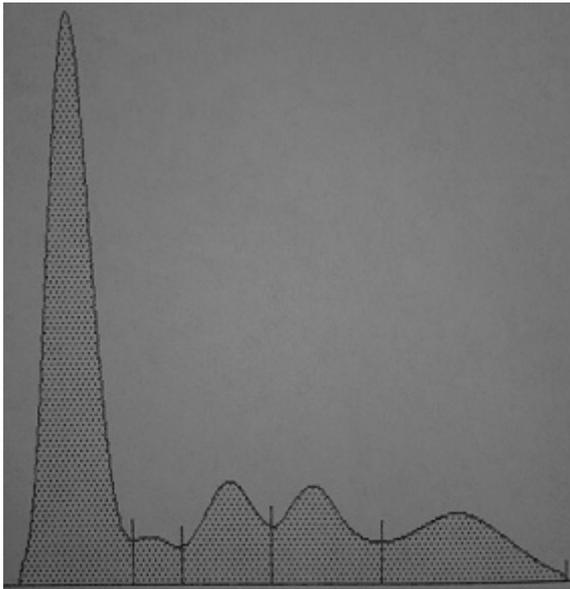
Albumine α 1glob α 2 glob β glob γ glob

Patient S13



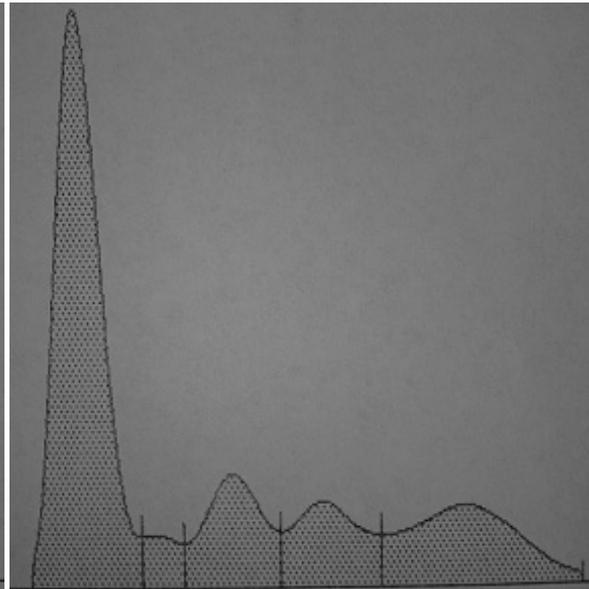
Albumine α 1glob α 2 glob β glob γ glob

Patient S14



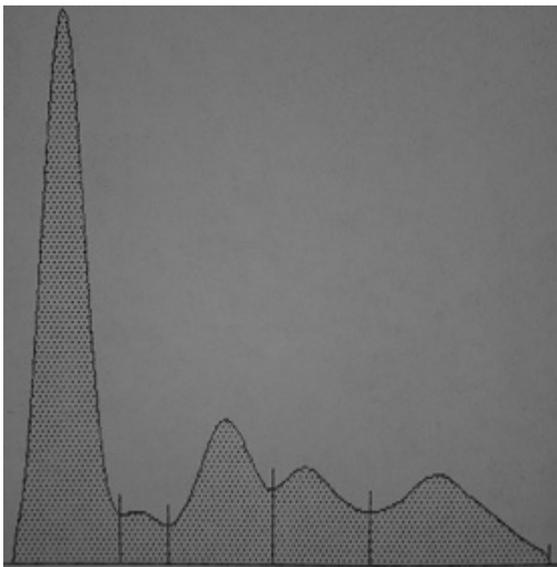
Albumine α 1glob α 2 glob β glob γ glob

Patient S16



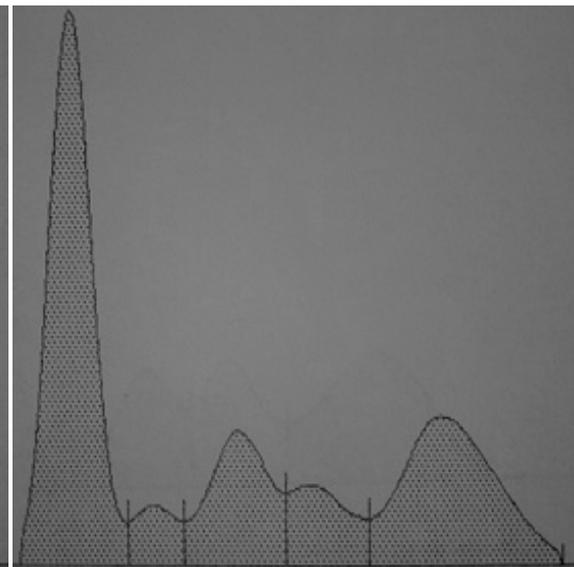
Albumine α 1glob α 2 glob β glob γ glob

Patient S18



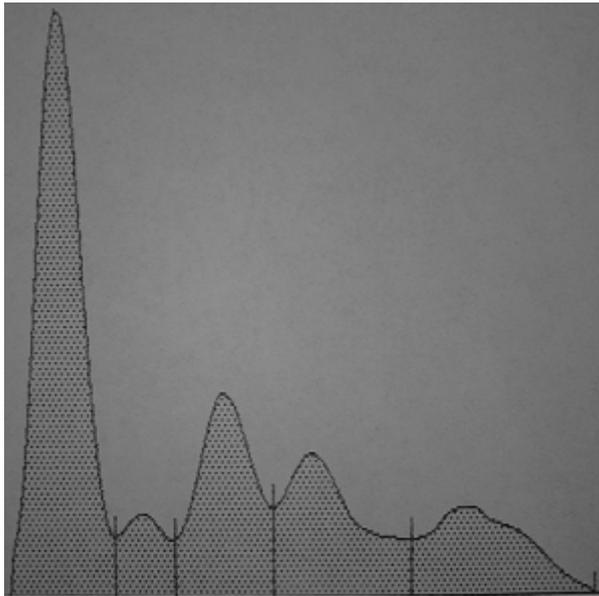
Albumine α 1glob α 2 glob β glob γ glob

Patient S19



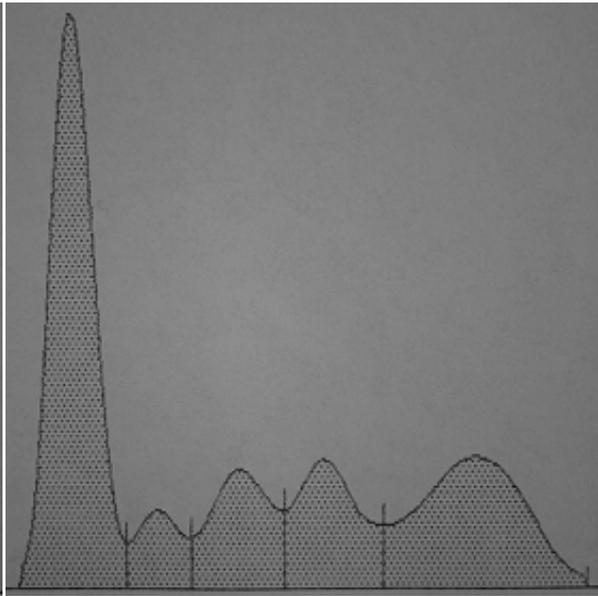
Albumine α 1glob α 2 glob β glob γ glob

Patient T14



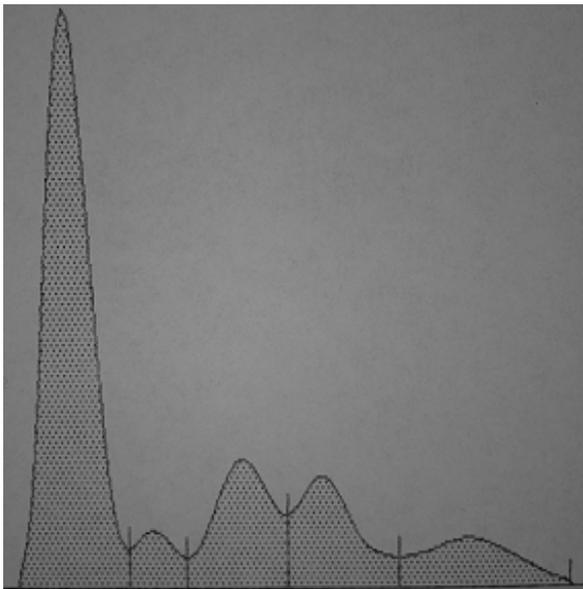
Albumine α 1glob α 2 glob β glob γ glob

Patient T15



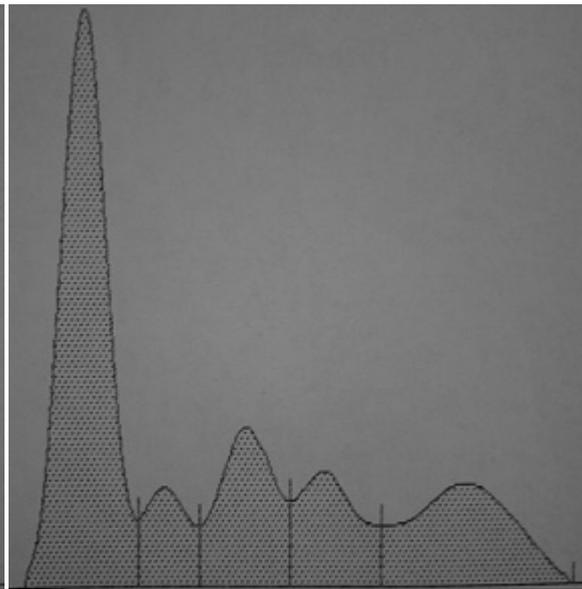
Albumine α 1glob α 2 glob β glob γ glob

Patient T16



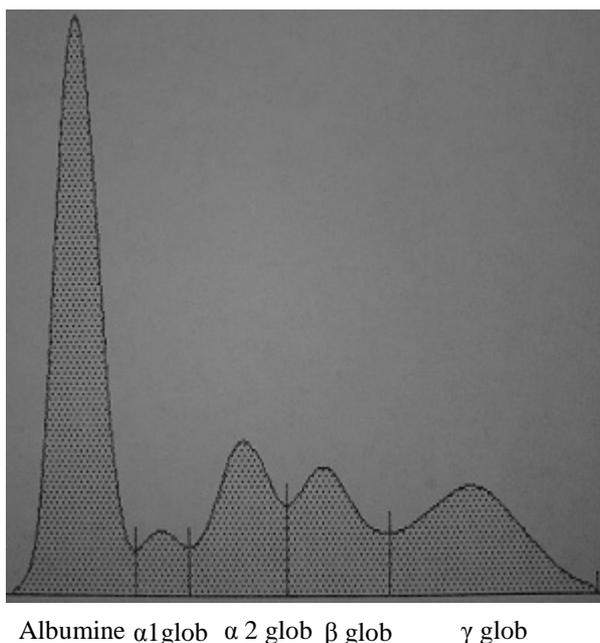
Albumine α 1glob α 2 glob β glob γ glob

Patient T17



Albumine α 1glob α 2 glob β glob γ glob

Patient T18



Patient T19

Annexe 3 : Tampons et solutions utilisées.

1. Composition des gels d'électrophorèse

Gel de séparation 12%

Acrylamide/Bis 40%	2,28 ml
H ₂ O	3,22 ml
Tris HCl 1,5M pH 8,8 ml	1,87
SDS 10%	75 μ l
TEMED	3,75 μ l
Persulfate d'ammonium 10%	150 μ l

Gel de concentration 4%

Acrylamide/Bis 40%	500 μ l
H ₂ O	3,2 ml
Tris HCl 0,5M pH 6,8 ml	1,25
SDS 10%	50 μ l
TEMED	7,5 μ l
Persulfate d'ammonium 10%	50 μ l

2. RIPA

SDS 10%	1 ml
Doc	0,5 g
Triton	1 g
NaCl	3,8 g
EDTA 0,5M	1 ml
Tris HCl 1M pH 7,5	2 ml
H ₂ O	qsq 100 ml

3. Tampon de dénaturation 2X

Tris HCl 0,5M pH 6,8	250 µl
Glycérol	200 µl
H ₂ O	200 µl
SDS 20%	200 µl
DTT 1M	200 µl
Solution de bleu de Bromophénol	100 µl

4. Solution de bleu de Bromophénol

Bleu de Bromophénol	2 mg
Glycérol 50%	10 g
Tris HCl 0,5M pH 6,8	1,25 ml
H ₂ O	qsq 10 ml

5. Tampon d'électrophorèse 5X

Tris	15 g
Glycine	72 g
H ₂ O	qsq 1 l

6. Tampon d'électrophorèse 1X + SDS

Tampon d'électrophorèse 5X	200 ml
SDS	10 ml
H ₂ O	qsq 1 l

7. PBS 10X

NaCl	76,5 g
Na ₂ HPO ₄	7,25 g
KH ₂ PO ₄	2,1 g
H ₂ O	qsq 1 l

8. PBS 1X Tween

PBS 10X	100 ml
Tween 20	1 ml
H ₂ O	qsq 1 l

9. Solution de fixation

TCA	12 g
Eau distillée	100 ml

10. Solution de coloration

Bleu de Coomassie R250	0,5 g
TCA	4 g
Méthanol	100 ml
Eau distillée	100 ml

11. Solution de décoloration

Acide acétique	37,5 ml
Eau distillée	312,5 ml
Méthanol	150 ml

12. Electrophorèse sur acétate de cellulose**12.1. Solution tampon**

- Poudre de tris barbital
- 750 ml d'eau distillée
- Ajuster le pH avec du HCl à 8,6

12.2. Solution éclaircissante

- 30 volumes d'acide acétique glacial (pour 100 ml → 25 ml)
- 70 volumes de méthanol (pour 100 ml → 71 ml)
- 4 volumes de Clear Aid (poly éthylène glycol PEG 400)