



RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE



UNIVERSITÉ ABOU BAKR BELKAID TLEMCCEN
FACULTÉ DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE DE LA TERRE ET DE
L'UNIVERS

DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE

Laboratoire de microbiologie appliquée à l'agroalimentaire, au biomédical et à
l'environnement

« LAMAABE »

THÈSE

Présentée par

M^{lle} BEHAR Dalale

En vue de l'obtention du diplôme de doctorat en Microbiologie

**Étude épidémiologique et moléculaire du cancer gastrique
dans une région de l'ouest Algérien**

Soutenue le 19/12/2023

Devant le jury :

HASSAINE Hafida	Pr	Présidente	Université de Tlemcen
KHENCHOUCHE Abdelhalim	Pr	Examinateur	Université de Sétif
CHABNI Nafissa	Pr	Examinatrice	Université de Tlemcen
BACHI RBOUIADJRA Chahrazed	MCA	Examinatrice	Université de sidi bel abbès
BOUBLENZIA Lamia	MCA	Directrice	Université Tlemcen
BELHARRAZEM Djeda	Pr	Co-directrice	Université d'Allemagne

Année universitaire : 2022-2023

Dédicaces

À ma très chère mère :

Durant toutes ces années d'études, tu as été mon soutien et mon encouragement constant. Je suis infiniment reconnaissante pour ton amour, ta confiance en moi, ta patience, tes sacrifices ainsi que ta présence dans les moments les plus difficiles. Les mots me manquent pour exprimer pleinement la place que tu occupes dans ma vie. Ta contribution à ma réussite est immense et ta joie c'est ce qui me pousse à progresser sans cesse. J'espère que tu es et seras toujours fière de moi.

À mon cher frère :

Tu représentes non seulement un frère pour moi, mais aussi un véritable ami. Je t'aime énormément et je te remercie infiniment pour ton encouragement et ton aide.

À la mémoire de mon père :

Je dédie ce moment marquant de ma vie à la mémoire de mon père qui nous a quittés trop tôt. J'espère être la fille que tu aurais souhaité que je sois, "Rahemaka Allah".

À ma tante :

Merci pour ton soutien et tes encouragements tout au long de cette période d'études.

À ma meilleure amie DAHMANI Bouchra

Merci d'être toujours là pour moi, dans les bons comme dans les mauvais moments.

À la mémoire de mon amie BECHLAGHEM Wahiba :

Tu es une amie que je n'oublierai jamais. Tes paroles m'ont toujours encouragée et inspirée, "Rahemaki Allah".

À toutes mes amies qui m'ont toujours encouragée et à qui je souhaite encore plus de succès.

À tous ceux que j'aime.

Remerciements

Il me sera très difficile de remercier tout le monde, car c'est grâce à l'aide de nombreuses personnes que j'ai pu mener cette thèse à son terme.

*Je voudrais tout d'abord exprimer ma profonde gratitude envers ma directrice de thèse, **BOUBLENZIA Lamia**, qui m'a conseillé et guidé pendant toutes ces années de recherche. Sa disponibilité et ses observations avisées ont été précieuses dans la réalisation du travail.*

*Je remercie infiniment la professeure **BELHARAZEM Djada** qui nous a intégrées dans son projet de recherche et je suis reconnaissante de pouvoir bénéficier de sa collaboration et de son acceptation pour être ma co-directrice.*

*Je tiens à exprimer ma profonde gratitude envers la professeure **HASSAINE Hafida** d'avoir accepté de faire partie de mon jury. Ses qualités humaines ont été d'une immense valeur pour moi, en me permettant de travailler dans un environnement empreint d'énergie positive. Je souhaite également remercier chaleureusement tous les membres de LAMAABE.*

*Je tiens également à remercier la professeure **CHABNI Nafissa**, qui nous a aidées à réaliser ce travail et a accepté de participer à mon jury. J'ai été ravi de travailler en sa compagnie.*

*Je tiens à exprimer ma profonde gratitude au professeur **KHENCHOUCHE Abdelhalim** pour son aide précieuse, ses conseils et sa participation à mon jury.*

*Je remercie également la docteure **BACHI RBOUIADJRA chahrazed** pour l'honneur qu'elle me fait d'être dans mon jury de thèse.*

*Un grand merci envers **tous les médecins** des laboratoires d'anatomie pathologique qui ont apporté leur précieuse aide dans la collecte de nos échantillons.*

*Je remercie chaleureusement le chef du service d'anatomie pathologique d'EPH Dr Benzardjeb Ain-Temouchent, monsieur **BELATBI Belkacem**, pour nous avoir accordé l'autorisation de réaliser une partie de notre travail. Mes remerciements vont également à tous les membres du service.*

*Nous sommes profondément reconnaissants envers les directeurs des laboratoires **PPABIONUT, CancerLab, WiraGen Academy et Gene Life Sciences** pour leur contribution précieuse à cette thèse. Leur collaboration dans la recherche a été essentielle à la réalisation de ce travail.*

ملخص

يعد سرطان المعدة خامس أكثر السرطان شيوعاً في العالم، حيث يبلغ عدد الحالات السنوية حوالي مليون حالة جديدة. ترتبط العديد من عوامل الخطر بتطوره، بما في ذلك EBV وHPV. على المستوى الجزيئي، فإن هذا السرطان لديه عدم تجانس كبير داخل الأورام وفيما بينها. ذكرت الدراسات أن جينات TP53 و KRAS و ARID1A و PIK3CA كثيرًا ما يتم تحورها في هذا النوع من السرطان. تهدف هذه الدراسة إلى استكشاف الملامح الباثية لسرطان المعدة في ولاية تلمسان، لتحديد تواتر EBV وHPV وتحليل حالة الطفرة للإكسون 2 من جين KRAS في سرطان المعدة في سكان غرب الجزائر.

تم إجراء تقييم للمظهر الباثي باستخدام برنامج SPSS 21 وبرنامج Microsoft Excel 10. تم إجراء الكشف عن الحمض النووي عن طريق تفاعل البوليميراز المتسلسل التقليدي (PCR) على 73 عينة، باستخدام بادئات محددة تستهدف منطقتي EBNA-1 و LMP-1 من جينوم EBV، والبادئات MY09 / MY11 و GP5+ / GP6+ التي تستهدف منطقة L1 من جينوم HPV. تم تقييم حالة الطفرة للإكسون 2 من جين KRAS بواسطة تسلسل Sanger في مجموعة فرعية من 40 حالة من سرطان المعدة.

مع تسجيل 394 حالة إصابة بسرطان المعدة بين عامي 2011 و2015، يعد هذا السرطان أحد أكثر أنواع السرطانات شيوعاً في ولاية تلمسان. كان متوسط عمر المرضى $60,5 \pm 14,20$ سنة، مع غلبة ذكور (60,4% رجال مقابل 39,6% نساء)، وهو ما يتوافق مع نسبة الجنس 1,5 و فرق كبير بين الجنسين ($p=0,08$). كان الموقع الورمي هو المعدة السفلية في 6,09% من الحالات، و 23,09% من الحالات المشخصة كانت في المرحلة المحلية. أما بالنسبة لخطر الإصابة بسرطان المعدة المرتبط بالعدوى الفيروسية، فإن 1,36% من الحالات (1/73) كانت إيجابية الـ HPV، في حين لم يتم الكشف عن أي حالات إصابة بالفيروس EBV. فيما يتعلق بحالة للإكسون 2 من جين KRAS، كان معدل الطفرة في سكان غرب الجزائر 67,5% (27/40)، مع طفرات كبيرة في الكودونات 37 و 25 و 31 و 35.

أشارت النتائج بوضوح إلى ضرورة توعية سكان تلمسان بأهمية الكشف المبكر. بالإضافة إلى ذلك، يوصى بمزيد من البحث للتحقيق في العلاقة بين عدوى EBV وHPV و سرطان المعدة في مجموعة الدراسة، بالإضافة إلى عوامل الخطر المحتملة الأخرى. يُنصح أيضًا بمواصلة التحقيقات لفهم دور الطفرات الجينية KRAS والمؤثرات الحيوية الجزيئية الأخرى بشكل أفضل في تطور سرطان المعدة.

الكلمات الرئيسية: سرطان المعدة، علم الأوبئة، فيروس إيشتابين بار، فيروس الورم الحليمي البشري، KRAS.

Résumé

Le cancer gastrique (CG) est le cinquième cancer le plus fréquent dans le monde, avec une incidence annuelle d'environ 1 million de nouveaux cas. Plusieurs facteurs de risque sont associés au son développement, dont l'EBV et le HPV. Sur le plan moléculaire, ce cancer présente une grande hétérogénéité intra- et inter-tumorale. Des études ont rapporté que les gènes TP53, KRAS, ARID1A et PIK3CA sont fréquemment mutés dans ce type de cancer. Cette étude a pour objectif d'explorer le profil épidémiologique du CG dans la wilaya de Tlemcen, de déterminer la fréquence de l'EBV et du HPV et d'analyser le statut mutationnel de l'exon 2 du gène KRAS dans le CG chez une population de l'ouest algérien.

L'évaluation du profil épidémiologique a été réalisée en utilisant le logiciel SPSS 21 et Microsoft Excel 10. La détection d'ADN a été effectuée par PCR conventionnelle sur 73 échantillons, en utilisant des amorces spécifiques qui ciblent les régions du génome EBNA-1 et LMP-1 de l'EBV, et les amorces MY09/MY11 et GP5+/GP6+ qui ciblent la région L1 du génome du HPV. Le statut mutationnel de l'exon 2 du gène KRAS a été évalué par séquençage de Sanger dans un sous-groupe de 40 cas de CG.

Avec 394 cas de CG enregistrés entre 2011-2015, ce cancer est l'un des cancers les plus fréquents dans la wilaya de Tlemcen. L'âge moyen des patients était de $60,5 \pm 14,20$ ans, avec une prédominance masculine (60,4% hommes contre 39,6% femmes), ce qui correspond à un sexe-ratio de 1,5 et une différence significative entre les deux sexes ($p = 0,08$). La localisation tumorale était antre-pylorique dans 6,09% des cas, et 23,09% des cas diagnostiqués étaient au stade local. Quant au risque de CG lié aux des infections virales, 1,36% des cas (1/73) étaient positifs pour le HPV, tandis que aucun cas d'infection par l'EBV n'a été détecté. En ce qui concerne le statut de l'exon 2 du gène KRAS, le taux de mutation dans la population de l'Ouest algérien était de 67,5% (27/40), avec des mutations significatives aux codons 37, 25, 31 et 35.

Les résultats ont clairement indiqué la nécessité de sensibiliser la population de Tlemcen sur l'importance du dépistage précoce. De plus, il est recommandé de poursuivre les recherches afin d'étudier l'association entre l'infection par l'EBV et le HPV et le CG dans la population étudiée, ainsi que d'autres facteurs de risque potentiels. Il est également conseillé de poursuivre les investigations pour mieux comprendre le rôle des mutations du gène KRAS et les autres biomarqueurs moléculaires dans le développement du CG.

Mots clés : CG, Épidémiologie, EBV, HPV, KRAS.

Abstract

Gastric cancer (GC) is the fifth most common cancer in the world, with an annual incidence of approximately 1 million new cases. Several risk factors are associated with its development, including HPV and EBV. At the molecular level, this cancer exhibits significant intra- and inter-tumoral heterogeneity. Studies have reported frequent mutations in genes TP53, KRAS, ARID1A, and PIK3CA in this type of cancer. This study aims to explore the epidemiological profile of GC in the Tlemcen province, determine the frequency of EBV and HPV, and analyze the mutational status of exon 2 of the KRAS gene in GC within a population from western Algeria.

The evaluation of the epidemiological profile was performed using SPSS 21 and Microsoft Excel 10 software. DNA detection was carried out by conventional PCR on 73 samples using specific primers targeting the EBNA-1 and LMP-1 regions of the EBV genome, as well as the MY09/MY11 and GP5+/GP6+ primers targeting the L1 region of the HPV genome. The mutational status of exon 2 of the KRAS gene was assessed by Sanger sequencing in a subgroup of 40 GC cases.

With 394 cases of GC recorded between 2011-2015, this cancer is one of the most common cancers in the Tlemcen province. The mean age of patients was $60,5 \pm 14,20$ years, with a male predominance (60,4% men versus 39,6% women), resulting in a sex ratio of 1,5 and a significant difference between the two sexes ($p = 0,08$). The tumor localization was antro-pyloric in 6,09% of cases, and 23,09% of diagnosed cases were at the local stage. Regarding the risk of GC associated with viral infections, 1,36% of cases (1/73) tested positive for HPV, while no cases of EBV infection were detected. As for the mutational status of exon 2 of the KRAS gene, the mutation rate in the population of western Algeria was 67,5% (27/40), with significant mutations at codons 37, 25, 31, and 35.

The results clearly indicate the need to raise awareness among the population of Tlemcen about the importance of early detection. Furthermore, it is recommended to continue research to study the association between EBV and HPV infection and GC in the studied population, as well as other potential risk factors. It is also advisable to pursue investigations to better understand the role of KRAS gene mutations and other molecular biomarkers in the development of GC.

Keywords : GC, Epidemiology, EBV, HPV, KRAS.

Sommaire

Dédicaces

Remerciements

ملخص

Résumé

Abstract

Sommaire

Liste d'abréviations

Liste des figures

liste des tableaux

Introduction.....2

PARTIE I : Rappel Théorique

Chapitre 1 : Le cancer gastrique.....5

1. Variation épidémiologique du cancer gastrique5
2. Anatomie et organisation histologique de l'estomac.....5
3. Mécanismes moléculaires de la carcinogenèse gastriques6
4. Les classifications histologiques et moléculaires du cancer gastrique9
5. Les biomarqueurs moléculaire et cancer gastrique 11
 - 5.1. Définition d'un biomarqueur du cancer 11
 - 5.2. La découverte les biomarqueurs moléculaires du cancer..... 12
 - 5.3. Types de biomarqueurs du cancer 13
 - 5.4. Biomarqueurs du cancer gastrique 14
6. Facteurs de risques du cancer gastrique 16
 - 6.1. Les antécédents familiaux..... 16
 - 6.2. Les lésions précancéreuse 17
 - 6.3. Age..... 17
 - 6.4. Sexe et race 17
 - 6.5. Régime alimentaire 17

6.6. Le groupement sanguin.....	18
6.7. Le tabagisme et alcool	18
6.8. Obésité	18
6.9. Chirurgie gastrique.....	18
6.10. Les agents infectieux.....	19
Chapitre 2 : Le rôle des agents pathogènes viraux (EBV, HPV) dans le cancer del'estomac	20
1. Epstein-Barr virus (EBV).....	20
1.1. Généralités	20
1.2. Structure et organisation génomique	20
1.3. Cycle de « vie » de l'EBV	21
1.3.1. Infection primaire et réplication lytique	21
1.3.2. La latence virale	22
1.3.3. La réactivation.....	23
1.4. EBV et cancers associés.....	24
1.5. EBV et cancer gastrique.....	25
1.5.1. Epidémiologie	25
1.5.2. Infection à EBV dans les cellules épithéliales gastriques	25
1.5.3. Types de latences et gènes latents	26
1.5.4. Le profil moléculaire	27
1.5.5. Caractéristiques clinico-pathologiques	28
1.5.6. Techniques de détection d'EBV dans le cancer gastrique.....	28
2. Papillomavirus Humain (HPV)	30
2.1. Généralités	30
2.2. Structure et organisation génomique.....	31
2.3. Le cycle infectieux des papillomavirus.....	32
2.3.1. L'entrée cellulaire et décapsidation du virus.....	32
2.3.2. La maintenance du génome virale	33
2.3.3. Réplication productive du HPV	33
2.3.4. Assemblage et libération	34
2.4. Mécanisme de carcinogénèse.....	34
2.5. HPV et cancers associés.....	36
2.6. HPV et cancer gastrique.....	36
3. Co-infection par EBV et HPV.....	37

PARTIE II : Présentation des Travaux

1. Étude du profil épidémiologique du cancer gastrique dans la Wilaya de Tlemcen entre 2011 et 2015	39
1.1. Objectif	39
1.2. Méthodologie	39
1.2.1. Type de l'étude	39
1.2.2. La population cible	39
1.2.3. Source d'information	40
1.2.4. Méthode d'analyse des données	40
1.3. Résultats	40
1.3.1. Répartition des dix premiers sites de cancer à Tlemcen par incidence	40
1.3.2. Répartition des cas de cancer gastrique selon le sexe	40
1.3.3. Répartition des cas de cancer gastrique selon les tranches d'âge	41
1.3.4. Répartition annuelle des cas de cancer gastrique	42
1.3.5. Répartition des cas de cancer gastrique selon la topographie	42
1.3.6. Répartition des cas de cancer gastrique selon le stade	43
1.4. Discussion	43
1.5. Conclusion	49
2. La détermination de la fréquence des cancers gastriques associés au virus EBV, HPV dans la région de l'Ouest Algérien	50
2.1. Objectif	50
2.2. Lieux d'étude	50
2.3. Analyse des données	50
2.4. Matériels et Méthodes	50
2.4.1. Collecte des échantillons	50
2.4.2 Préparation des tissus	51
2.4.3. Extraction d'ADN	51
2.4.4. L'évaluation de la qualité et de la quantité d'ADN	52
2.4.5. Test d'amplification en chaine par polymérase (PCR)	52
2.4.6. Analyse par électrophorèse sur gel d'agarose 1,5%, 2%	54
2.4.7. Révélation des résultats sur table à UV	54
2.5. Résultats	55
2.5.1. Résultats d'analyse des caractéristiques cliniques des patients	55
2.5.2. Résultats de la détection du génome du HPV	56
2.5.3. Résultats de la détection du génome d'EBV	56

2.6. Discussion	57
2.7. Conclusion	61
3. Identification des anomalies moléculaires au sein du gène KRAS.....	62
3.1. Objectif	62
3.2. Analyses statistiques	62
3.3. Matériel et Méthodes	62
3.3.1. Sujets d'étude, échantillonnage et extraction d'ADN génomique	62
3.3.2. Analyse mutationnelle	62
3.4. Résultats	64
3.5. Discussion	66
3.6. Conclusion	70
Conclusion générale.....	72
Références Bibliographies.....	75

Liste des abréviations

ADN : acide désoxyribonucléique.

AKT1 : AKT serine/Threonine Kinase 1.

ALK : Anaplastic lymphoma kinase.

APC : Adenomatous polyposis coli.

ARID1A : AT-Rich Interaction Domain 1A.

ARN : acide ribonucléique.

ARNm : ARN messenger.

BARF-1: BamHI-A Reading Frame-1.

BART : BamHI-A region rightward transcripts.

BCOR : BCL6 Corepressor.

bp : paire de bases.

BRCA1 : Breast Cancer gene 1.

BRCA2 : Breast Cancer gene 2.

BRLF1 : BamH1 R Fragment Leftward Reading Frame 1.

BZLF1 : BamH1 Z Fragment Leftward Open Reading Frame 1.

CA : Carbohydrate Antigen.

CD10 : Cluster of Differentiation.

CDH1 : Cadherin 1.

CEA : Carcinoembryonic Antigen.

CG : Cancer Gastrique.

CGaEBV : Cancer Gastrique associé au Virus d'Epstein-Barr.

CIMP : the CpG islands methylator phenotype.

CIN : instabilité chromosomique.

CISH : Chromogenic In Situ Hybridization.

CLDN : Claudin.

COSMIC : Catalogue of Somatic Mutations in Cancer.

CTLA-4 : Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen-4.

CTNNA1 : Catenin Alpha 1.

CTNNA2 : Catenin Alpha 2.

CTNNB1 : Catenin Beta 1.

ddPCR : Droplet Digital Polymerase Chain Reaction.

DNMT : DNA Methyltransferase.

EBER: EBV-encoded RNA.

EBNA: Epstein-Barr Nuclear Antige.

EBNA-LP: Epstein-Barr Nuclear Antigen-Leader Protein.

EBV : Virus Epstein-Barr.

EGFR : Epidermal Growth Factor Receptor.

ERBB : Erb-B2 Receptor Tyrosine Kinase.

FFPE : Formalin-Fixed Paraffin-Embedded.

FGFR2 : Fibroblast Growth Factor Receptor 2.

FISH : Fluorescence In Situ Hybridization.

GAPPS : Gastric Adenocarcinoma and Proximal Polyposis of the Stomach.

GLI3 : GLI Family Zinc Finger 3.

H & E : Hematoxylin & Eosin.

H. pylori : *Helicobacter pylori*.

HER2 : Human Epidermal Growth Factor Receptor 2.

HGF/c-Met : Hepatocyte Growth Factor/cellular-Mesenchymal-epithelial transition factor.

HIF-1 α : Hypoxia-Inducible Factor 1-alpha.

HLA : Human Leukocyte Antigen.

HOXA10 : Homeobox A10.

HPV : Human Papillomavirus.

HRAS : Harvey Rat Sarcoma viral oncogene homolog.

HSPG : Heparan Sulfate ProteoGlycan.

IHC : Immunohistochimie.

ISH : In Situ Hybridization.

IVA : Ingenuity Variant Analysis.

JAK/STAT : Janus Kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription.

JAK2 : Janus kinase 2.

KRAS : Kirsten Rat Sarcoma viral oncogene homolog.

LMP : Latent Membrane Protein.

MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase.

MET : Mesenchymal Epithelial Transition.

miARN: micro-ARN.

MLH1 : MutL Homolog 1.

MSH : MutS Homolog.

MMR : Mismatch Repair MSH.

MSI : Microsatellite Instability.

MSI-H : Microsatellite Instability-High.

mTOR : Mammalian Target of Rapamycin.

MUC : Mucin.

NCBI : National Center for Biotechnology Information.

NF- κ B : Nuclear Factor-Kappa B.

NGS : Next-Generation-Sequencing.

OMS : Organisation Mondiale de la Santé.

PCR : Polymerase Chain Reaction.

PD-L : Programmed Death Ligand.

PI3K/AKT : la phosphoinositide-3-kinase/protéine kinase B.

PIK3CA : Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha.

Zta : Z transactivator.

pRB : retinoblastoma protein.

PTEN : Phosphatase And Tensin Homolog.

QF-PCR : Quantitative Fluorescent Polymerase Chain Reaction.

RHOA : Ras homolog gene family member A.

RNF43 : Ring Finger Protein 43.

Rta : Replication and Transcription Activator.

SMAD4 : Mothers Against Decapentaplegic Homolog 4.

SMARCA4 : SWI/SNF Related, Matrix Associated, Actin Dependent Regulator Of Chromatin, Subfamily A, Member 4.

STAT3 : Signal Transducer And Activator Of Transcription 3.

STK11 : Sérine/Thréonine Kinase 11.

TGF- β : Transforming Growth Factor- β .

TP53 : Tumor Protein 53.

TP73 : Tumor Protein 73.

VEGFR2 : Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2.

Wnt : Wingless.

ZEBRA : BamHI Z Epstein-Barr Virus Replication Activator.

Liste des figures

Figure 1 : Les classifications moléculaires.....	11
Figure 2 : Approches pour la découverte des biomarqueurs pour l'application clinique	13
Figure 3 : La structure et le génome de l'EBV	21
Figure 4 : Cycle de vie d'EBV	24
Figure 5 : Séquence possible des événements dans le développement du carcinome gastrique associé à l'EBV.....	26
Figure 6 : Structure de HPV et organisation génomique	32
Figure 7 : Le cycle de vie des HPV.....	34
Figure 8 : Mécanisme de carcinogénèse du HPV.....	36
Figure 9 : Répartition des cas de cancer gastrique selon le sexe entre 2011 et 2015.....	41
Figure 10 : Répartition des cas de cancer gastrique selon les tranches d'âge entre 2011 et 2015	41
Figure 11 : Répartition annuelle des cas de cancer gastrique entre 2011 et 2015.....	42
Figure 12 : Gel d'agarose (2% ; 1,5%) montrant le profil électrophorétique utilisant des amorces GP5+/GP6+, MY9/MY11 pour la détection du gène HPV-L1 correspondant à 150 pb et à 450 pb respectivement.....	56
Figure 13 : Gel d'agarose (2% ; 1,5%) montrant le profil électrophorétique utilisant des amorces EBNA-1, LMP- 1, correspondant à 262 pb et à 509 pb respectivement	57
Figure 14 : des électrophérogrammes de séquençage Sanger du gène KRAS, (a) : la substitution T>G dans le codon 35, (b) : la substitution C>A dans le codon 37	64

Liste des tableaux

Tableau 1 : Répartition des dix premiers sites du cancer à Tlemcen par incidence entre 2011 et 2016.....	40
Tableau 2 : Répartition des cas de cancer gastrique selon la topographie entre 2011 et 2015	42
Tableau 3 : Répartition des cas de cancer gastrique selon le stade entre 2011 et 2015.....	43
Tableau 4 : composition pour une réaction PCR.....	52
Tableau 5 : composition pour une réaction PCR.....	53
Tableau 6 : Les caractéristiques cliniques des patients	55
Tableau 7 : composition pour une réaction PCR.....	63
Tableau 8 : Répartition des variantes de KRAS	65
Tableau 9 : distribution des caractéristiques tumorales selon le statut KRAS.....	66

Introduction

Introduction

Le cancer gastrique (CG) qui est l'un des cancers les plus répandus dans le monde, est une maladie agressive avec une survie médiocre à 5 ans (**Matsuoka et Yashiro, 2018**) où plus d'un million de nouveaux cas et environ 800 000 décès ont été diagnostiqués en 2020 (**Ilic et Ilic, 2022**). En considérant les deux sexes, c'est le 5ème néoplasme le plus fréquent et la 3ème cause de mortalité parmi les tumeurs malignes. L'incidence varie d'une région à l'autre, mais 50 % des nouveaux cas sont diagnostiqués dans les pays développés. Une incidence élevée est observée en Asie, en Amérique latine et dans les régions centrales et orientales de l'Europe (**Cuzzuol et al., 2020**). En Algérie, l'incidence de ce cancer est de 5,7/100 000 habitants, la situant à un niveau intermédiaire au sein du monde arabe, sans être parmi les plus élevées ni parmi les plus basses (**Aoude et al., 2022**).

Le CG est une maladie multifactorielle (**Ilic et Ilic, 2022**), dont la majorité des cas sont associés à des agents infectieux, notamment la bactérie *Helicobacter pylori* (*H.pylori*) et le virus Epstein-Barr (EBV) (**Cancer Genome Atlas Research Network, 2014**). Ce virus a été le premier virus tumoral identifié chez l'homme, est considéré comme un cancérogène de classe I par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) (**Münz, 2019**). Il est largement répandu dans la population générale (**Wang et al., 2019**) et joue un rôle dans la pathogenèse de multiples cancers lymphoïdes et épithéliaux, y compris le lymphome de Burkitt, le lymphome hodgkinien, le lymphome à cellules NK/T, le carcinome nasopharyngé, le cancer du sein (**Atri-Schuller et al., 2022**), et est également connu pour être présent dans une proportion des tissus cancéreux gastriques (**Wang et al., 2019**).

Outre l'EBV, d'autres oncovirus, en particulier le papillomavirus humain (HPV), peuvent être associés au risque de CG (**Wang et al., 2020**). L'infection par ce virus est l'une des infections sexuellement transmissibles les plus courantes dans le monde, affectant à la fois les femmes et les hommes (**Ouhoumane, 2013**). Les HPV à haut risque, sont associés au développement de certains cancers de l'épithélium muqueux, principalement le cancer du col de l'utérus, mais aussi de l'anus, de la vulve, du pénis, de la bouche, du larynx, de l'œsophage et éventuellement de l'estomac (**Fakhraei et al., 2016**).

Sur le plan moléculaire, le CG se caractérise par une hétérogénéité intra- et inter-tumorale, où différents sous-clones tumoraux coexistent et contribuent à la diversité génétique et phénotypique (**Holm et al., 2023**). Cette maladie dévastatrice est associée un mauvais

pronostic, ce qui souligne l'urgence d'approfondir nos connaissances sur les mécanismes moléculaires et les caractéristiques cliniques qui y sont associés (**Nie *et al.*, 2017**).

Par ailleurs, le CG est souvent diagnostiqué à un stade avancé et étant généralement asymptomatique jusqu'à ce stade, malgré des améliorations significatives de la survie des patients, la détection précoce grâce à des approches de dépistage efficaces est importante pour réduire la mortalité par ce cancer. Pour ces raisons, l'identification et le développement des biomarqueurs dans le domaine du traitement du cancer devraient largement, joueront un rôle essentiel en facilitant sa prise en charge, la sélection de stratégies thérapeutiques appropriées et la mise en place de programmes de suivi efficaces [(**Matsuoka et Yashiro, 2018**) ; (**Necula *etal.*, 2019**)].

Ces dernières années, de nombreuses études de séquençage de nouvelle génération ont caractérisé les bases génomiques et identifié de nombreux facteurs génétiques exploitables dans le CG (**Wang *et al.*, 2020**). En ce qui concerne les mutations somatiques, il a été rapporté que TP53, KRAS, ARID1A, PIK3CA, ERBB3, PTEN et HLA-B sont les gènes couramment mutés (**Ito *et al.*, 2019**). Le gène KRAS en particulier, des suggestions ont été avancées concernant son rôle notable dans ce type de cancer (**Wei *et al.*, 2018**), et il est rapporté que l'évaluation des mutations KRAS peut aider à la sélection des patients éligibles au traitement spécifiques (**Lu *et al.*, 2015**).

Cette étude vise d'une part à évaluer le profil épidémiologique du cancer gastrique dans la Wilaya de Tlemcen sur une période spécifique afin de déterminer la prévalence, l'incidence et les caractéristiques de la maladie. D'autre part, ce travail consacre une partie à la détection des infections aux virus du HPV et d'EBV dans des tissus des CG des patients de l'ouest algérien par une méthode de biologie moléculaire car la recherche de facteurs de risque infectieux permet non seulement de comprendre les mécanismes de la cancérogenèse, mais aussi de développer des approches immunitaires spécifiques prophylactiques telles que les vaccins ou thérapeutiques. Le dernier volet est consacré à l'évaluation du statut mutationnel de l'exon 2 du gène KRAS dans le CG ce qui permet d'évaluer son rôle et son applicabilité en tant que marqueur d'une thérapie ciblée.

PARTIE I : Rappel Théorique

Chapitre 1 : Le cancer gastrique

1. Variation épidémiologique du cancer gastrique

Le CG est l'un des cancers les plus courants dans le monde et son pronostic est sombre, comme en témoigne le taux de survie à 5 ans vu que la plupart des cas sont déjà métastatiques au moment du diagnostic (**Wong et al., 2021**). Au total, environ 1,1 million de nouveaux cas et 770 000 décès par ce cancer ont été estimés en 2020. Les taux d'incidence étaient en moyenne 2 fois plus élevés chez les hommes que chez les femmes (15,8 et 7,0 pour 100 000 habitants, respectivement) avec des variations d'un pays à l'autre (**Morgan et al., 2022**).

Sur le plan géographique, la grande majorité des cas du CG surviennent dans des pays à indice de développement humain élevé et très élevé. Les taux d'incidence les plus élevés se trouvent en Asie de l'Est et du Sud-Est (**Thrift et El-Serag, 2020**).

En Afrique, d'incidence est faible inférieur à 5/100 000 (**Morgan et al., 2022**). En Algérie ce cancer occupe lacinquième position des cancers les plus fréquents chez l'homme (8,4/100,000) et la femme (5,9/100,000) (**Bounedjar et al., 2022**).

Le CG est une maladie multifactorielle qui dépend de divers facteurs de risque. En général, il existe une différence de risque de 15 à 20 % entre les populations à haut risque et à faible risque (**Ramazani et al., 2021**).

L'incidence et la prévalence du CG ont diminué de 1990 à 2017 dans le monde (**Ramazani et al., 2021**), par contre ce fardeau annuel devrait augmenter pour atteindre environ 1,8 million de nouveaux cas et environ 1,3 million de décès d'ici 2040 (**Morgan et al., 2022**).

2. Anatomie et organisation histologique de l'estomac

L'estomac est la partie la plus large du tube digestif, est composé de 4 régions principales (**Chaudhry et al., 2022**) :

- **Le cardia** : est relié à l'œsophage et est l'endroit où la nourriture pénètre d'abord dans l'estomac.

- **Le fundus** : est la partie qui se projette vers le haut au-dessus du niveau de l'orifice cardiaque. Se trouvant à gauche de l'œsophage abdominal.
- **Le corpus ou corps** : s'étend de l'orifice cardiaque jusqu'au niveau de l'échancrure angulaire, C'est la plus grande partie de l'estomac.
- **Le pylore** : Après le corps se trouve le pylore, il comprend l'antra pylorique proximale et le canal pylorique distale [(Mahadevan, 2014) ;(Chaudhry et al., 2022)].

Histologiquement l'estomac a quatre couches de la plus externe à la plus interne :

- **La péritoine ou séreuse**: est constituée de plusieurs couches de tissu conjonctif qui se connectent également en continu avec le péritoine.
- **La musculuse externe (propria)** : est composée de trois couches de muscles (oblique interne, circulaire médiane et longitudinale externe). La couche oblique interne est unique à l'estomac et est principalement responsable du barattage et de la digestion mécanique des aliments. La couche circulaire moyenne est concentrique avec l'axe longitudinal de l'estomac et s'épaissit dans la région du pylore pour former le sphincter pylorique responsable de la régulation de la sortie de l'estomac dans le duodénum. La couche suivante est la couche longitudinale externe, mais entre cette couche et la couche circulaire moyenne, se trouve le plexus d'Auerbach (myentérique), qui est une région d'innervation pour les deux couches musculaires adjacentes. La couche longitudinale externe facilite le mouvement des aliments en direction du pylore via le raccourcissement musculaire.
- **La sous-muqueuse** : représente la couche la plus résistante de l'estomac, elle est composée de tissu conjonctif dense et contient des vaisseaux sanguins et lymphatiques ainsi que des nerfs.
- **La muqueuse** : est divisée en muqueuse musculaire, lamina propria et épithélium de surface, elle est recouverte de tissu épithélial et se compose principalement de glandes gastriques qui sécrètent le suc gastrique [(Landa et al., 2019) ; (Chaudhry et al., 2022)].

3. Mécanismes moléculaires de la carcinogénèse gastriques

Démêler les mécanismes moléculaires sous-jacents à la cancérogénèse gastrique est l'un des défis majeurs de la génomique du cancer (Hudler, 2012). Des recherches récentes, qui ont employé des méthodes multiplateformes pour effectuer des analyses génomiques exhaustives

sur ce cancer, ont mis en lumière la complexité moléculaire associée à cette pathologie (**Figueiredo et al., 2015**).

Le CG est le résultat d'un processus à plusieurs étapes influencé par divers facteurs tels que l'infection à *H. pylori*, la prédisposition génétique de l'hôte ainsi que d'autres facteurs environnementaux. Il se caractérise par l'accumulation de nombreuses altérations génétiques et épigénétiques au niveau des oncogènes et des gènes suppresseurs de tumeurs. Ces altérations entraînent une perturbation des multiples voies de signalisation, affectant le cycle cellulaire ainsi que l'équilibre entre la prolifération cellulaire et la mort cellulaire (**Berger et al., 2016**), notamment les voies MAPK, HER2, PI3K/AKT/mTOR, HGF/c-Met, p53, Wnt/ β -caténine, FGF/FGFR, HIF-1 α , Claudin 18.2, TGF- β , STAT3, NF- κ B, PD-1/PD-L1 et CTL4 (**Baccili et al., 2023**).

Les altérations génétiques englobent des mutations ponctuelles, de petites insertions et délétions, ainsi que des gains et des pertes chromosomiques, incluant des amplifications génétiques (**Yoda et al., 2015**). Les mutations du gène TP53 représentent les aberrations génétiques les plus fréquentes dans les GC, étant présentes dans environ la moitié des cas. D'autres mutations sont observées dans plusieurs gènes, notamment CDH1, ARID1A, KRAS, PIK3CA, APC, CTNNB1 et SMAD4 (**Usui et al., 2021**). Par ailleurs, d'autres gènes conducteurs tel que MUC6, CTNNA2, GLI3, RNF43, RHOA ont été trouvés significativement mutés dans ce cancer (**Wang et al., 2014**). Des amplifications de HER2, FGFR2 et MET sont également détectées, et semblent être plus « spécifiques » pour l'un des sous-types histologiques (**Grabsch et Tan, 2013**).

De plus, comme d'autres cancers humains, la tumorigenèse gastrique peut également être profondément influencée par des anomalies épigénétiques (**Shi et al., 2014**). L'épigénétique signifie « l'étude des changements dans la fonction des gènes qui sont héréditaires mitotiquement et/ou méiotiquement et qui n'entraînent pas de changement dans la séquence d'ADN » [(**Dupont et al., 2009**) ; (**Fu, 2015**)]. Ces changements épigénétiques comprennent principalement la méthylation de l'ADN, les modifications post-traductionnelles des histons, le remodelage de la chromatine et les ARN non codants (**Ebrahimi et al., 2020**). L'ensemble, ces processus peuvent conduire à une sous-expression ou à une surexpression des gènes. Cela a conduit à aborder le concept d'épimutation, défini comme le processus provoquant soit la suppression anormale de gènes actifs, soit l'activation anormale de gènes inactifs (**Patel et al., 2017**). Dans le CG, les altérations épigénétiques sont reconnues à la fois

comme des événements précoces favorisant la tumeur et à un stade avancé. Les facteurs environnementaux et génétiques, sont capables de remodeler la machinerie épigénétique gastrique, ce qui peut activement faciliter le développement de la gastrite, des ulcères jusqu'à la métaplasie, la dysplasie et la tumeur (**Canale *et al.*, 2020**).

L'une des caractéristiques du développement du cancer est la déstabilisation du génome, également appelée « instabilité génomique », que l'on retrouve dans tous les différents sous-types histologiques de CG et qu'il est considéré comme l'une des premières étapes de la cancérogenèse gastrique. Trois phénotypes d'instabilité ont été identifiés : (1) l'instabilité des microsatellites (MSI) due à un défaut dans la voie de réparation des mésappariements de l'ADN ; (2) l'instabilité chromosomique (CIN) qui se caractérise par un taux accru de perte ou de gain de chromosomes entiers ou de parties de chromosomes au cours de la division cellulaire en raison de mutations dans les gènes contrôlant la ségrégation du matériel génétique pendant la mitose, et (3) le phénotype du méthylateur insulaire de la cytosine et de la guanine (CpG) (CIMP) (**Grabsch et Tan, 2013**), qui a été initialement décrit dans le cancer colorectal et également observé dans un sous-ensemble de CG et qui abrite un degré critique d'hyperméthylation aberrante du promoteur associée au silençage transcriptionnel de plusieurs gènes suppresseurs de tumeurs (**Toda *et al.*, 2015**).

Il est notable que la majorité des changements génétiques associés au CG sont acquis (**McLean et El-Omar, 2014**), et un faible pourcentage (5 à 10 %) survient dans le cadre de syndromes cancéreux héréditaires ou familiaux. Parmi les CG, seulement 1 à 3 % sont héréditaires (**Kole *et al.*, 2020**).

Les syndromes du CG héréditaire comprenant principalement trois types : le CG diffus héréditaire (CGDH), le CG intestinal familial (CGIF) et l'adénocarcinome gastrique formes de polypose proximale de l'estomac (GAPPS) (**Van Der Post *et al.*, 2019**). Des mutations germinales dans certains gènes conducteurs déterminent la prédisposition au développement du CG héréditaire. Le CGDH précoces est causé principalement par des mutations germinales dans CDH1. Outre CDH1, des gènes candidats récemment identifiés incluent CTNNA1, BRCA2 et STK11 peuvent être impliqué dans son développement (**Tan et Yeoh, 2015**). Le CG peut également se situer dans le spectre d'autres syndromes génétiques à risque de tumeur, tels que le syndrome de Lynch (mutations MSH2, MSH6, PMS2 ou MLH1) le syndrome de Li-Fraumeni (mutation germinale TP53), du syndrome de Peutz-Jeghers (mutation STK11) et la polypose adénomateuse familiale (mutation APC) [(**McLean et El-Omar, 2014**) ; (**Yang**

et al., 2020) ; (**Lordick et al., 2022**)]. Le dépistage des mutations de ces gènes pourrait être important pour déterminer les mutations germinales chez les patients présentant à la fois des manifestations précoces et/ou des antécédents familiaux (**Nemtsova et al., 2020**). En effet, Comprendre l'anomalie génétique sous-jacente au CG héréditaire offre non seulement la possibilité de prévenir et de surveiller les personnes affectées, mais également des insights sur la pathologie moléculaire du CG sporadique (**Holland, 2010**).

4. Les classifications histologiques et moléculaires du cancer gastrique

En raison de la nature extrêmement hétérogène du CG sur les plans phénotypique et moléculaire, avec une variabilité importante intra-tumorale, intra-patient et inter-patient, de nombreuses classifications histologiques et moléculaires actuellement disponibles reflètent cette hétérogénéité [(**Gullo et al., 2018**) ; (**Toh et Wilson, 2020**)].

Plus de 50 % des CG sont histologiquement pluriformes et il a été démontré que la variabilité de l'aspect histologique augmente avec l'augmentation de la profondeur d'infiltration dans la paroi. un certain nombre de systèmes de classification différents ont été préconisés : les classifications selon Lauren, Ming, l'Organisation mondiale de la santé (OMS), Nakamura *et al.*, Mulligan, Goseki *et al.*, et Carneiro, ainsi que la classification japonaise. Les classifications les plus couramment utilisées sont celles de Lauren et de l'OMS (**Grabsch et Tan, 2013**).

Selon la classification de Laurén, les adénocarcinomes gastriques sont divisés en sous-types intestinaux, diffus, mixtes et indéterminés (**Lauren, 1965**). Le type intestinal et le type diffus suivent chacun des voies de développement différentes. Pour le type intestinal, le modèle de développement prédit par Correa indique qu'une inflammation gastrique initiale peut ne pas être contrôlée et conduire à une atrophie des muqueuses et à une hypochlorhydrie, ce qui augmente le risque de métaplasie intestinale, de dysplasie et enfin de CG de type intestinal. Bien que l'on sache peu de choses sur le développement du CG diffus, il est admis que *H. pylori* et l'inflammation peuvent également jouer un rôle (**Aviles-Jimenez et al., 2014**).

La classification de 2010 de l'OMS, révisée en 2019, organise le CG en sous-types distincts d'adénocarcinomes, notamment les tumeurs papillaires, tubulaires, mucineuses, peu cohésives (**Baccili et al., 2023**). Cette grande variabilité des histotypes correspond à l'aspect variable de l'adénocarcinome à l'imagerie. En effet, elle peut se présenter sous la forme d'une

masse volumineuse, parfois accompagnée d'une ulcération, comme un épaissement de la paroi gastrique ou une infiltration pariétale diffuse (sans lésion visible), ou encore sous la forme d'une présentation particulière appelée « *linitis plastica* ». De plus, une apparition distinctive mais peu fréquente de CG est celle de l'adénocarcinome mucineux, qui peut se calcifier partiellement. La stadification précise des métastases ganglionnaires tumorales (TNM) du CG est la pierre angulaire (axe central) du pronostic du CG permet d'effectuer la prise de décision la plus précise pour le traitement, de réduire les interventions chirurgicales inutiles et de maximiser la probabilité de bénéficier des traitements sélectionnés (**Renzulli et al., 2020**).

Les systèmes histopathologiques actuels peuvent parfois influencer les choix chirurgicaux, mais ils restent insuffisants pour guider des traitements précis pour chaque patient. Des systèmes de classification alternatifs sont donc nécessaires (**Chia et Tan, 2016**). Deux rapports fondateurs récents qui ont utilisé la technologie de séquençage de nouvelle génération NGS (*Next-Generation-Sequencing*) afin de mieux caractériser la génomique du CG, améliorer la compréhension des aspects génétiques moléculaires et identifier de nouveaux biomarqueurs, qui facilitent le pronostic et l'établissement de nouvelles cibles thérapeutiques, ont proposé deux classifications moléculaires (figure 1) [(**Singh et al, 2021**) ; (**Katona et Rustgi, 2017**)] :

En 2014, dans le cadre du projet de réseau de recherche de l'atlas du génome du cancer (TCGA : *The Cancer Genome Atlas*), les chercheurs ont classé le carcinome gastrique en quatre sous-types moléculaires principaux en effectuant une évaluation moléculaire complète de 295 adénocarcinomes gastriques primitifs. Ces sous-types comprennent notamment :

- Les tumeurs positives pour le virus d'Epstein-Barr (EBV+) : qui présentent des mutations récurrentes de PIK3CA, une hyperméthylation extrême de l'ADN et une amplification de JAK2, CD274 (également connu sous le nom PD-L1) et PDCD1LG2 (également connu sous le nom PD-L2).
- Les tumeurs instables des microsatellites (MSI): qui présentent des taux de mutation élevés, y compris des mutations de gènes codant pour des protéines de signalisation oncogéniques ciblables.

➤ Les tumeurs génomiquement stables (GS) : qui sont enrichies pour le variant histologique diffus et les mutations de RHOA ou les fusions impliquant des protéines activatrices de la GTPase de la famille RHO.

➤ Les tumeurs présentant une instabilité chromosomique (CIN): qui présentent une aneuploïdie marquée et une amplification focale des récepteurs tyrosine kinases (**Cancer Genome Atlas Research Network, 2014**).

En 2015, le groupe asiatique de recherche sur le cancer (ACRG : *Asian Cancer Research Group*) a analysé l'expression de l'ARNm de 300 CG, et a également identifié quatre sous-types moléculaires :

- MSI élevé.
- Microsatellite stable / transition épithéliale-mésenchymateuse (MSS/EMT).
- Microsatellite stable / TP53 intact (MSS/TP53+, p53 actif).
- Microsatellite stable / perte TP53 (MSS/TP53-, p53 inactif) (**Toh et Wilson, 2020**).

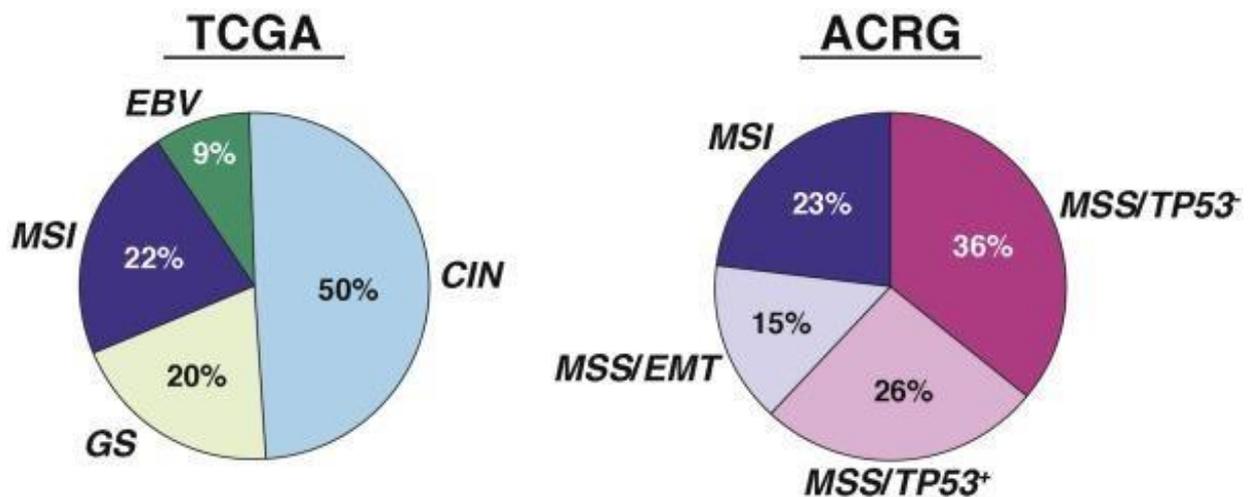


Figure 1 : Les classifications moléculaires (**Katona et Rustgi, 2017**).

5. Les biomarqueurs moléculaire et cancer gastrique

5.1. Définition d'un biomarqueur du cancer

Dans les cancers, les biomarqueurs sont tout indicateur moléculaire mesurable du risque de cancer, de la survenue d'un cancer ou des résultats pour le patient. Ils peuvent inclure des

variantes génétiques germinales ou somatiques, des signatures épigénétiques, des modifications transcriptionnelles et des signatures protéomiques. Ces indicateurs sont basés sur des biomolécules, telles que les acides nucléiques et les protéines, qui peuvent être détectées dans des échantillons prélevés sur des tissus par biopsie tumorale ou, plus facilement et de manière non invasive, sur du sang (ou du sérum ou du plasma), de la salive, des écouvillons buccaux, des selles, de l'urine, etc (**Sarhadi et Armengol, 2022**).

Un bon biomarqueur doit répondre à une série d'exigences : il doit être fiable, détectable par des techniques de laboratoire hautement spécifiques disponibles, avec un taux de faux positifs et négatifs faible (**Garcia-Alfonso et al., 2021**).

5.2. La découverte des biomarqueurs moléculaires du cancer

Malgré que la découverte de nouveaux biomarqueurs est très importante pour développer des médicaments thérapeutiques efficaces, il est difficile de découvrir de nouveaux biomarqueurs spécifiques à molécule unique, nécessitant une connaissance approfondie préalable des voies biologiques associées à une maladie et de la pharmacologie des nouveaux médicaments (**Sempionatto et al., 2022**). Traditionnellement, la recherche biomédicale est fondée sur des hypothèses. Les chercheurs émettent des hypothèses et conçoivent des expériences pour les tester. Les progrès récents dans les technologies à haut débit ont donné lieu à une recherche davantage axée sur la technologie. Plutôt que d'émettre une hypothèse, les chercheurs appliquent des méthodes à haut débit aux systèmes biologiques et recherchent des résultats intéressants qui pourraient conduire à la génération d'hypothèses pour d'autres tests (**Maruvada et al., 2005**). Au cours de la dernière décennie, de nombreuses tentatives ont été faites pour démêler les mécanismes moléculaires de la cancérogenèse impliquant des approches OMICS uniques. Les technologies « OMICS » sont caractérisées par des interfaces à haut débit qui facilitent l'étude génomiques, épigénomique, transcriptomique, protéomiques et métabolomique de manière globale et non biaisée (**Chakraborty et al., 2018**) (figure 2).

Malheureusement, malgré les avancées impressionnantes dans la recherche en biologie tumorale ainsi que dans ces technologies "omiques" de haute puissance, la traduction des biomarqueurs candidats du cancer du laboratoire au chevet du patient est longue et difficile, et seuls quelques tests de marqueurs tumoraux ont été intégrés avec succès dans les soins cliniques de routine des patients oncologiques (**Mordente et al., 2015**).

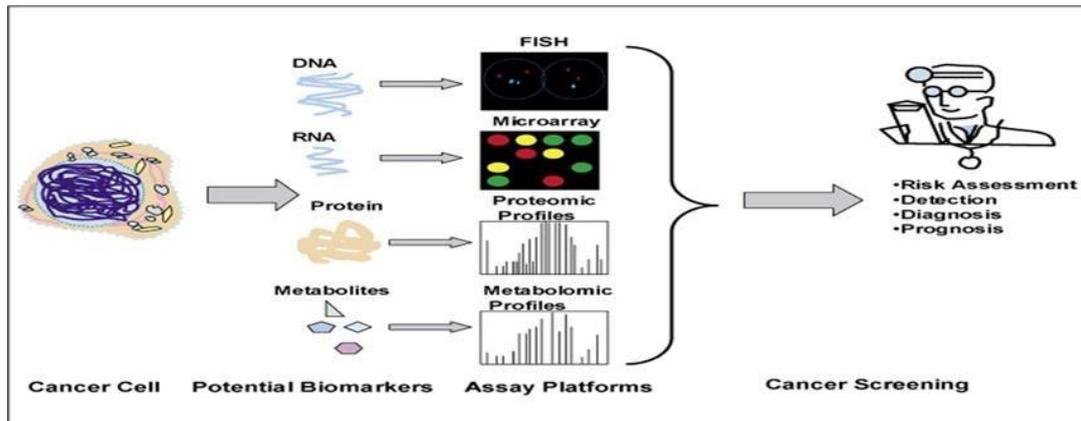


Figure 2 : Approches pour la découverte des biomarqueurs pour l'application clinique (Maruvada *et al.*, 2005).

5.3. Types de biomarqueurs du cancer

Les biomarqueurs du cancer peuvent être classés dans les catégories suivantes en fonction de leur utilisation (Goossens *et al.*, 2015) :

➤ **Les biomarqueurs diagnostiques**

Sont utilisés pour la stratification du risque et la détection précoce, ce qui pourrait prolonger la survie globale (Zygulska et Pierzchalski, 2022).

➤ **Les biomarqueurs pronostiques**

Visent à informer les médecins du risque de résultats cliniques tels que la récurrence du cancer ou la progression de la maladie à l'avenir (Goossens *et al.*, 2015).

➤ **Les biomarqueurs prédictifs**

Évaluent le bénéfice probable d'un traitement particulier (Madu et Lu, 2010). Il est important de noter qu'un seul biomarqueur peut répondre à plusieurs critères pour différentes utilisations. Ainsi, bien que les définitions puissent se chevaucher, elles ont également des caractéristiques distinctives claires qui spécifient des utilisations particulières (Califf, 2018).

5.4. Biomarqueurs du cancer gastrique

Étant donné que le CG est souvent asymptomatique à ses débuts, des méthodes non invasives de détection précoce sont nécessaires de toute urgence (**Hong et Liu, 2022**). Les marqueurs tumoraux gastriques ont été utilisés pour le diagnostic, la détermination du stade clinique, l'évaluation des réponses au traitement et le dépistage des récurrences après un traitement réussi (**Matsuoka et Yashiro, 2018**). Des efforts continus ont été consacrés au développement des biomarqueurs moléculaires (**Wu et al., 2014**). Parmi les biomarqueurs rapportés :

-HER2 : est le premier biomarqueur moléculaire disponible en pratique clinique. Bien que l'importance de la valeur pronostique et prédictive de HER2 ne soit pas établie dans le CG, l'importance de HER2 en tant que biomarqueur est connue. Le trastuzumab est le premier agent moléculaire un agent ciblant HER2 approuvé comme traitement standard en CG (**Matsuoka et Yashiro, 2018**).

-L'antigène carcinoembryonnaire (CEA) : est un marqueur couramment utilisé pour le CG (**Polat et al., 2014**) pour déterminer le pronostic et surveiller les effets thérapeutiques des traitements (**Yu et Zheng, 2018**).

-L'antigène glucidique (CA) 19-9, CA 72-4, CA 125 et alpha-foetoprotéine : ces molécules protéiques ont également été signalées comme étant utiles pour le pronostic et le suivi de la récurrence des CG (**Wu et al., 2014**).

-Le pepsinogène sérique : l'un des biomarqueurs les plus étudiés pour la prédiction des lésions gastriques précancéreuses a été le pepsinogène sérique (sPG). Le pepsinogène I (PGI) est sécrété par les glandes fundiques, tandis que le pepsinogène II (PGII) est produit par les cellules fundiques, pyloriques et la glande de Brunner. Les taux sériques de PGI et de PGII augmentent avec la progression de la gastrite. Au fur et à mesure que la muqueuse de la glande fundique est réduite en raison de la gastrite, les taux sériques d'PGI diminuent progressivement, tandis que les taux sériques de PGII restent stables. Par conséquent, le rapport PGI/PGII sérique (sPGr) diminue avec la progression de la gastrite, ce qui reflète la sévérité de l'atrophie gastrique (**Conti et al., 2023**).

-MSI : De nombreuses études examinant l'association entre le MSI et le pronostic du CG ont été réalisées, dont la majorité ont démontré que le MSI est associé à un comportement moins agressif et à une survie plus favorable. Cependant, des études supplémentaires n'ont indiqué

aucune valeur pronostique pour les MSI (**Jin et al., 2015**). Le statut MSI-H est considéré comme un marqueur pronostique favorable pour les patients atteints d'un CG résécable. Simultanément, il s'agit également d'un facteur prédictif négatif potentiel chez ces patients, car ils pourraient ne pas bénéficier d'une chimiothérapie néoadjuvante/adjuvante (**Nie et al., 2023**).

-PD-L1 : est surexprimé dans environ 40 % des CG appartenant au type EBV-positif. La surexpression de PD-L1 peut être considérée comme un biomarqueur prédictif de la réponse à une thérapie ciblée. Le ciblage de la voie PD1/PD-L1 représente une stratégie prometteuse pour le traitement du CG (**Abbas et al., 2018**).

-CLDN18.2 : La recherche récemment rapportée concernant Claudin18.2 (CLDN18.2), un membre de la famille Claudin, a révélé que CLDN18.2 est associé au développement et à la progression de la tumeur et est situé sur la membrane cellulaire externe. Il est exprimé dans divers types de tumeurs, en particulier dans les cellules cancéreuses gastriques. Ces caractéristiques biologiques suggèrent que CLDN18.2 pourrait être une cible thérapeutique potentielle (**Ye et al., 2020**).

-EGFR : (récepteur du facteur de croissance épidermique) est exprimé dans environ un tiers des CG, et il y a une indication que le nombre élevé de copies est associé à un pronostic défavorable dans ce cancer. À l'inverse, d'autres études suggèrent que l'expression d'EGFR pourrait également être un bon facteur pronostique ou n'avoir aucune signification pronostique du tout. Son rôle pronostique n'a pas encore été établi et reste controversé, bien que des inhibiteurs d'EGFR soient actuellement en cours d'investigation (**Abbas et al., 2018**).

-ARN non codant : Différents ARN non codants, tels que l'ARN long non codant (ARNlnc), l'ARN circulaire (circARN) et le microARN (miARN), sont impliqués dans le développement du CG (**Niclausset et al., 2021**), et certains sont identifiés comme biomarqueurs pronostiques et diagnostics potentiels dans des études par exemple : RP11- 244 K5.6, CircSLIT2, CircTNIK, hsa-miR-21, hsa-miR-133a, has-miR-146b, has-miR-29c [(**Guo et al., 2023**) ; (**Wang et al., 2023**) ; (**Chen et al., 2023**) ; (**Azari et al., 2023**)].

-Altérations épigénétiques : Les marqueurs épigénétiques peuvent être utilisés dans la pratique clinique pour prédire le comportement tumoral et le pronostic du patient atteint d'un CG (**Puneet et al., 2018**).

-Mutations dans des gènes critiques : un rapport affirme que la présence de mutations de KRAS est associée à un pronostic plus sombre chez les patients atteints du CG proximal, et peuvent avoir une valeur prédictive pour la réactivité aux inhibiteurs de l'EGFR-tyrosine kinase dans le CG, similaire à ce qui a été montré dans le cancer colorectal (**Durães et al., 2014**). De plus, plusieurs gènes critiques ont été utilisés comme biomarqueurs de pronostic potentiels dans des revues (**Wu et al., 2014**), notamment TP53, HRAS, BRCA1, PIK3CA, AKT1 et SMARCA4 (**Hong et Liu, 2022**).

-Le microbiome : Des publications récentes ont révélé que la carcinogenèse gastrique est associée à la dysbiose. Les bactéries buccales et d'autres microbes comme *Prevotella intermedia*, *Prevotella oris* et *fusobacterium nucleatum* pourraient également jouer un rôle dans le développement et la progression de cette tumeur maligne. L'analyse du microbiome dans diverses parties du corps et fluides montre un grand potentiel en tant que nouveau biomarqueur non invasif pour le diagnostic et la surveillance de divers maladies (**Jonaitis et al., 2022**).

Bien que de nombreuses études aient été menées sur les biomarqueurs moléculaires, la plupart des biomarqueurs identifiés ont échoué dans les études de validation. Presque tous les patients atteints d'un CG avancée ne peuvent toujours pas être traités par un traitement ciblé et, à l'heure actuelle, aucun marqueur diagnostique n'est disponible pour la prévention secondaire. Pour être en mesure d'utiliser les biomarqueurs associés au CG dans les soins cliniques des patients, examen complet pour déterminer la direction à suivre pour identifier le point précis du biomarqueur qui peut être exploré pour le traitement personnalisé (**Matsuoka et Yashiro, 2018**).

6. Facteurs de risques du cancer gastrique

De nombreux facteurs peuvent jouer un rôle dans le développement du cancer de l'estomac (**Poorolajal et al., 2020**) :

6.1. Les antécédents familiaux

Les antécédents familiaux sont considérés comme l'un des facteurs de risque les plus importants (**Machlowska et al., 2020**). Il a été rapporté que le risque de CG chez les personnes ayant des antécédents familiaux de cette maladie était 2 à 10 fois plus élevé que celui des autres personnes (**Yusefi et al., 2018**).

6.2. Les lésions précancéreuses

Un certain nombre d'affections précancéreuses ont été identifiées comme l'un des facteurs de risque prédisposant au cancer de l'estomac. Parmi celles-ci, on peut citer la gastrite atrophique chronique et la métaplasie intestinale causées par une infection à *H. pylori* ou une auto-immunité (anémie pernicieuse), l'ulcère gastroduodéal, le moignon gastrique après une gastrectomie partielle et les polypes gastriques (**Gullo et al., 2020**).

6.3. Age

L'incidence du CG augmente progressivement avec l'âge (**Karimi et al., 2014**), et est le plus souvent diagnostiquée entre 60 et 80 ans (**Krejs, 2010**). Il a été proposé que l'âge au moment de l'apparition de l'infection à *H. pylori* puisse être déterminant de l'issue de la maladie. L'apparition de l'infection à *H. pylori* tôt dans la vie a été associée à un risque accru de ce cancer (**Compare et al., 2010**).

6.4. Sexe et race

L'incidence du CG est différente selon le sexe, les hommes sont deux à trois fois plus sensibles que les femmes (**Machlowska et al., 2020**).

Il existe des variations significatives dans l'incidence globale du CG entre les différents groupes ethniques vivant dans la même région. La répartition ethnique du cancer du cardia est différente, avec une proportion de Blancs par rapport aux Noirs aux États-Unis et de non-Maoris par rapport aux Maoris en Nouvelle-Zélande (**Kelly et Duggan, 2003**).

6.5. Régime alimentaire

L'alimentation et les habitudes alimentaires sont l'un des facteurs les plus importants de l'incidence du CG. Sur la base des résultats, l'un des facteurs de risque alimentaires mentionnés dans un plus grand nombre d'études (en comparaison avec d'autres facteurs) était un régime salé (**Yusefi et al., 2018**), il a été postulé que l'utilisation continue des doses importantes de sel entraînerait une gastrite atrophique précoce, augmentant le risque ultérieur de cancer de l'estomac (**Kelly et Duggan, 2003**). De plus, les viandes animales grillées et les aliments fumés améliorent probablement la progression du CG (**Machlowska et al., 2020**). Par ailleurs, les facteurs alimentaires protecteurs sont : les fruits et légumes (riches en caroténoïdes, folate, composés phytochimiques et vitamine C) (**Rawla et Barsouk, 2019**).

6.6. Le groupement sanguin

Le rôle des groupes sanguins ABO dans le CG a été initialement suggéré il y a plus de 60 ans, avec l'observation clinique que les patients atteints de CG étaient plus susceptibles d'avoir le groupe sanguin A que les témoins. Depuis, l'association des groupes sanguins ABO et du risque de CG a été largement étudiée ; cependant, les résultats ont été variables (**Mao et al, 2019**).

6.7. Le tabagisme et alcool

La fumée de cigarette contient des produits chimiques mutagènes qui appartiennent aux catégories « probablement cancérigènes » ou « possiblement cancérigènes ». En plus des radicaux libres, la fumée de cigarette est également riche en gaz toxiques de combustion qui peuvent atteindre une concentration très élevée et participer à la formation de radicaux plus importants. Le tabagisme augmente le risque de cancers du poumon, de la vessie, du col de l'utérus, des reins, du larynx (boîte vocale), du pharynx (haut de la gorge), du nez, de la bouche, de l'œsophage (tuyau alimentaire), du pancréas, du foie et de certains types de leucémie et de l'estomac (**Pasupathi et Pichandi, 2011**), mais dans le CG semble agir comme un facteur de risque modéré par rapport aux autres cancers liés au tabac (**de Martel et al., 2013**), donc l'effet du tabagisme sur le CG est dose-dépendant et additif en présence d'autres facteurs de risque. Cependant, le tabagisme passif ne semble pas augmenter le risque (**Lee et Derakhshan, 2013**).

Il a été démontré aussi que la consommation d'alcool augmente le risque du CG, il est connu pour irriter et éroder la muqueuse de l'estomac, entraînant une gastrite, un précurseur du cancer de l'estomac (**Rawla et Barsouk, 2019**).

6.8. Obésité

L'obésité est un problème croissant dans les sociétés modernes et a été associée à une gamme de maladies, y compris le cancer du cardia. Par rapport aux personnes ayant un indice de masse corporelle (IMC) <25, les personnes ayant un IMC de 30 à 35 ont un risque 2 fois plus élevée, et ceux ayant un IMC >40 ont un risque 3 fois du cancer de la jonction œsophagogastrique, y compris le cancer du cardia (**Karimi et al., 2014**).

6.9. Chirurgie gastrique

Étant donné qu'une possible association entre chirurgie gastrique et un CG ultérieur a été observée pour la première fois en 1922, il y a eu de nombreux rapports sur le sujet. De

nombreuses études, y compris des vastes études de suivi à long terme, indiquent un risque accru du CG en particulier 15 ans ou plus après une chirurgie gastrique (**Kelley et Duggan, 2003**).

6.10. Les agents infectieux

Environ 13 à 15 % des cancers humains dans le monde peuvent être attribués à des agents infectieux. Un exemple démonstratif est le CG, qui est fortement associé aux infections causées par la bactérie *H. pylori* et d'autres agents pathogènes (**Palrasu et al., 2021**).

H.pylori est l'une des infections les plus fréquentes affectant plus de 50% de la population mondiale. La plupart des personnes infectées ont une gastrite chronique symptomatique dont une petite minorité développe un CG (**Compare et al., 2010**). Des auteurs ont estimé que 75 % des CG non cardiaques dans le monde sont attribuables à *H. pylori* (**de Martel et al., 2013**). Outre *H. pylori*, différentes bactéries gastriques telles que *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Veillonella*, *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Lachnospiraceae*, *Leptotrichia* et *Clostridium* ont été identifiées comme étant impliquées dans différentes étapes du développement du CG (**Nasr et al., 2020**).

Par ailleurs, divers virus couramment trouvés dans l'estomac semblent également jouer un rôle dans le développement du CG comprennent le virus d'Epstein-Barr (EBV), le virus du papillome humain (HPV), le cytomégalovirus (CMV), le virus John Cunningham (JCV), le virus lymphotrope des cellules T humaines (HTLV-1) et l'hépatite B (HBV) (**Fattahi et al., 2018**).

Chapitre 2 : Le rôle des agents pathogènes viraux (EBV, HPV) dans le cancer de l'estomac

1. Epstein-Barr virus (EBV)

1.1. Généralités

L'EBV a été découvert pour la première fois dans une lignée cellulaire dérivée du lymphome de Burkitt (BL) par Michael Epstein, Yvonne Barr et Bert Achong en 1964 par microscopie électronique, plus tard, il a été reconnu qu'il est très répandu dans le monde entier [(Epstein *et al.*, 1964) ; (Smatti *et al.*, 2018)]. L'EBV est un membre de la famille des virus herpès (Delecluse *et al.*, 2017) qui tirent leur nom du grec herpès signifiant « ramper », appartenant à la famille des *Herpesviridae* (Roizman, 1982).

Dans cette famille, huit virus sont strictement humains et sont la cause des infections dont les manifestations cliniques sont différentes, avec des présentations dermatologiques souvent similaires. On distingue trois sous-familles : *alpha*, *bêta* et *gamma-Herpesviridae* (Bessis et Laurent, 2008). L'EBV est classé dans la sous-famille des *Gammaherpesvirinae*, le genre *Lymphocryptovirus* et l'espèce *herpesvirus Human 4* (Gequelin *et al.*, 2011).

Des études basées sur le séquençage ont révélé l'existence de deux types d'EBV (Gequelin *et al.*, 2011), EBV de type 1 (EBV 1) ou (EBV A) et EBV de type 2 (EBV 2) ou (EBV B), qui se distinguent par les différences au niveau des gènes : l'EBNA2 et de l'EBNA-3A, -3B et -3C (Zanella *et al.*, 2019). Les types EBV 1 et 2 peuvent en outre être subdivisés en différentes souches virales. La plupart des investigations concernant la variabilité génétique des souches d'EBV étaient basées sur l'étude de l'oncogène LMP-1 car il a un degré de polymorphisme plus élevé que la plupart des autres gènes d'EBV (Smatti *et al.*, 2018).

Le mode de transmission d'EBV est essentiellement salivaire, à partir de porteurs sains ou des sujets convalescents, la transmission pouvait aussi intervenir par transfusion sanguine (Lupo *et al.*, 2019).

1.2. Structure et organisation génomique

La structure du virion EBV est similaire à celle des autres herpèsvirus, avec une taille d'environ 120 à 200 nm. Le génome viral est composé d'une molécule d'ADN linéaire double d'environ 172 paires de kilobases (kbp) selon les souches, entourée d'une nucléocapside

icosaédrique de 162 capsomères et d'un tégument. L'ensemble se trouve à l'intérieur d'une enveloppe virale dérivant des membranes (bicouche lipidique) de la cellule hôte qui contient des glycoprotéines dont l'agencement forme des spicules [(Maréchal et Piolot, 2001) ;(Smatti *et al.*, 2018)] (figure 3).

Le génome viral qui code pour plus de 85 gènes, comprenant une série des régions des répétitions directes terminales de 0,5 kb à chaque extrémité (TR), des séquences répétées internes (IR) qui servent à diviser le génome en domaines des séquences uniques courts et longs qui ont la plus grande partie de la capacité de codage (environ 80 régions codantes possibles) [(Rivailler *et al.*, 2002) ; (Zanella *et al.*, 2019)].

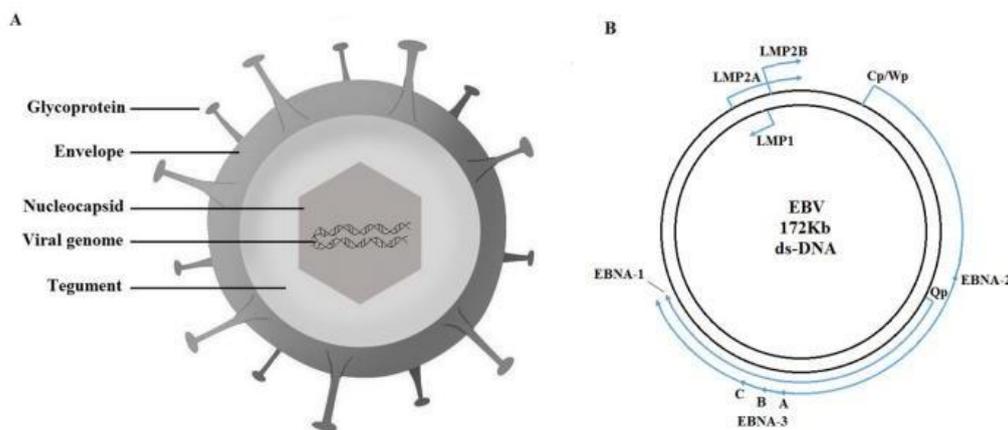


Figure 3 : La structure et le génome de l'EBV (Guan *et al.*, 2019).

1.3. Cycle de « vie » de l'EBV

L'EBV est défini par un cycle de vie viral discret avec des phases d'infection primaire, de latence et de réactivation lytique (figure 4) (Dugan *et al.*, 2019). L'infection par l'EBV est principalement latente, cependant, l'infection lytique est détectée chez les individus séropositifs en bonne santé et devient plus importante dans certaines conditions pathologiques (Mckenzie et El-Guindy, 2015).

1.3.1. Infection primaire et réplication lytique

Le site primaire de l'infection à EBV se trouve dans la muqueuse de l'oropharynx, où les cellules épithéliales et lymphocytes B du tissu lymphoïde local sont infectés. Les cellules B sont les principales cibles de l'infection à EBV, en raison de l'expression de CD21, mais il peut également infecter les cellules épithéliales par des processus distincts (Hatton *et al.*, 2014).

L'EBV se fixe aux cellules B via la liaison de la protéine virale gp350 au CD21, ensuite la glycoprotéine gp42 interagit avec les molécules HLA de classe II des cellules B et déclenche la fusion avec la membrane hôte. Dans les cellules épithéliales dépourvues de CD21, la protéine BMRF-2 de l'EBV interagit avec les intégrines $\beta 1$ et la protéine d'enveloppe d'EBV gH/gL déclenche la fusion via l'interaction avec les intégrines $\alpha\beta 5$, $\alpha\beta 6$, ou $\alpha\beta 8$ [(**Odumade et al., 2011**) ; (**Zuo et al., 2014**) ; (**Tsang et al., 2014**)]. Après fixation, le virus pénètre par endocytose et libère la nucléocapside dans le cytoplasme (**Odumade et al., 2011**). La nucléocapside migre en direction des pores nucléaires et se désintègre progressivement pour laisser la molécule d'ADN viral entrer seule dans le noyau (**Germi et al., 2011**).

Plusieurs rapports suggèrent un modèle dans lesquelles les particules d'EBV infectent les cellules épithéliales de la cavité buccale et subissent une réplication lytique entraînant la production d'une nouvelle progéniture virale. Les particules virales libérées se sont propagées à la sous-muqueuse buccale pour infecter les lymphocytes B circulants et établir une infection primaire. Après son entrée dans les cellules B, l'EBV subit une phase transitoire nécessaire d'expression d'un sous-ensemble de gènes lytiques. L'expression de cet ensemble limité de gènes lytiques précoces est essentielle pour initier et maintenir la latence dans les lymphocytes B nouvellement infectés (**Mckenzie et El-Guindy, 2015**).

1.3.2. La latence virale

La primo-infection des lymphocytes B au niveau de l'oropharynx est suivie d'une phase de latence, qui est caractéristique de l'infection à EBV dans les cellules LB mémoires de l'hôte (**Dieudonne et al., 2021**), dans laquelle le génome de l'EBV est maintenu sous la forme d'un plasmide extrachromosomique circulaire (**Miller, 1990**). Pendant cette phase, certains gènes codés par l'ADN viral sont exprimés dont : 6 polypeptides différents trouvés dans le noyau (EBNA-1, EBNA-2, EBNA-3A, EBNA-3B, EBNA-3C et EBNA-LP), 3 protéines membranaires latentes (LMP-1, LMP-2A et LMP-2B) et 2 petits ARN non codants (EBER1 et 2) et des transcrits de la région BamH1A du génome, les BARTs (**Amiel, 2013**). L'analyse des gènes mutés ou délétés a montré que certaines de ces protéines sont indispensables à la transformation cellulaire (ou immortalisation), en particulier EBNA2, 3A, 3C et LMP1 (**Germi et al., 2011**).

On distingue 4 programmes de latence (III, II, I, 0) liés aux différents stades de maturation des lymphocytes B (**Dieudonne et al., 2021**). un modèle du centre germinal de la persistance de l'EBV, qui porte également le nom d'un schéma de différenciation linéaire de la

latence III (cellules B naïves) à la latence II (cellule B du centre germinal) puis à la latence 0 ou I (cellule B mémoire), a été proposé sur la base d'une régulation négative successive de l'expression latente de la protéine EBV le long de la voie de différenciation des cellules B, suggérant que l'EBV entraîne cette différenciation à travers ses oncogènes (Münz, 2019). Parmi ces quatre types d'expression génique latente décrits, trois (latence III, II et I) sont observés dans les néoplasmes malins associés au EBV (Oleynikova *et al.*, 2021).

➤ **La latence de type III**

Dans les maladies lymphoprolifératives des immunodéprimés, l'EBV exprime un programme de latence de type III (Chau *et al.*, 2006), caractérisée par la co-expression de EBNA2 et EBNA-LP avec EBNA-1, EBNA-3A, EBNA-3B et EBNA-3C, ainsi que LMP1, LMP2A et LMP2B (Kempkes et Robertson, 2015).

➤ **La latence de type II**

Généralement associé à carcinome du nasopharynx associée à l'expression de gènes viraux supplémentaires, tels que LMP1 et LMP2A (Chau *et al.*, 2006).

➤ **La latence de type I**

C'est celle que l'on trouve dans le lymphome de Burkitt endémique et sporadique, est caractérisée par l'expression des gènes viraux EBNA1, EBERS et BART (Chau *et al.*, 2006).

➤ **La latence de type 0**

Dans laquelle l'EBV persiste dans les cellules B où les cellules infectées sans expression d'ARNm ou des protéines latentes (Shah et Young, 2009).

1.3.3. La réactivation

Les cellules B infectées de manière latente peuvent parfois être stimulées pour réactiver l'EBV (Odumade *et al.*, 2011). La réactivation peut être induite *In vitro* par certains réactifs chimiques ou biologiques, par contre *In vivo*, les stimuli ne sont pas clairs (Murata et Tsurumi, 2014). Il a été rapporté que l'EBV se réactive *In vivo* peut passer en phase lytique dans des conditions de stress psychologique avec un affaiblissement conséquent de l'immunité cellulaire (Kerr, 2019). Un sujet immunocompétent, peut avoir une réactivation de l'EBV sans symptômes spécifiques en raison du contrôle de l'infection par les lymphocytes T cytotoxiques. Cependant, chez les patients immunodéprimés, par exemple après une greffe d'organe solide

ou de cellules souches, la réactivation virale est soupçonnée d'entraîner des complications graves (Maurmann *et al.*, 2003).

Lors de la réactivation lytique, l'EBV passe brièvement par trois phases lytiques consécutives comprenant la phase précoce immédiate (IE : *Early Immediate*), précoce (E : *Early*) et tardive (L : *late*). Les gènes viraux IE BZLF1 et BRLF1 sont d'abord transcrits pour coder les transactivateurs, Zta et Rta, respectivement (Li *et al.*, 2016), qui fonctionnent comme des activateurs transcriptionnels et induisent l'expression du niveau suivant des gènes EBV (Adamson et Kenney, 2001). Les gènes viraux précoces sont ensuite activés séquentiellement par ces deux transactivateurs. La plupart des gènes précoces codent pour des protéines responsables de la réplication de l'ADN viral (Chua *et al.*, 2007). Ensuite, la plupart des gènes tardifs commencent à être transcrits, qui codent principalement pour des protéines structurales, conduisant finalement à l'assemblage et à la libération des particules infectieuses (Gruffat *et al.*, 2012). Bien que tous les cancers associés au EBV impliquent le cycle latent, le cycle lytique viral contribue également au développement et au maintien des tumeurs malignes par l'induction de facteurs de croissance et la production de cytokines oncogènes (Li *et al.*, 2016).

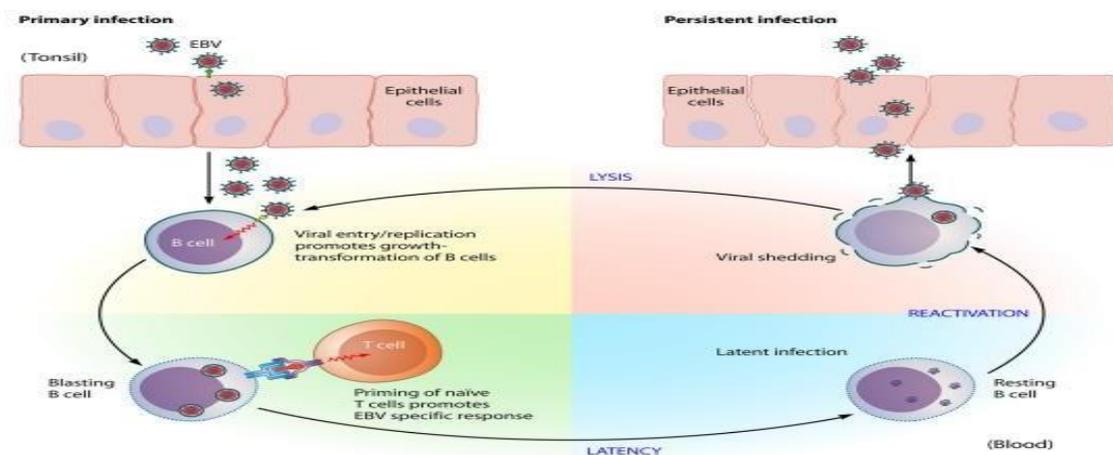


Figure 4 : Cycle de vie d'EBV (Odumade *et al.*, 2011).

1.4. EBV et cancers associés

Plus de 90% de la population adulte dans le monde est chroniquement infectée par l'EBV. Il est bien établi que ce virus est associé à un certain nombre de tumeurs malignes, notamment le lymphome hodgkinien, le lymphome de Burkitt, le lymphome diffus à grandes cellules B, le carcinome nasopharyngé et le carcinome gastrique, il est classé comme

cancérogène du groupe 1 par le centre international de recherche sur le cancer [(Kawa, 2000) ; (Correia *et al.*, 2018) ; (Shen *et al.*, 2021)].

1.5. EBV et cancer gastrique

1.5.1. Epidémiologie

Défini par la présence d'EBV dans les cellules cancéreuses gastriques, le CGaEBV (Cancer Gastrique associé au Virus d'Epstein-Barr) a une incidence annuelle de 75 000 à 90 000 cas par an, ce qui représente la plus grande sous-population parmi les tumeurs liées à l'EBV (Naseem *et al.*, 2018). C'est une maladie non endémique répartie dans le monde. Cependant, il existe certaines différences régionales dans l'incidence du CGaEBV. La variation dans le taux d'incidence dans différentes populations peut être affecter par l'hétérogénéité dans le génome de l'EBV (Correia *et al.*, 2018), ainsi que par des facteurs géographiques et environnementaux, car CGaEBV est légèrement plus fréquente chez les Caucasiens que chez les Asiatiques (Saito et Kono, 2021).

1.5.2. Infection à EBV dans les cellules épithéliales gastriques

Les CGaEBV surviennent suite à une infection à EBV et à la transformation des cellules épithéliales gastriques. Il a été supposé que cela se produit généralement chez les patients souffrant d'inflammation gastrique à long terme, de dysplasie ou de gastrite atrophique chronique (Stanland et Luftig, 2020). Ce sous-type des tumeurs gastriques sont constituées de populations monoclonales de cellules épithéliales infectées par l'EBV. La clonalité du génome viral suggère que l'infection par l'EBV est un événement précoce de cancérogénèse du CGaEBV (Abe *et al.*, 2015).

Le mécanisme de l'invasion par l'EBV dans les cellules épithéliales gastriques n'est pas encore entièrement compris (Ignatova *et al.*, 2020). Il existe actuellement deux théories sur les mécanismes de l'infection à EBV. La première est que l'EBV infecte les lymphocytes B et les cellules épithéliales buccales. Lorsque la salive contenant l'EBV pénètre dans le tube digestif, l'EBV infecte directement les cellules épithéliales de l'estomac. La deuxième théorie est que l'EBV est réactivé d'une manière ou d'une autre dans les lymphocytes B de l'estomac, puis libéré pour infecter les cellules épithéliales (Sun *et al.*, 2020).

La séquence d'événements proposée au sein de la muqueuse gastrique est la suivante : après infection de certaines cellules souches gastriques, l'EBV entre dans la période

d'incubation dans le corps humain, et exprime des gènes viraux latents ; ensuite il provoque la répression médiée par la méthylation de l'ADN des gènes suppresseurs de tumeurs, le déséquilibre de la voie de signalisation cellulaire, l'expression anormale des gènes, la génération d'un microenvironnement tumoral de cellules épithéliales gastriques infectées et l'initiation et le développement du CG (Figure 5) [(Fukayama *et al.*, 2008) ; (Sun *et al.*, 2020)].

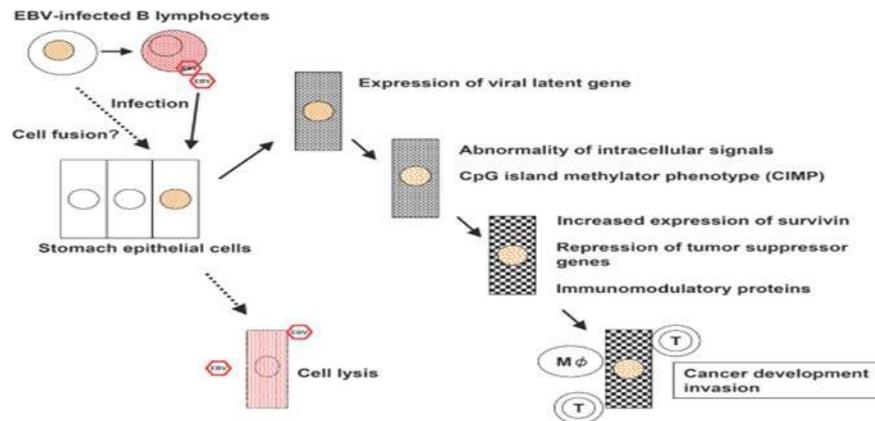


Figure 5 : Séquence possible des événements dans le développement du carcinome gastrique associé à l'EBV (Fukayama *et al.*, 2008).

1.5.3. Types de latences et gènes latents

Il est largement admis que le CGaEBV appartient au type de latence I, où les gènes viraux EBNA1, EBER1/2, UBARTs et LMP2A peuvent être exprimés (Yau *et al.*, 2014). Les deux autres protéines virales représentatives, EBNA2 et LMP1, ne sont pas exprimées dans les néoplasmes de latence I, dont chacun ayant une activité d'immortalisation dans les lymphocytes et une transformation dans les cellules de rongeurs, respectivement (Fukayama, 2010).

Cependant, des découvertes récentes suggèrent que le profil viral latent du CGaEBV correspond à la latence I ou II ; dans cette dernière, les protéines membranaires latent 1, 2A, 2B et l'antigène BARP1 sont également exprimés (Yang *et al.*, 2020).

La transcription des gènes précoces immédiats, BZLF1 et BRLF1, a été détectée dans certains cas de carcinome gastrique sans progression ultérieure du cycle lytique. De même, l'expression de BZLF1 a été observée dans des cellules de carcinome gastrique *In vitro* en

culture à long terme après une infection à EBV, mais très peu d'entre elles ont progressé vers la phase tardive (**Shinozaki-Ushiku et al., 2015**).

1.5.4. Le profil moléculaire

Les profils tumorigènes génétiques et épigénétiques du CGaEBV sont assez différents de celui de l'adénocarcinome gastrique conventionnel (**Yang et al., 2020**).

Une caractéristique frappante du CGaEBV est l'hyperméthylation extrême des CpG, y compris les îlots CpG promoteurs et non promoteurs du génome humain (**Gulley, 2015**), fournissant un mécanisme de contrôle viral des fonctions cellulaires favorisant la persistance et la propagation virales (**Gulley, 2015**). Des études sont actuellement en cours pour déterminer si les cellules hôtes initient la méthylation à l'échelle du génome comme mécanisme de défense ou si l'EBV initie le processus directement. Il a été rapporté que LMP2A induit une surexpression de l' DNMT1 ou DNMT3b de l'hôte et initie une méthylation à l'échelle du génome. Au total, 886 gènes sont connus pour être méthylés, avec une régulation négative d'environ 216 gènes (**Naseem et al., 2018**).

Une analyse complète a classé les CG en trois épigénotypes en fonction de leurs profils de méthylation de l'ADN, à partir desquels un épigénotype extrêmement fortement méthylé (E-HME) a été identifié comme un phénotype unique des CGaEBV (**Usui et al., 2021**). La méthylation de la région promotrice dans APC, p16, MINT1, MLH1, TP73 et HOXA10 a été spécifiquement observée dans le CGaEBV (**Iizasa et al., 2012**).

De plus, non seulement la méthylation de l'ADN, mais également d'autres altérations épigénétiques causées par l'infection à EBV peuvent contribuer à la carcinogenèse (**Usui et al., 2021**).

Le CGaEBV abrite des altérations génétiques particulières, notamment une fréquence élevée de mutations dans PIK3CA, ARID1A et BCOR (**Abe et al., 2015**), et une amplification de JAK2 et PD-L1/L2 [(**Shinozaki-Ushiku et al., 2015**) ; (**Saito et Kono, 2021**)]. Cependant, Presque tous les CGaEBV sont dépourvus de mutation TP53 (**Usui et al., 2021**).

Le EBV peut activer diverses voies de signalisation, telles que le facteur nucléaire κ B, PI3K/AKT, JAK/STAT, MAPK, TGF- β et Wnt/ β -caténine (**Luo et al., 2021**).

1.5.5. Caractéristiques clinico-pathologiques

Les Principales caractéristiques clinico-pathologiques du CGaEBV, comprennent :

- Un taux d'infection élevé chez les hommes à un stade précoce de moins de 65 ans (**Qiao et al., 2019**).
- Une morphologie unique généralement appelé carcinome de type lymphoépithéliome, qui consiste en des nids de cellules tumorales peu différenciés entremêlés à une infiltration lymphocytaire dense (**Shinozaki et al., 2010**).
- La tumeur survient souvent dans l'estomac proximal (cardia et corps gastrique) (**Ignatova et al., 2020**).
- Histologiquement, le CGaEBV présente un type histologique diffus (**Iizasa et al., 2012**).
- Un pronostic relativement meilleur que le carcinome gastrique EBV négatif (**Shinozaki et al., 2010**).
- Près de la moitié des cas sont positifs pour les MUC5AC, MUC6 alors que l'autre moitié sont négatifs pour les MUC2, CD10 (**Abe et al., 2015**).
- Expression de la claudine de type gastrique CLDN18, mais pas le type intestinal CLDN3 (**Abe et al., 2015**).

A l'heure actuelle, les caractéristiques clinico-pathologiques et la signification pronostique de l'infection par l'EBV pour les patients atteints de CG restent controversées (**Li et al., 2023**).

1.5.6. Techniques de détection d'EBV dans le cancer gastrique

Des méthodes de détection biochimiques, sérologiques, immunologiques, histologiques, cytologiques et moléculaires pour détecter l'EBV sont nécessaires à des fins de recherche fondamentale, épidémiologique et de gestion clinique pour différentes maladies. Le développement de méthodes de laboratoire avancées permet un diagnostic rapide et précis des manifestations cliniques, qui à leur tour, peuvent contribuer au pronostic et à la réussite du traitement (**Tonoyan et al., 2020**).

➤ **L'hybridation *In situ* (ISH)**

L'hybridation *In situ* (ISH) de l'ARN codé par l'EBV (EBER) a longtemps été considérée comme l'étalon-or pour leur détection (**Bai et al., 2022**). Cette technique repose sur l'utilisation

de la sonde EBER-1 qui est une séquence de bases qui peut spécifiquement s'anneler au petit ARNm codé par l'EBV. La sonde peut détecter des échantillons du CG fixés par du formaldéhyde et inclus dans de la paraffine, permettant la détection de l'EBV dans les cellules tumorales *In situ* avec une localisation précise et une forte spécificité (**Sun et al., 2020**). Cependant, l'EBER-ISH peuvent générer des résultats faussement négatifs causés par la dégradation de l'ARN (**Bai et al., 2022**).

➤ **L'immunohistochimique (IHC)**

La détection IHC peut être appliquée pour confirmer la présence, la distribution, la localisation de l'EBV dans les cellules/tissus et distinguer l'infection latente de l'infection lytique en fonction des profils d'expression des protéines, elle implique la coloration des protéines clés de l'EBV telles que EBNA1, EBNA2, LMP1, LMP2A et BZLF1 (**Tonoyan et al., 2020**). Cependant, par rapport à l'ISH, les méthodes immunohistochimiques présentent l'avantage d'étapes simples, d'un fonctionnement pratique, d'une sensibilité élevée et d'un faible prix, ce qui en fait une méthode de dépistage primaire fiable pour l'EBV. Les positifs immunohistochimiques peuvent être suivis par ISH pour exclure la possibilité de faux positifs. La combinaison des deux méthodes pourrait améliorer la précision de la détection en réduisant les risques de faux positifs et négatifs (**Sun et al., 2020**). En outre, comme l'évaluation de l'intensité de coloration de l'IHC est subjective, l'ambiguïté dans l'évaluation des résultats et la variabilité inter- ou intra-observateur peuvent être problématiques (**Tonoyan et al., 2020**).

➤ **Les méthodes basées sur la PCR**

Les méthodes basées sur la PCR sont largement utilisées pour le diagnostic de l'infection à EBV car elle a la sensibilité nécessaire pour détecter l'EBV dans tous les tissus d'individus séropositifs. De plus, cette méthode permet d'étudier des biopsies qui ont été paraffinées et conservées dans des dossiers, ce qui permet des études rétrospectives [(**Dias et al., 2009**) ; (**Weiss et Chen, 2013**) ; (**Tavakoli et al., 2020**)]. La PCR quantitative est fréquemment utilisée en milieu clinique pour évaluer la charge d'EBV chez les patients [(**Weiss et Chen, 2013**) ; (**Shuto et al., 2019**)].

La PCR numérique en gouttelettes (ddPCR) est la méthode la plus récente pouvant être utilisée dans la détection de plusieurs virus. Pour le CGaEBV, cette méthode de dépistage a été mise en place en 2019 (**Sun et al., 2020**), comme nouvelle méthode pour une détection hautement sensible et quantitative de l'EBV (**Shuto et al., 2019**), elle permet de calculer la

charge EBV-ADN en fonction du nombre de copies de fragments EBV BamH1-W et défini la valeur seuil de la charge EBV-ADN (Sun *et al.*, 2020).

➤ **Techniques de séquençage**

Le séquençage du génome est une alternative potentielle pour l'identification d'EBV dans le CG (Sun *et al.*, 2020). Camargo *et al.* (2016) suggèrent que les plates-formes de séquençage de nouvelle génération pourraient remplacer avec précision les ISH conventionnelles. Cependant, il existe plusieurs obstacles potentiels à la mise en œuvre pratique pour une utilisation de routine.

2. Papillomavirus Humain (HPV)

2.1. Généralités

Les papillomavirus appartenant à la famille des *Papillomaviridae* composée de plus de 240 types viraux distincts (Van Doorslaer, 2013), capables d'infecter l'homme et de nombreux mammifères, avec une spécificité d'espèce étroite, et peut provoquer des tumeurs bénignes et malignes chez l'homme et l'animal (Alain *et al.*, 2010).

Chaque type des papillomavirus est nommé séquentiellement en utilisant le nom scientifique de l'espèce hôte, plus de 200 types provenant de l'homme ont été isolés et entièrement séquencés [(Tommasino, 2014) ; (Lepiller *et al.*, 2021) ; (Abouelkhair et Kennedy, 2022)].

Les *Papillomaviridae* sont actuellement divisés en 39 genres distincts, les lettres alpha à pi ont été employés pour créer leurs nomenclatures (Abouelkhair et Kennedy, 2022). Les HPV peuvent être trouvés dans cinq genres différents (*alpha*, *beta*, *gamma*, *mu*, *nu*) dispersés dans l'arbre phylogénétique (Van Doorslaer, 2013). Le genre gamma comprend la majorité des HPV connus, suivis des genres *alpha* et *bêta*. Les genres mu et nu ne comprennent respectivement que 3 et 1 types (Gheit, 2019).

Environ un tiers de tous les types du HPV sont classés comme des HPV muqueux appartenant au genre alpha, et ciblent spécifiquement la muqueuse génitale et peuvent être classés en risque élevé et risque faible en fonction de leur oncogénicité. Les HPV à faible risque (ex : HPV6 et 11) induisent des lésions hyper-prolifératives, entraînant souvent des verrues génitales, mais évoluent rarement vers un néoplasie de haut grade et un cancer malin invasif.

En revanche, il existe environ 12 à 15 génotypes à risque élevé (ex : HPV 16, 18, 31 et 45) liés au développement des lésions précancéreuses et cancéreuses, alors que les HPV à tropisme cutané appartiennent essentiellement aux genres beta, gamma, mu et nu responsables du développement des verrues et papillomes [(Segondy, 2008) ; (Badoual *et al.*, 2013) ; (Mac et Moody, 2020)].

La voie de transmission du HPV se fait principalement par contact peau à peau ou peau à muqueuse. La transmission sexuelle est la plus documentée, mais il y a eu des études suggérant des voies non sexuelles (Petca *et al.*, 2020).

2.2. Structure et organisation génomique

Les papillomavirus sont de petits virus (52 à 55 nm de diamètre) non enveloppés, dont la capsid est organisée selon une symétrie icosaédrique. Les 72 capsomères qui constituent cette capsid sont composés des protéines L1 et L2 (Prétet *et al.*, 2007). Leur génome est un ADN double brin circulaire et mesure environ 8 paires de kilobases (Figure 6) (Graham, 2010), il peut schématiquement être divisé en trois régions bien distinctes [(Roncin *et al.*, 2009) ; (Morshed *et al.*, 2014)] :

- ✓ Une région non structurale ou "précoce" (E : *Early*) d'environ 4 kpb codant pour les protéines E1, E2, E3, E4, E5, E6 et E7 impliquées dans les mécanismes de réplication, de transcription et de transformation cellulaire [(Roncin *et al.*, 2009) ; (Eide et Debaque, 2012) ; (Morshed *et al.*, 2014)].
- ✓ Une région "tardive" (L : *Late*) d'environ 3 kpb codant pour les 2 protéines formant la capsid L1 et L2 [(Roncin *et al.*, 2009) ; (Graham, 2010)].
- ✓ Une région non codante d'environ 1 kpb dont le rôle est de réguler la réplication et l'expression des gènes viraux ; elle est appelée URR (*Upstream Regulatory Région*) ou LCR (*Long Control Region*) (Roncin *et al.*, 2009), et contient des signaux de transcription et l'origine de réplication de l'ADN viral (Denis *et al.*, 2008).

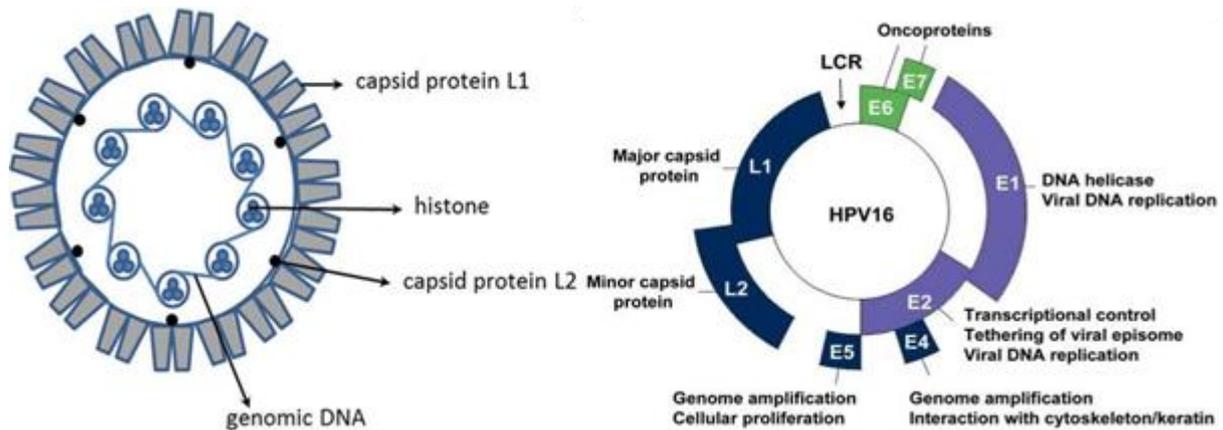


Figure 6 : Structure de HPV et organisation génomique [(D'abramo et Archambault,2011) ; (Panczyszyn *et al.*, 2018)].

2.3. Le cycle infectieux des papillomavirus

Les HPV sont des pathogènes exclusivement intraépithéliaux, l'infection et la croissance végétative du virus dépendent absolument de l'expression du programme complet de différenciation des kératinocytes (Pinidis *et al.*, 2016) (figure 7).

En raison de la capacité de codage limitée, les HPV soutiennent la réplication virale en manipulant la machinerie de réplication et de réparation de l'ADN de la cellule hôte. Deux promoteurs viraux, précoce et tardif, régulent l'expression des gènes viraux et sont actifs à différents stades du cycle de vie (Mac et Moody, 2020).

2.3.1. L'entrée cellulaire et décapsidation du virus

Les virions du HPV envahissent les zones endommagées de l'épithélium et infectent les cellules basales. Bien que le récepteur de l'infection à HPV n'ait pas été complètement caractérisé, le modèle suivant a été postulé ; les virions se fixent initialement au protéoglycane sulfate d'héparane (HSPG) sur la membrane basale épithéliale à travers la protéine L1 (Kajitani *et al.*, 2012). Ensuite le virus est internalisé via la formation de vésicules d'endocytose puis décapsidé (Roncin *et al.*, 2009), et l'ADN viral est transloqué au niveau du noyau de la cellule via la protéine mineure de capside L2 (Doorbar, 2006).

2.3.2. La maintenance du génome virale

Après l'entrée dans le noyau, l'ADN du HPV est maintenu sous forme d'un épisode à faible nombre de copies (environ 200 copies par cellule) (**Doorbar et al., 2012**) dans les cellules basales et parabasales de l'épithélium (**Prétet et al., 2007**) en division en tant qu'éléments de réplication extrachromosomiques qui se répliquent en synchronisation avec l'ADN cellulaire hôte d'une manière dépendante du cycle cellulaire (**Mcbride, 2008**).

Dans cette phase du cycle de vie, l'expression des oncogènes E6 et E7 des HPV à haut risque est sous contrôle strict, et les transcrits de ces oncogènes sont à peine détectables dans le compartiment proliférant de l'épithélium (**Pinidis et al., 2016**), et c'est grâce aux gènes précoces E1 et E2 que la réplication de l'ADN viral et sa ségrégation est assurée de sorte que les cellules infectées peuvent être maintenues dans la lésion pendant une longue période (**Grm et al., 2009**). Le maintien du génome en tant que statut épisomique est essentiel pour l'établissement de la phase précoce du cycle de vie viral (**Kajitani et al., 2012**).

2.3.3. Réplication productive du HPV

Au fur et à mesure que les cellules basales infectées se divisent, l'ADN viral est réparti en cellules filles, dont l'une migre loin de la couche basale et commence la différenciation terminale. La différenciation épithéliale induit la phase productive du cycle de vie viral, conduisant à l'activation du promoteur tardif et à l'expression de gènes viraux tardifs (E4, E5, L1, L2), ainsi qu'à des niveaux élevés de E1 et E2 qui conduisent l'amplification du génome viral (**Mac et Moody, 2020**), vraisemblablement par un mécanisme de réplication de type « en cercle roulant », le nombre de génomes viraux est largement augmenté dans chaque cellule (plus de 1000 copies) (**Prétet et al., 2007**).

Le fait que la réplication efficace de l'épisode du HPV repose sur des facteurs de la cellule hôte qui sont exprimés en phase S, et donc normalement non synthétisés dans les kératinocytes post-mitotiques en différenciation, représente un défi particulier pour le virus. Pour contourner ce problème, les HPV ont développé un processus médié principalement par les produits géniques viraux E6 et E7 pour induire les cellules infectées à entrer en phase S tout en maintenant leur état différencié (**D'abramo et Archambault, 2011**). Les protéines E6 et E7 inactivent p53 et la protéine de rétinoblastome (pRb) respectivement, ce qui permet aux cellules de maintenir leur potentiel de réplication de l'ADN (**Kajitani et al., 2012**).

La protéine E4, qui s'accumule à des niveaux très élevés dans les cellules supportant la synthèse de virus, peut en fait avoir une fonction primaire dans la libération ou la transmission de virus, l'optimisation de l'amplification du génome se produisant comme une conséquence indirecte de son expression (Doorbar *et al.*, 2015).

2.3.4. Assemblage et libération

L'expression des protéines de capsid immunogènes L1 et L2 dans des cellules suprabasales hautement différenciées permet l'assemblage et la libération du virion dans le milieu extérieur par voie de desquamation cellulaire [(Mougin *et al.*, 2000) ; (Mac et Moody, 2020)].

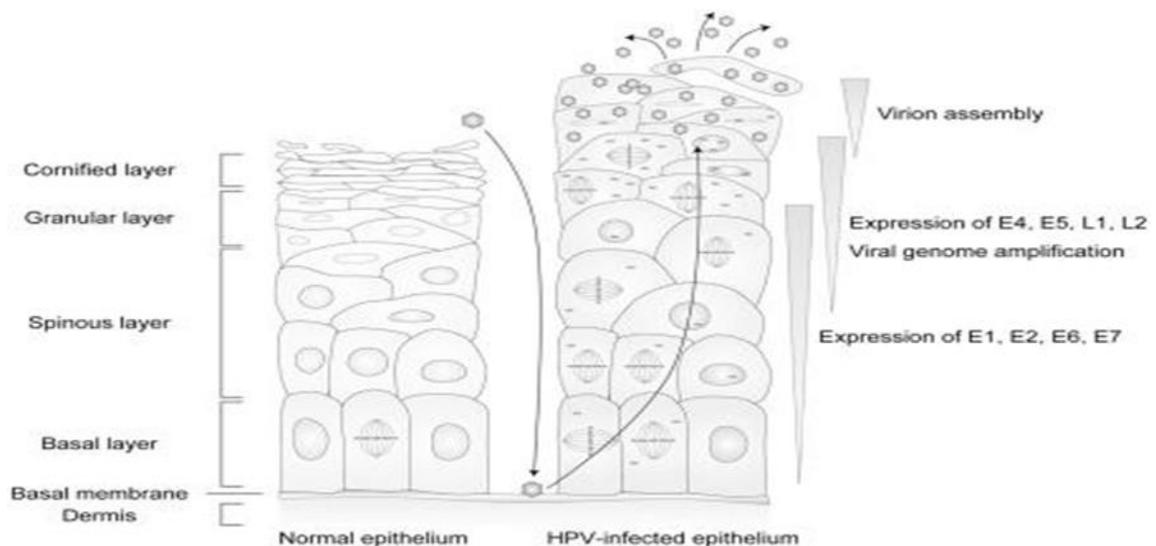


Figure 7 : Le cycle de vie des HPV (Kajitani *et al.*, 2012).

2.4. Mécanisme de carcinogénèse

L'un des événements clés de la carcinogénèse induite par le HPV est l'intégration du génome de ce virus dans un chromosome hôte (Munger *et al.*, 2004), qui serait un événement permettant de distinguer le HPV de haut risque et l'HPV de bas risque. Le génome des HPV de haut risque a une plus grande propension à s'intégrer dans le génome des cellules hôtes, alors que celui des HPV de bas risque est le plus souvent maintenu sous une forme épisomale extra-chromosomique (Roncin *et al.*, 2009). Cette intégration influence à la fois le génome viral et le génome de l'hôte. Les gènes viraux tels que les régions E1, E2, E5 et L2 sont perturbés par

l'intégration et par conséquent, les oncogènes E6 et E7 sont surexprimés en l'absence de protéine répresseur E2 (**Senapati et al., 2016**).

Les cellules qui expriment E6/E7 à partir de séquences HPV intégrées ont un avantage de croissance sélective par rapport aux cellules avec des génomes HPV épisomiques (**Munger et al., 2004**). La surexpression des protéines oncogéniques E6 et E7 des HPV à haut risque conduit à la dérégulation du cycle cellulaire, et donc jouent un rôle essentiel dans l'immortalisation, la transformation et la carcinogenèse cellulaires. E6 et E7 expriment leur activité oncogène principalement par le biais d'interactions protéine-protéine avec des protéines suppresseurs de tumeurs pour inhiber leurs fonctions (Figure 8) [(**Badoual et al., 2013**) ; (**Deniz et al., 2022**)].

L'oncoprotéine E6 fournit le potentiel d'immortalisation cellulaire à partir de deux mécanismes qui incluent des actions dépendante ou indépendante de la protéine P53 (**Almonacid Urrego et al., 2021**). Au niveau de son effet sur p53, l'oncoprotéine E6 du HPV, l'ubiquitine ligase cellulaire E3 (E6AP) et p53 créent un complexe ternaire qui provoque la dégradation de p53 et une diminution subséquente de ses niveaux cellulaires (**Deniz et al., 2022**). Dans le mécanisme, qui contient des actions indépendantes de la protéine p53, E6 a la capacité d'interagir avec les kinases il accélère la mitose, la prolifération, la polarité et l'adhérence des cellules (**Almonacid Urrego et al., 2021**).

La protéine virale E7 se lie à la protéine du rétinoblastome (pRB) et conduit à sa dégradation (**Baboual et al., 2013**), ce qui entraîne la libération de facteurs E2F et l'activation de gènes impliqués dans la prolifération cellulaire (**Baj et al., 2022**). Ainsi, cette protéine se lie avec une forte affinité à la protéine p105Rb, favorise sa dégradation, et peut également séquestrer p107 sans affecter sa stabilité. Peu de données sont disponibles sur l'interaction entre E7 et p130 (**Mougin et al., 2008**).

La protéine E5 semble aussi jouer un rôle dans le processus de transformation tumorale, (**Badoual et al., 2013**), elle augmente l'action des kinases cellulaires qui aident à la prolifération et diminuent la différenciation cellulaire (**Almonacid Urrego et al., 2021**).

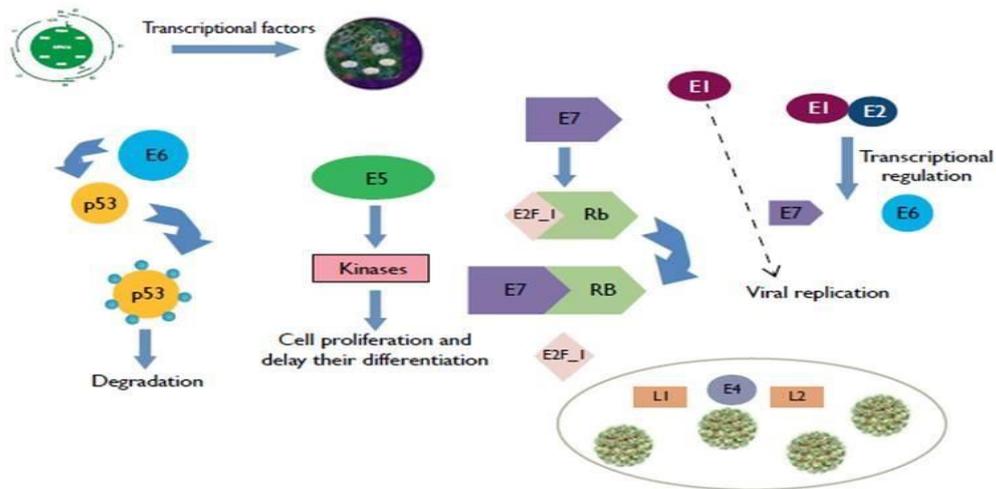


Figure 8 : Mécanisme de carcinogénèse du HPV (Almonacid Urrego *et al.*, 2021).

2.5. HPV et cancers associés

L'infection au HPV est une cause majeure des maladies bénignes et certains types de cancer (Chaturvedi, 2010), il est responsable d'environ 5% de tous les cancers causés par des agents infectieux. La relation causale entre l'infection par le HPV et le cancer du col de l'utérus, qui héberge ce virus dans jusqu'à 99,7 % des cas, a été mise en évidence par Harald zur Hausen, et qui lui a valu un prix Nobel en 2008 (Smola, 2017). Néanmoins, l'infection par le HPV peut être liée à d'autres types de cancers, comprenant les cancers anogénitaux (vulvaire, vaginal, anal et pénien), les cancers de la tête et du cou (Szymonowicz et Chen, 2020). De plus, des types spécifiques du HPV ont également été associés à certains cancers cutanés (Li et Xu, 2017), et du CG (Fakhraei *et al.*, 2016).

2.6. HPV et cancer gastrique

En tant que partie du tube digestif, le tractus gastrique pourrait être un organe cible du HPV, comme le suggèrent certains rapports sur ce virus associé à l'œsophage et au côlon ; cependant, les rapports dans le carcinome gastrique sont limités (Ma *et al.*, 2007).

A ce jour, aucun lien prouvé entre la présence du virus et les CG autres que l'EBV n'a été clairement démontré. Cependant, certains chercheurs pensent qu'il pourrait y avoir un lien entre l'infection par le HPV et le développement du CG similaire à celui trouvé avec l'EBV (Jafari-Sales *et al.*, 2023). La détection de ce virus dans les cellules des lésions précurseurs du CG constitue la seule possibilité de confirmer toute relation (Baj *et al.*, 2022) Il a été supposé qu'une infection persistante répétée au HPV peuvent entraîner une dysplasie ou un

adénocarcinome *In situ*, en tant que lésions précurseurs, cela entraînera éventuellement une transformation maligne, et qu'il pourrait pénétrer dans l'anus et le rectum, provoquant une infection à partir des sites anogénitaux, ou il pénètre par voie orale, avec une infection descendante de la bouche à l'œsophage et enfin à l'estomac. Concernant les caractéristiques cliniques, le HPV est plus répandu chez les hommes plus que les femmes avec un âge moyen <50, dans des CG peu différenciés/indifférenciés, dans le cardia et aux stades précoces (**Zeng et al., 2016**).

L'identification du HPV repose sur des techniques de biologie moléculaire. Diverses méthodes sont disponibles pour détecter l'infection par ce virus dans les échantillons. Malgré le grand nombre d'études, il existe encore une controverse quant à la méthode ou à la combinaison des méthodes la mieux adaptée à l'identification du HPV (**Bucchi et al., 2016**). Actuellement, le statut HPV peut être détecté par hybridation *in situ* d'ADN ou d'ARN, par réaction en chaîne par polymérase ou en détectant les transcrits d'ARNm HPV E6/E7 par PCR quantitative de transcriptase inverse et la détection d'une protéine p16 marqueur par immunohistochimie qui est un moyen indirect d'indiquer la présence du HPV (**Randén-Brady et al., 2019**).

L'avantage incontestable de l'hybridation *In situ* est cependant la détermination de la localisation exacte du HPV dans l'échantillon, le virus intégré au matériel génétique se révèle comme un signal ponctué, tandis que la forme épisomique se révèle comme un signal diffus (**Baj et al., 2022**). Concernant l'amplification génique, nécessitent une faible quantité d'ADN cible au départ et c'est une méthode sensible et rapide (**Eide et Debaque, 2012**).

3. Co-infection par EBV et HPV

Un même patient présente un risque accru d'être infecté par deux virus différents ou plus. La co-infection par l'EBV et le HPV joue un rôle important dans l'initiation de la transformation néoplasique (**Shi et al., 2016**). L'EBV pourrait être un cofacteur de la carcinogenèse associée au HPV et participe au développement de cancer du col de l'utérus (**Abudoukadeer et al., 2015**). De plus, de nombreuses études ont montré une co-infection des virus HPV et EBV dans le carcinome épidermoïde de la bouche (**Polz-Gruszka et al., 2015**). Cette coexistence a également été signalée dans d'autres cancers épithéliaux, comme le cancer du sein (**Shi et al., 2016**).

Dans le CG, la présence du HPV et l'EBV a été investiguée par **Anwar et al. (1995)**, de **Souza et al. (2018)** et **Boukhris et al. (2021)**.

PARTIE II :

Présentation des

Travaux

Cette partie a fait l'objet de deux publications internationales :

- Behar, D., Boublenza, L., Chabni, N., Hassaine, H., Dahmani, B., Masdoua, N., Nahet, A., Meguenni, K. (2020). Retrospective epidemiological study on stomach cancer in a region of western Algeria : about 394 cases between 2011 and 2015. Journal of Gastrointestinal Cancer, 52, 706-710. (<https://link.springer.com/article/10.1007/s12029-020-00459-z>).

- Behar, D., Boublenza, L., Dahmani, B., Chabni, N., Hassaine, H., Belatbi, K., Breik, I., Benfoula, A., Zatla, I. (2022). Investigation on the presence of Epstein-Barr virus and Human Papillomavirus in gastric cancer in Algeria : Molecular detection. Current Topics in Virology, 19, 9-14.

(<http://www.researchtrends.net/tia/abstract.asp?in=0&vn=19&tid=38&aid=7129&pub=2022&type=3>).

Ce travail comporte trois principaux volets :

1. Etude du profil épidémiologique du cancer gastrique dans la Wilaya de Tlemcen entre 2011 et 2015.
2. Détermination de la fréquence des cancers gastriques associés aux virus EBV et HPV dans la région de l'Ouest Algérien.
3. Identification des anomalies moléculaires au sein du gène KRAS.

1. Étude du profil épidémiologique du cancer gastrique dans la Wilaya de Tlemcen entre 2011 et 2015

1.1. Objectif

Étudier le profil épidémiologique du cancer gastrique dans la wilaya de Tlemcen entre 2011 et 2015 selon les paramètres suivants :

- ✓ L'incidence
- ✓ Le sexe
- ✓ Les tranches d'âge
- ✓ L'année
- ✓ La topographie de la tumeur
- ✓ Le stade de la tumeur

1.2. Méthodologie

1.2.1. Type de l'étude

Cette partie du travail se focalise sur une étude épidémiologique rétrospective s'étalant sur une période déterminée de 5 ans (2011 à 2015), limitée autour d'une aire géographique (wilaya de Tlemcen).

1.2.2. La population cible

Cette étude rétrospective a inclus tous les résidents de la wilaya de Tlemcen qui ont été diagnostiqués avec un CG au CHU-Tlemcen entre le 1er janvier 2011 et le 31 décembre 2015.

Un total de 394 cas de CG enregistrés dans le registre du cancer de Tlemcen entre 2011 et 2015 ont été pris en compte dans cette étude.

1.2.3. Source d'information

Les données utilisées pour préparer ce travail proviennent d'une seule source : service d'épidémiologie et de médecine préventive du centre hospitalier universitaire, Dr. Tidjani Damerdji, Tlemcen, Algérie.

1.2.4. Méthode d'analyse des données

L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du logiciel SPSS.21 et Microsoft Excel 2010.

1.3. Résultats

Cette étude nous a permis de contribuer à l'évaluation du profil épidémiologique des 394 patients atteints du CG au niveau de la wilaya de Tlemcen entre 2011 et 2015.

1.3.1. Répartition des dix premiers sites de cancer à Tlemcen par incidence

La distribution des cas du cancer dans la région de Tlemcen nous a permis de classer le CG en 6^{ème} position chez les hommes (incidence 9,4 /100 000 habitants) et la 5^{ème} position chez les femmes (incidence 6,1 /100 000 habitants) des dix principaux cancers les plus répandus (Tableau 1).

Tableau 1 : Répartition des dix premiers sites de cancer à Tlemcen par incidence entre 2011 et 2016.

Sites anatomiques	Hommes		Femmes	
	Nombre de cas	Incidences	Nombre de cas	Incidences
Sein			1785	61,9
Colon, rectum, anus	373	14,3	303	10,7
Lymphome	318	11,3	262	8,8
Vessie	465	17,9	63	2,2
Estomac	249	9,4	172	6,1
Thyroïde	81	2,6	386	12,8
Poumon, trachée, bronche	330	12,6	57	2,0
Prostate	374	14,4		
Cerveau, système nerveux	147	5,3	165	5,8
Bouche, pharynx	200	7,1	86	2,9

1.3.2. Répartition des cas de cancer gastrique selon le sexe

Dans cette étude rétrospective, le sexe masculin étant le plus touché avec un taux de 60,4 % (238 hommes) contre 39,6% (156 femmes) avec un sexe-ratio de 1,5 et une différence significative entre les deux sexes ($p = 0,08$) (Figure 9).

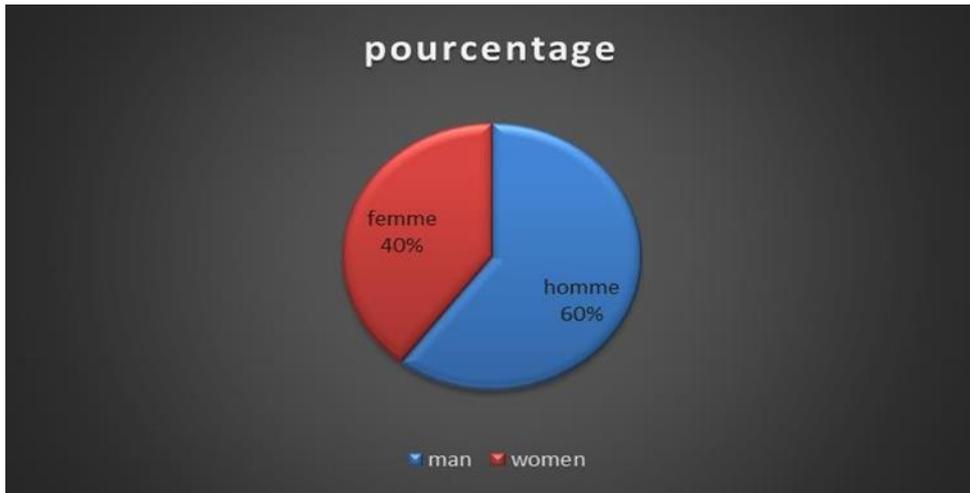


Figure 9 : Répartition des cas de cancer gastrique selon le sexe entre 2011 et 2015.

1.3.3. Répartition des cas de cancer gastrique selon les tranches d'âge

Le graphique ci-dessous nous montre que le CG était plus récurrent dans la tranche d'âge 60-70 ans, puis 50-60 ans avec des taux de 26,9 % et 23,4 % respectivement, dont l'âge moyen des patients de notre étude était de 60,5 +/- 14,20 ans (60,61 +/- 13,55 ans chez les hommes, 56,65 +/- 14,87 ans chez les femmes), la répartition par l'âge varie de 18 à 91 ans. Cette étude a montré également l'enregistrement des cas de ce cancer dans les jeunes âgés de 40 ans et moins avec un pourcentage de 11,9% (Figure 10).

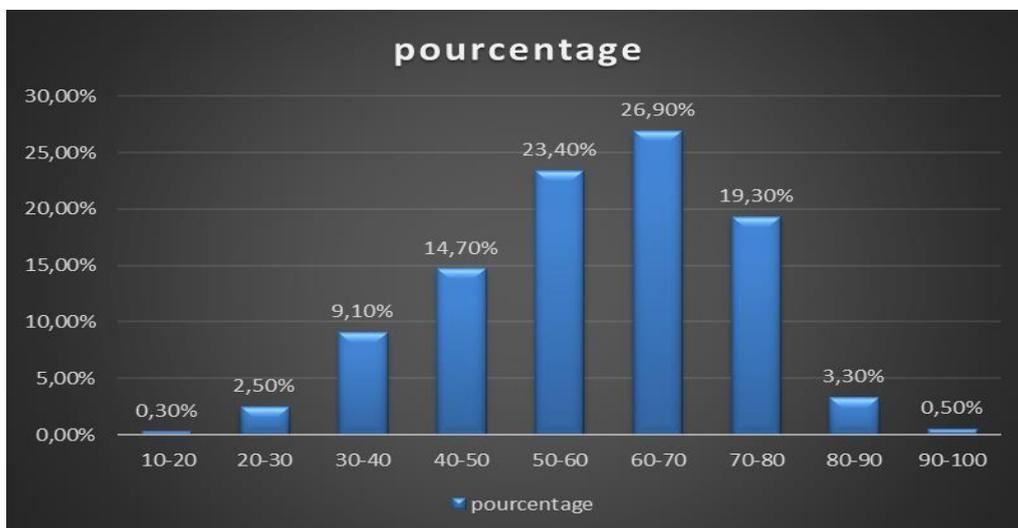


Figure 10 : Répartition des cas de cancer gastrique selon les tranches d'âge entre 2011 et 2015.

1.3.4. Répartition annuelle des cas de cancer gastrique

Cette étude épidémiologique rétrospective réalisée sur 394 cas de CG enregistrés durant la période de cinq ans a permis de constater que le nombre de cas du CG a marqué une évolution significative de 2011 à 2012, puis une diminution en 2013, suivie d'une augmentation dans les années suivantes (2014, 2015) avec des pourcentages plus élevés dépassant 23 % pour atteindre 23,60 % et 23,86 % respectivement (Figure 11).

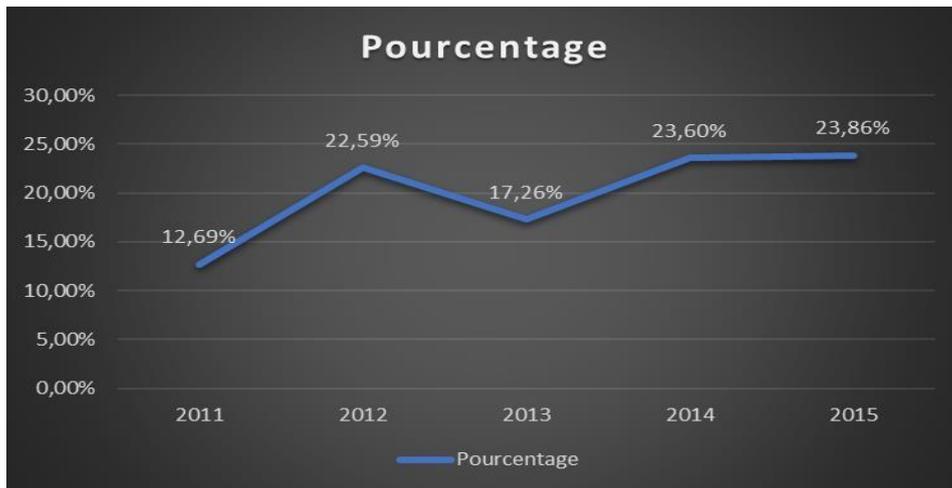


Figure 11 : Répartition annuelle des cas de cancer gastrique entre 2011 et 2015.

1.3.5. Répartition des cas de cancer gastrique selon la topographie

La topographie tumorale était inconnue dans 346 des cas (87,81%), dans les 48 cas (12,15%) ou la topographie était disponible, nous avons noté une prédominance antre-pylorique (6,09%) (Tableau 2).

Tableau 2 : Répartition des cas de cancer gastrique selon la topographie entre 2011 et 2015.

Topographies tumorales	Effectifs	Pourcentages
Cardia WAI	13	3,29%
Fundus	7	1,77%
Antre-Pylorique	24	6,09%
Pylore	2	0,50%
Petite courbure de l'estomac WAI	2	0,50%
Estomac WAI	346	87,81%

WAI : sans aucune indication de la topographie de la tumeur.

1.3.6. Répartition des cas de cancer gastrique selon le stade

Le stade de la tumeur était précisé dans 51,52 % des cas, dont 23,09% des cas étaient diagnostiqués au stade local, 17,01% des cas au stage métastatique et 11,42% au stade locorégional, les 48,48% cas des tumeurs restant étaient à un stade indéterminé (Tableau 3).

Tableau 3 : Répartition des cas de cancer gastrique selon le stade entre 2011 et 2015.

Stades	Pourcentages
Local	91 (23,09%)
Locorégional	45 (11,42%)
Métastases	67 (17,01%)
Indéterminés	191 (48,48%)

1.4. Discussion

Selon l'évaluation du profil épidémiologique, les résultats montrent que le CG figure parmi les dix cancers les plus fréquemment diagnostiqués dans la population de Tlemcen. Chez les hommes, il se classe à la 6^{ème} position, avec un taux de 9,4/100 000. Chez les femmes, il se classe à la 5^{ème} position, avec un taux de 6,1/100 000.

Ces résultats sont cohérents avec d'autres études menées en Algérie en ce qui concerne le classement, bien que nos valeurs soient supérieures. Par exemple, une étude à Sétif réalisée par **Cherif et al. (2010)** a identifié le CG comme la 4^{ème} localisation la plus fréquente parmi les cancers diagnostiqués, représentant un taux d'incidence standardisé de 6,1/100 000 habitants chez les hommes et 2,7/100 000 chez les femmes par an. De même, une étude à Mascara menée par **Benarba et al. (2014)** a montré que le CG était la 4^{ème} tumeur la plus fréquente chez les hommes avec un pourcentage de 7,6% et la 5^{ème} chez les femmes avec un pourcentage de 4,9%. Selon les données recueillies dans les régions Est et Sud-Est de l'Algérie, le cancer de l'estomac est le 5^{ème} cancer le plus diagnostiqué avec des taux l'incidence standardisé de 8,2/100 000 chez l'homme et de 5,1/100 000 chez la femme. De même, au Maroc, l'incidence était de 8,0/100 000 chez les hommes et 3,7/100 000 chez les femmes. Les taux d'incidence de cette étude sont significativement plus élevés que ceux enregistrés en Tunisie (4,1/100 000 chez les hommes, 2,4/100 000 chez les femmes) et en Égypte (3,1/100 000 chez les hommes, 2,7/100 000 chez les femmes) (**Moussaoui et al., 2022**).

En Afrique, le CG est classé au douzième rang des cancers les plus fréquents, les taux d'incidence et de mortalité estimée sont respectivement de 4/100 000 et 3,8/100 000. Il existe

des variations significatives d'un pays à l'autre, avec des taux d'incidence allant de 20,3/100 000 au Mali à 0,3 /100 000 au Botswana (**Asombang et al., 2014**).

Dans le monde arabe, Oman a l'incidence la plus élevée du CG (8/100 000) (**Aoude et al., 2022**), ce cancer était de 1997 à 2007 le plus fréquent chez les hommes et le deuxième plus fréquent chez les femmes (**Al-Mahrouq et al., 2011**). Le Yémen arrive deuxième avec un taux de 7,1/100 000, suivi de la Jordanie (6,0/100 000). Les taux les plus bas ont été signalés en Arabie saoudite 2,7/100 000, Soudan 2,5/100 000 et Comores (1,3/100 000) (**Aoude et al., 2022**).

Jusqu'au milieu des années 1990, le CG était la cause la plus fréquente de mortalité liée au cancer à l'échelle mondiale (**Ang et Fock, 2014**). Selon les estimations de GLOBOCAN 2020, environ 1,1 million de nouveaux cas du cancer de l'estomac ont été diagnostiqués (représentant 5,6 % de tous les cas de cancers), ce qui en fait la cinquième tumeur maligne la plus répandue dans le monde. Avec environ 800 000 décès (représentant 7,7 % de tous les décès par cancer), le CG se classe au quatrième rang des principales causes de décès par cancer chez les deux sexes combinés. Les taux d'incidence étaient les plus élevés en Asie de l'Est (22,4/100 000 personnes), suivie de l'Europe centrale et orientale (11,3/100 000 personnes) et de l'Amérique du Sud, de la Polynésie et de l'Asie occidentale (également environ 8,6/100 000 personnes). Le taux le plus bas a été enregistré en Afrique australe (3,3/100 000 personnes) (**Ilic et Ilic, 2022**).

L'incidence et la mortalité du CG sont très variables selon les régions et dépendent fortement du régime alimentaire et de l'infection à *H. pylori* ... (**Rawla et Barouk, 2019**). À l'échelle internationale, les variations de la prévalence de l'infection à *H. pylori* présentent des similitudes avec les variations de la prévalence du CG ; dans les pays en développement, la prévalence de l'infection à *H. pylori* chez les adultes est de 76 % contre 58 % dans les pays développés. La prévalence a été estimée à 77,6 % en Afrique du Sud, 55,8 % en Chine, 52,2 % au Mexique, 24,6 % en Australie et 22,1 % au Danemark. Aux États-Unis d'Amérique, la prévalence chez les Noirs non hispaniques était de 53 %, chez les Américains d'origine mexicaine de 62 %, mais de 26 % chez les Blancs non hispaniques. En partie, la variation géographique des taux d'infection à *H. pylori* est en corrélation avec la fréquence du cancer de l'estomac dans les populations. D'autre part, certaines populations fortement infectées (par exemple en Afrique et en Asie du Sud), contrairement aux pays d'Asie de l'Est, n'ont pas une incidence élevée de cancer de l'estomac, ce qui peut s'expliquer, au moins en partie, par les

différences de prévalence des génotypes de *H. pylori* (en Asie de l'Est, le génotype vacA m1 est prédominant, tandis que le génotype m² le génotype prédominait en Afrique, en Asie du Sud et en Europe) (**Ilic et Ilic, 2022**).

La prépondérance masculine de notre étude est cohérente avec les études menées en Algérie [(**Cherif et al., 2010**) ;(**Benarba et al., 2014**)] ; ainsi qu'avec les pays Africains, où l'incidence est plus élevée chez les hommes (4,7/100 000) que chez les femmes (3,3/100 000), tout comme le taux de mortalité à 4,5/100 000 et 3,2/100 000 respectivement (**Asombang et al., 2014**). De manière similaire, la littérature internationale rapporte des taux de CG nettement plus bas chez les femmes que chez les hommes, avec des taux qui sont deux fois plus élevés chez les hommes que chez les femmes [(**Bray et al., 2018**) ; (**Rawla et Barouk, 2019**)]. Les raisons de ces différences ne sont pas claires. Les expositions environnementales ou professionnelles peuvent jouer un rôle. Par exemple, les hommes ont toujours été plus susceptibles de fumer des produits du tabac, bien que des taux élevés chez les hommes semblent persister même dans les pays où les hommes et les femmes ont des habitudes de tabagisme similaires. Alternativement, les différences entre les sexes peuvent refléter des différences physiologiques. Les œstrogènes peuvent protéger contre le développement du CG. Chez les femmes, un retard de la ménopause et une augmentation de la fertilité peuvent réduire le risque de CG, tandis que les médicaments anti-œstrogènes, par exemple le tamoxifène, peuvent augmenter les taux de ce cancer. Ces hormones peuvent fournir une protection contre le CG pendant les années fertiles des femmes, mais leur effet est diminué après la ménopause, de sorte que les femmes développent un CG d'une manière similaire à celle des hommes, bien qu'avec un décalage de 10 à 15 ans après leurs homologues masculins (**Karimi et al., 2014**). Par ailleurs, des études ont indiqué que la prévalence de l'infection à *H. pylori* semble être plus élevée chez les hommes, ce qui pourrait contribuer à l'incidence plus élevée de CG observée chez le sexe (**Shah et Bentrem, 2022**).

Le CG est généralement une maladie des personnes âgées, l'âge moyen du patient se situant entre 50 et 70 ans (**Isobe et al., 2013**). Entre 2014 et 2018, 2% des cas de CG concernaient des personnes de moins de 34 ans, 38% des cas des personnes âgées de 35 à 64 ans et 60% des personnes de plus de 65 ans. L'âge médian du diagnostic au cours de cette période était de 68 ans (**Shah et Bentrem, 2022**). L'âge moyen rapporté dans notre étude était de 60,5 +/- 14,208 ans (60,61 +/- 13,55 hommes, 56,654 +/- 14,87 femmes) avec une extrémité d'âge allant de 18 à 91 ans et la tranche d'âge la plus touchée était celle de 60-70 ans (26,9 %),

ce qui est en accord avec les données observées dans une étude algérienne menée par **Fehim et al. (2017)** à Sidi-Bel-Abbès, qui indiquait que l'âge moyen de toute la cohorte étudiée était de $58,96 \pm 14,75$ ans. Nos résultats sont aussi en accord avec une étude Tunisienne, où selon **Elghali et al. (2018)** l'âge moyen était de $59,12 \pm 14,85$ ans et le groupe d'âge le plus touché était celui des 50 à 70 ans (46,10 %), ou Maroc selon l'étude menée par **Obtel et al. (2014)** l'âge moyen était de 54 ans. Le risque lié à l'âge est probablement secondaire à une exposition prolongée à des agents cancérogènes potentiels, à une susceptibilité accrue aux lésions des muqueuses, à un retard de cicatrisation de la muqueuse gastrique, à une incidence accrue de marqueurs de cellules souches cancéreuses des muqueuses, à une prévalence accrue de gastrite chronique active, de métaplasie intestinale et d'atrophie des muqueuses, en particulier chez les personnes infectées par *H. Pylori* (**Shah et Bentrem, 2022**).

L'incidence du CG chez le jeune âge augmente dans le monde entier, mais le comportement clinique des patients atteints de CG chez le jeune âge n'est pas bien établi (**Lee et al., 2016**). L'observation de cas de CG chez des patients âgés de 40 ans et moins a été remarquée, non seulement dans notre étude (11,9%) mais aussi dans une étude algérienne menée par **bekouaci et al. (2017)** à Blida, où le pourcentage des cas de ce cancer chez les patients âgés de 45 ans et moins était d'environ 20,4 %. Dans le monde, des études antérieures ont révélé que la proportion de CG survenant chez des patients âgés de 45 ans ou moins ne dépasse pas 19,8% [(**Santoro et al., 2007**) ; (**Park et al., 2009**) ; (**Al-Refaie et al., 2011**) ; (**Takatsu et al., 2016**) ;(**Rona et al., 2017**) ; (**Braga-Neto et al., 2018**)]. Selon l'étude de **Ławniczak et al. (2020)**, chez les patients âgés de ≤ 40 ans atteints du CG, une prédominance féminine a été observée, le type de tumeur était diffuse, avec antécédents familiaux positifs de cancers.

Les résultats de la répartition annuelle des cas de CG suggèrent une fluctuation dans l'incidence de ce cancer au fil des années, avec des années présentant une augmentation significative du nombre de cas, tandis que d'autres années montrent une diminution ou une stabilité. Cependant, cette constatation ne s'aligne pas avec l'étude de **Ramazani et al. (2021)**, car le taux d'incidence standardisé en Algérie a diminué, passant de 7,13 en 1990 à 4,34 en 2017. De même, Les taux d'incidence ont connu une baisse au cours des dernières décennies dans la plupart des régions du monde (**Machlowska et al., 2020**).

Ces déclin dans le nombre des cas du CG sont précédés par une réduction réussie de l'infection à *H. pylori*, ainsi qu'au succès de la prévention et du traitement des infections à *H.*

pylori dans la plupart des pays en développement. De plus, ils sont probablement attribuables à des changements dans la conservation des aliments, tels que la diminution de saumurage des légumes, de fumage et de transformation de la viande. La baisse a également été provoquée par la plus grande disponibilité de fruits et légumes frais (**Rawla et Barouk, 2019**). Ainsi, cette diminution pourrait également s'expliquer par l'augmentation des normes d'hygiène (**Machlowska et al., 2020**). Malgré une baisse de l'incidence et de la mortalité au cours des dernières décennies, le cancer de l'estomac reste l'un des principaux problèmes de santé dans le monde (**Ilic et Ilic, 2022**).

Dans cette étude, la topographie précise de la tumeur était inconnue dans la grande majorité des cas, soit 87,81%. Parmi les cas où la topographie était disponible (12,15%), nous avons observé une prédominance de localisation antre-pylorique, représentant 6,09% des cas, ce qui est en accord avec l'étude de **Elmajjaoui et al. (2014)** au Maroc et l'étude d'**Awad et al. (2017)** en Jordanie dont les quelles la majorité des cas étaient localisés dans l'antropylorique et l'antre avec des taux respectifs de 42,2% et 57,7% ; la deuxième localisation la plus courante était le fundus (18,8%) dans l'étude marocaine et le corps de l'estomac (25,2%) dans l'étude jordanienne, contrairement à notre étude c'était le cardia qui suit. Les CG peuvent généralement être classés en deux catégories topographiques : le cancer gastrique cardiaque (CGC) apparaissant dans la zone de l'estomac adjacente à la jonction œsophagienne-gastrique, et le cancer gastrique non-cardiaque (NCGC) provenant de régions plus distales de l'estomac (**Colquhoun et al., 2015**). Selon **Colquhoun et al. (2015)**, dans la plupart des pays inclus dans l'étude, le NCGC était plus fréquente que le CCG avec un ratio moyen de 2:1. Cependant, dans certaines populations où les taux d'incidence du NCGC étaient inférieurs à la moyenne mondiale, les taux de CGC étaient similaires ou supérieurs aux taux de NCGC.

Les deux sous-sites anatomiques présentent des facteurs de risque qui se chevauchent ; le tabagisme, la forte consommation d'alcool, les aliments conservés par salage mais aussi des étiologies distinctes. Le CG du cardia a été associé au reflux gastro-œsophagien et à l'obésité, tandis que 90 % des cancers non cardiaques étaient attribuables à une infection à *H. pylori* (**Morgan et al., 2022**).

Il convient de souligner que le CG peut se manifester dans différentes parties de l'estomac, avec une prévalence variable selon les populations étudiées. Comprendre les

différences de localisation tumorale peut aider à la planification et à la prise de décision liées aux stratégies de lutte contre le CG (**Colquhoun et al., 2015**).

La distribution des stades de la tumeur dans la population étudiée présente des résultats intéressants. Dans notre étude, le stade local de la tumeur était observé dans 23,09% des cas, ce qui suggère qu'un nombre significatif de patients ont été diagnostiqués à un stade relativement précoce de la maladie. Cependant, il est préoccupant de constater que le stade métastatique était présent dans 17,01% des cas, indiquant une propagation du cancer au-delà de la région d'origine. Le stade locorégional a été observé dans 11,42% des cas, ce qui représente une étape intermédiaire entre le stade local et le stade métastatique. Dans une étude marocaine menée par **Elmajjaoui et al. (2014)**, les tumeurs sont diagnostiquées à un stade métastatique dans 62% des cas, au stade localement avancé dans 18,5 % et au stade localisé dans 8 %. Chez environ 11,5 % des patients le stade était indéterminé. Aux États-Unis, la plupart des patients atteints de CG sont symptomatiques au moment de la présentation et ont déjà une maladie avancée et incurable. Malgré les progrès de la médecine, environ 50 % des patients ont une maladie qui s'étend au-delà des frontières locorégionales au moment de la présentation, et seulement la moitié des patients avec des tumeurs locorégionales peuvent subir une résection potentiellement curative. Les CG précoces curables chirurgicalement sont généralement asymptomatiques et ne sont que rarement détectés en dehors des programmes de dépistage (**Mansfield, 2011**). Globalement, la plupart des patients atteints de CG sont diagnostiqués à un stade avancé, c'est-à-dire qu'ils ont des options de traitement limitées et un mauvais pronostic. Par conséquent, un diagnostic précoce et un traitement précis revêtent d'une importance cruciale pour ces patients (**Zhang et al., 2022**).

Actuellement, le CG est traité par thérapie endoscopique, thérapie chirurgicale, radiothérapie, chimiothérapie, etc. Pour le CG à un stade précoce qui est généralement détecté lors d'un traitement de dépistage (T1a ou T1b), un traitement endoscopique peut être utilisé, et pour le CG locorégional, la prise en charge multidisciplinaire est généralement basée sur la chirurgie. Pour le CG métastatique et non résécable, on a recours à la radiothérapie, à la chimiothérapie, à la thérapie ciblée (thérapie ciblée à base de HER2/neu, VEGFR2, EGFR) et à l'immunothérapie. Cependant, le pronostic des patients peut encore être amélioré (**Cai et al., 2022**).

1.5. Conclusion

Le CG fait part des cancers les plus réponsus dans la wilaya de Tlemcen, il est plus fréquent chez l'homme que chez la femme et son risque augmente avec l'âge. Par la présente étude, nous avons pu décrire le profil épidémiologique du CG dans la région du Tlemcen, en revanche, le manque de données dans certains paramètres constituait la limite de cette étude. Il est important de poursuivre la recherche sur ce cancer dans notre population notamment sur l'analyse des facteurs susceptibles d'influencer l'incidence telle que la détermination de la fréquence des CG liés à des infections virales (EBV, HPV...), ainsi que la détermination du profil génétique du CG, ce qui offre une meilleure compréhension et connaissance de la maladie et par conséquence la mise en place des biomarqueurs moléculaires dans le but d'élaborer des stratégies préventives et curatives efficaces visant à réduire ce fardeau mondial.

2. La détermination de la fréquence des cancers gastriques associés au virus EBV, HPV dans la région de l'Ouest Algérien

2.1. Objectif

Cette partie de l'étude vise à détecter l'ADN viral de l'EBV et du HPV dans le cancer gastrique chez des patients de la région ouest de l'Algérie.

2.2. Lieux d'étude

Cette partie du travail a été réalisée dans différents laboratoires :

- La préparation des échantillons a été effectuée dans le laboratoire d'anatomie pathologique d'EPH Dr Benzardjeb Ain-Temouchent.
- L'extraction d'ADN a été effectuée dans le Laboratoire de Microbiologie Appliquée à l'Agroalimentaire au Biomédical et à l'Environnement (LAMAABE).
- La recherche d'ADN viral par MY09/MP11 et LMP-1 a été réalisée au niveau des laboratoires de recherche de l'université de Tlemcen : le laboratoire de microbiologie appliquée à l'agroalimentaire au biomédical et à l'environnement (LAMAABE) et le laboratoire PPABIONUT (Physiologie, Physiopathologie, et Biochimie de la Nutrition) de la faculté SNV/STU, ainsi que le laboratoire CancerLab de la faculté de médecine.
- La recherche des virus par GP5+/GP6+, EBNA-1 a été réalisée par prestation de service chez WiraGen Academy suivi d'une confirmation au sein de LAMAABE.

2.3. Analyse des données

L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du logiciel Microsoft Excel 2010.

2.4. Matériels et Méthodes

2.4.1. Collecte des échantillons

Entre septembre 2018 et mars 2021, un nombre total de 73 blocs de tissus de CG fixés au formol et inclus en paraffine ont été collectés chez des patients ayant subi soit une gastrectomie totale ou partielle ou une résection par biopsie endoscopique, dans cinq laboratoires d'histopathologie-anatomiques de l'ouest Algérien (Tlemcen, Ain Témouchent,

Sidi bel abbés, Oran, Mostaganem). Les données cliniques ont été obtenues à partir des comptes-rendus anatomo-pathologiques des dossiers cliniques des patients.

2.4.2 Préparation des tissus

À partir de chaque bloc fixé au formol et inclus en paraffine contenant une quantité suffisante des cellules tumorales, 5 lames de 10-15 µm d'épaisseur ont été coupées en plus d'une lame qui a été coupée à une épaisseur de 0,5 µm et colorée par l'hématoxyline et l'éosine (H & E) puis disséqués sous microscopie optique par un médecin anatomopathologiste afin de délimiter la zone des cellules tumorales tout en évitant le tissu adjacent. Les tissus tumoraux disséqués ont été grattés à partir d'une lame blanche et placés dans des tubes de microcentrifugation de 1,5 ml.

La sélection des blocs tissulaires enrichis par micro ou macro-dissection est nécessaire pour augmenter la sensibilité des tests moléculaires. Pour cette raison, les blocs des patients avec un matériel histo-pathologique insuffisant pour isoler la quantité requise d'ADN ont été exclus des analyses moléculaires, ainsi que les tissus mal fixés vu que la fixation prolongée affecte négativement l'intégrité de l'ADN.

2.4.3. Extraction d'ADN

Avant l'extraction de l'ADN, les tissus ont été déparaffinés selon le protocole suivant : 300µl de xylène ont été ajoutés dans chaque tube et incubés pendant 5min sous agitation douce à température ambiante, ensuite les tubes ont été centrifugés pendant 1 à 3 min à 13000-16000 rpm pour sédimenter les tissus, le surnageant de chaque tube a été jeté soigneusement, les trois étapes précédentes ont été répétées trois fois. Une fois l'échantillon complètement déparaffiné, 300 µl d'éthanol à 96-100 % ont été ajoutés aux tubes et incubés pendant 5 min sous agitation douce à température ambiante, ensuite les tubes ont été centrifugés pendant 1 à 3 min à 13000-16000 rpm pour sédimenter les tissus, le surnageant de chaque tube a été soigneusement jeté, les trois étapes précédentes ont été répétées trois fois.

Après déparaffinage, l'extraction d'ADN a été réalisée à l'aide d'un kit Puregene (Qiagen, Hilden, Allemagne) selon les instructions du fabricant. Le surnageant contenant l'ADN a été stocké à -20°C puis utilisés comme matrice pour les analyses moléculaires (PCR, séquençage) après l'analyse de la qualité et de la quantité.

2.4.4. L'évaluation de la qualité et de la quantité d'ADN

La pureté des isolats obtenus d'ADN a été mesurée à l'aide du spectrophotomètre, les lectures étaient effectuées à 260 nm puis à 280 nm. Le rapport 260/280 nm a été calculé pour déterminer la pureté d'ADN qui doit être comprise entre 1,8 et 2. Par ailleurs, l'estimation approximative d'ADN a été évaluée en utilisant la méthode de l'électrophorèse sur gel d'agarose.

2.4.5. Test d'amplification en chaîne par polymérase (PCR)

➤ Amplification de gène L1 du HPV par MY09/MY11

Les amorces utilisées pour obtenir un amplicon de 450 pb sont MY09/MY11 :

MY09 : 5'-CGTCCMARRGGAWACTGATC-3'

MY11 : 5'-GCMCAGGGWCATAAYAATGG-3'

Pour les réactions PCR avec un volume final de 25 µl, un mélange réactionnel (réactifs du kit WiraGen PCR) a été préparé (Tableau 4).

Tableau 4 : composition pour une réaction PCR.

Composant	Concentration	Volume (µl)
10X Taq buffer	1X	2,5
2,5 Mm dNTPs	200 µM	2
Amorce F	0,25 µM	0,625
Amorces R	0,25 µM	0,625
Taq polymerase	2,5 U	0,5
H2O	-	17,75
ADN	-	1

Les tubes ont été placés dans un plateau de thermocycleur pour amplification selon le programme suivant : dénaturation initiale à 95°C pendant 15min, 40 cycles de dénaturation à 95 °C pendant 30 s, hybridation à 53 °C pendant 45 s et extension à 72 °C pendant 1 min, suivi d'une extension finale à 72 °C pendant 5 min.

➤ Amplification de gène L1 du HPV par GP5+/GP6+

Les amorces utilisées pour obtenir un amplicon de 150 pb sont GP5+/GP6+ :

GP5+ : 5'-TTTGTTACTGTGGTAGATACTAC-3'

GP6+ : 5'-GAAAAATAAACTGTAAATCATATTC-3'

Pour les réactions PCR avec un volume final de 25 µl, un mélange réactionnel (WiraGen) a été préparé (Tableau 5).

Tableau 5 : composition pour une réaction PCR.

Composant	Concentration	Volume
2X PCR Master Mix	1X	12,5
Amorce F	0,4 µM	1
Amorce R	0,4 µM	1
H2O	-	9,5
ADN	-	1

Les tubes ont été placés dans le plateau d'un thermocycleur et amplifiés selon le programme suivant : dénaturation initiale à 95°C pendant 10 min, 35 cycles de dénaturation à 95 °C pendant 30 s, hybridation à 50 °C pendant 1 min et extension à 72 °C pendant 1 min, suivi d'une extension finale pour à 72 °C pendant 10 min. Chaque réaction PCR était accompagnée de contrôle positif et négatif.

➤ **Amplification de gène LMP-1 d'EBV**

Les amorces utilisées pour obtenir un amplicon de 509 pb sont LMP-1 :

LMP-1 F : 5'-AATAGACAGCCCAGTTGAAA-3'

LMP-1 R : 5'-GCAGTGCCATATCTGACGTG-3'

Pour les réactions PCR avec un volume final de 25 µl, un mélange réactionnel (réactifs du kit WiraGen PCR) a été préparé (Tableau 4).

Les tubes ont été placés dans un plateau de thermocycleur pour amplification selon le programme suivant : la dénaturation initiale à 94 °C pendant 5 min, 35 cycles de dénaturation pour à 94 °C pendant 30 s, hybridation à 55 °C pendant 1 min et extension à 72 °C pendant 3

min, suivi d'une extension finale à 72 °C pendant 5 min. Chaque réaction PCR était accompagnée de contrôle positif et négatif.

➤ **Amplification de gène EBNA-1 d'EBV**

Les amorces utilisées pour obtenir un amplicon de 262 pb sont EBNA-1 :

EBNA-1 F : 5'-TGAATACCACCAAGAAGGTG-3'

EBNA-1 R : 5'-AGTTCCTTCGTCGGTAGTC-3'

Pour les réactions PCR avec un volume final de 25 µl, un mélange réactionnel (WiraGen) a été préparé (Tableau 5).

Les tubes ont été placés dans le plateau d'un thermocycleur et amplifiés selon le programme suivant : dénaturation initiale à 95°C pendant 10 min, 35 cycles de dénaturation à 95 °C pendant 30 s, hybridation à 50 °C pendant 1 min et extension à 72 °C pendant 1 min, suivi d'une extension finale à 72 °C pendant 10 min. Chaque réaction PCR était accompagnée de contrôle positif et négatif.

2.4.6. Analyse par électrophorèse sur gel d'agarose 1,5%, 2%

Les produits de PCR ont été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1,5% pour les amplicons de tailles 509 pb, 450 pb et à 2% pour les amplicons de tailles 262 pb, 150 pb, pour cela, l'agarose a été dissous dans 100 ml de tampon Tris-Borate-EDTA (TBE) 1X dans une micro-onde pendant 1 à 2 minutes dans le but d'obtenir un mélange parfaitement homogène, une fois le mélange est refroidi, 1 µl du bromure d'éthidium (BET) (ou le *Gold View*) a été ajouté , puis le gel fondu a été coulé lentement dans le plateau de moulage en veillant à ce qu'il entoure bien les dents du peigne. Lorsque le gel est complètement solide, 5 µl l'ADN a été mélangé avec le colorant de charge et déposé dans les puits du gel. En fin, la réaction d'électrophorèse a été déclenchée sous une tension d'environ 90 V pendant environ 40 minutes (ou plus), le temps que les fragments d'ADN soient bien séparés les uns des autres. Chaque réaction d'électrophorèse était accompagnée d'un marqueur de poids moléculaire pour discriminer la taille des fragments.

2.4.7. Révélation des résultats sur table à UV

Lorsque l'électrophorèse est terminée, le gel a été placé sur une table à UV afin de visualiser les différentes bandes de migration de l'ADN, les résultats positifs sont caractérisés par la présence des bandes d'ADN fluorescentes en une couleur rouge-orangé (ou verte).

2.5. Résultats

2.5.1. Résultats d'analyse des caractéristiques cliniques des patients

Les données cliniques des patients inclus dans l'étude ont été obtenues à partir des dossiers cliniques. Sur les 73 patients diagnostiqués avec un CG, 48 (64,78 %) étaient des hommes et 25 (35,21 %) étaient des femmes. L'âge moyen était de $61,47 \pm 14,593$ ans, avec des extrêmes d'âges de 41 à 90 ans pour les hommes et de 26 à 84 ans pour les femmes. Plus de la moitié des hommes appartenaient à la tranche d'âge de plus de 60 ans (58,34%), suivie de la tranche d'âge des 45-60 ans (33,33%) alors que 8,33% avaient moins de 45 ans (8,33%), tandis que la moitié des femmes appartenaient à la catégorie des plus de 60 ans (48%), il est à noter que 36% des femmes ayant un cancer gastrique avaient moins de 45 ans.

Environ 24,66 % des patients avaient un adénocarcinome gastrique bien différencié, 54,79 % des patients avaient un adénocarcinome gastrique modérément différencié et 20,55 % des patients avaient un adénocarcinome gastrique mal différencié (Tableau 6).

Tableau 6 : Les caractéristiques cliniques des patients.

Caractéristiques	Nombre de cas	Homme	Femme
	N (73) (%)	N (48) (%)	N (25) (%)
Âge moyen	61,47	63,76	57,08
Min	26	41	26
Max	90	90	84
>45	13 (17,18%)	4 (8,33%)	9 (36%)
45-60	20 (27,40%)	16 (33,33%)	4 (16%)
<60	40 (54,79%)	28 (58,34%)	12 (48%)
Degré de différenciation :	18 (24,66%)	12 (25%)	6 (24%)
Adénocarcinome bien différencié	40 (54,79%)	24 (50%)	16 (65%)
Adénocarcinome modérément différencié	15 (20,55%)	12 (25%)	3 (12%)
Adénocarcinome mal différencié			

2.5.2. Résultats de la détection du génome du HPV

Les résultats d'électrophorèse sur gel d'agarose pour le HPV obtenus après amplification avec des amorces spécifiques sont présentés sur la figure 12. Après la séparation des fragments amplifiés par électrophorèse sur gel d'agarose, une seule bande a été visualisée qui correspond à des amplicons de 150 pb issu de l'amplification par les amorces GP5+/GP6+, par contre aucune bande n'a apparu pour les amplicons de 450 pb issus des amorces MY09/MY11. Le taux d'ADN du HPV positif dans les échantillons était de 1,36% (1/73).

En raison du petit nombre des cas positifs, aucune comparaison statistique n'a pu être effectuée entre le taux du HPV et les facteurs clinico-pathologiques.

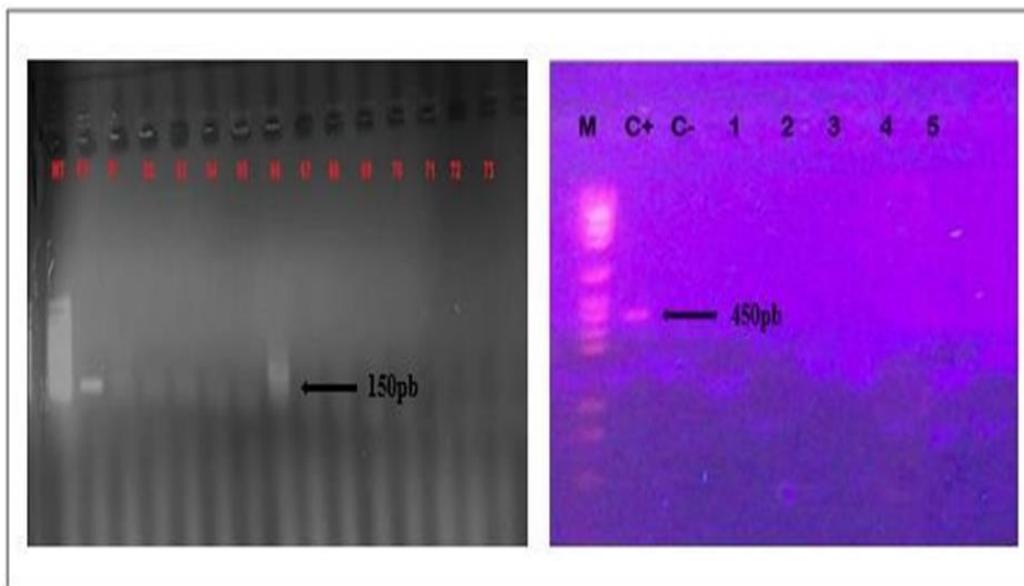


Figure 12 : Gel d'agarose (2% ; 1,5%) montrant le profil électrophorétique utilisant des amorces GP5+/GP6+, MY9/MY11 pour la détection du gène HPV-L1 correspondant à 150 pb et à 450pb respectivement, (M= Marqueur de taille (100 pb-1000 pb), C+ = Contrôle positif, C-= Contrôle Négatif, 66 = Échantillon clinique positif, 1,2,3,4,5,62,64,65,67,68,69,70,71,72, 73= Échantillons cliniques négatifs).

2.5.3. Résultats de la détection du génome d'EBV

Concernant la détection du génome d'EBV, la visualisation sur gel d'agarose a révélé l'absence des bandes qui correspondent à des amplicons de 262 pb issus des amorces EBNA-1 et les amplicons de 509 pb issus des amorces LMP-1 (Figure 13). Par conséquent, tous les cas ont été considérés comme ayant un statut d'ADN d'EBV négatif (0/73).

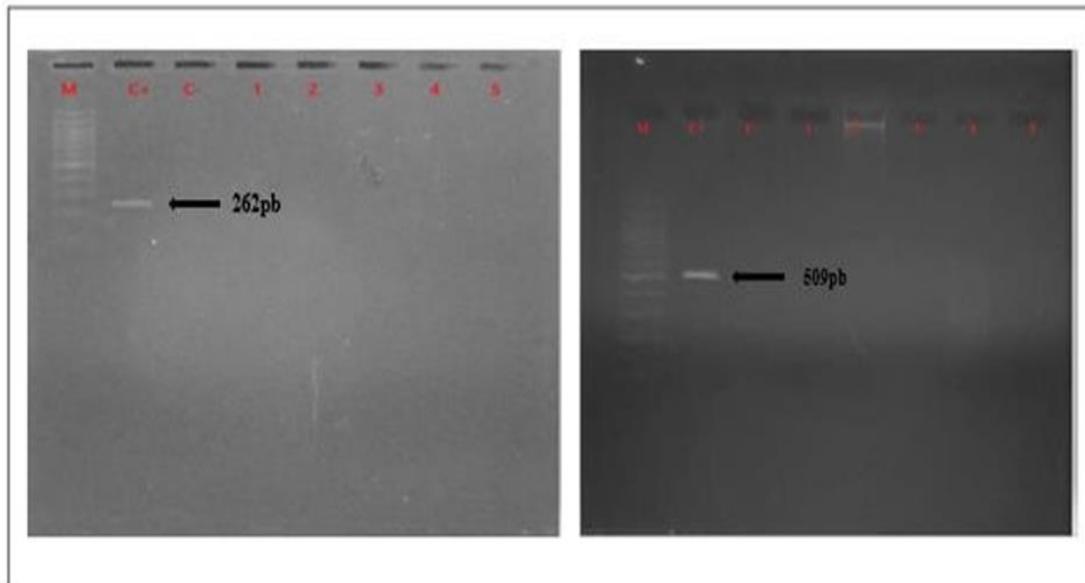


Figure 13 : Gel d'agarose (2% ; 1,5%) montrant le profil électrophorétique utilisant des amorces EBNA-1, LMP- 1, correspondant à 262 pb et à 509pb respectivement, (M= Marqueur de taille (100 pb-1000 pb), C+ = Contrôle positif, C-= Contrôle Négatif, 1, 2, 3, 4, 5 = Échantillons cliniques négatifs).

2.6. Discussion

Les virus sont reconnus comme des facteurs étiologiques authentiques du cancer humain (Butel, 2000). Les HPV et les EBV sont les onco-virus les plus courants, contribuant à environ 10% à 15% de toutes les tumeurs malignes. Les onco-protéines des HPV à haut risque (E5 et E6/E7), ainsi que des EBV (LMP-1, LMP-2-A et EBNA-1), jouent un rôle principal dans l'apparition et la progression de plusieurs carcinomes humains, notamment le cancer de la tête et du cou, du col de l'utérus, colorectal, le lymphome de Burkitt et le carcinome nasopharyngé [(Hippocrate *et al.*, 2011) ; [Fernandes *et al.*, 2020)]. L'implication d'EBV dans le développement du CG a été rapporté pour la première fois en 1990 dans une forme rare appelée carcinome indifférencié à stroma lymphoïde (Burke *et al.*, 1990), actuellement la prévalence de CG positifs à l'EBV varie de 1,69 à 43,75 % dans des différentes études éligibles (Tavakoli *et al.*, 2020). Quant au virus HPV, son rôle dans la carcinogenèse gastrique a été suggéré, il est estimé d'être présent dans 15,5% à 31,6% des populations étudiées (Wang *et al.*, 2020). Par la présente étude, nous nous sommes intéressés à déterminer la prévalence de l'infection par l'EBV et le HPV dans 73 cas de CG. À notre connaissance, il s'agit de la première étude portant sur la recherche d'ADN des deux virus dans le CG en Algérie.

Il est nécessaire de mettre en avant que les méthodes utilisées pour détecter l'EBV donnent lieu à une variation potentielle du taux de virus au sein de différents groupes de tissus et de maladies, et sont un facteur important, qui doit être pris en compte lors de l'analyse comparative de la prévalence de ce virus entre les différentes populations ou études [(**Saxena et al., 2008**) ; (**Ribeiro et al., 2017**)]. Le statut de l'infection à EBV dans le CG est le plus souvent déterminé à l'aide de l'hybridation *in situ* (ISH) pour identifier le petit ARN codé par l'EBV, la réaction en chaîne par polymérase (PCR) pour l'amplification spécifique du gène EBV, ce qui nécessite plusieurs étapes et la préservation des acides nucléiques. Le CG positif à l'EBV a été initialement identifié par la détection de l'ADN à l'aide de la PCR. À ce jour, l'ISH est la méthode standard pour détecter l'infection par ce virus (**Zhang et al., 2021**). Les méthodes de PCR sont plus sensibles mais moins spécifiques que la méthode ISH de référence et si la méthode PCR est utilisée, elle doit être interprétée avec prudence et il est préférable de la valider davantage en utilisant la méthode ISH. De plus, il est nécessaire que les résultats de la PCR soient également ajustés par infiltration lymphocytaire (**Chen et al., 2015**), car cette méthode est sujette à des résultats faussement positifs en raison de sa faible spécificité. La faible spécificité de la PCR peut s'expliquer par le fait que des cellules mémoires et/ou des lymphocytes non tumoraux peuvent également être étudiés pour détecter la présence du génome de l'EBV (**Tavakoli et al., 2020**). L'immunohistochimie (IHC), qui permet de repérer les antigènes viraux, peut également être employée pour la détection de l'EBV. Elle peut être suivie par ISH, car la combinaison des deux méthodes pourrait améliorer la précision de la détection (**Sun et al., 2020**). Dans la présente étude la technique de PCR unique a été effectuée par deux paires d'amorces, une paire d'amorces couvre l'étendue de 509 pb du gène LMP-1, et l'autre couvre l'étendue de 262 pb du gène EBNA-1.

Les résultats de la détection d'ADN d'EBV étaient négatifs dans notre population d'étude, ceci est cohérent avec les résultats d'une étude de **Yuan et al. (2013)** en chine, portant sur 24 cas du CG utilisant PCR conventionnelle et PCR quantitative par fluorescence (QF-PCR). Par ailleurs, des résultats divergents ont été observés dans la seule étude algérienne d'**Aslane et al. (2016)**, dans laquelle sur les 97 patients atteints d'un CG confirmé, 22,7 % étaient positifs à l'EBV par l'ISH en fluorescence (FISH). Au Maroc l'EBV a été signalé dans 28,7 % et 40 % des cas respectivement, selon la population étudiée en utilisant des méthodes de PCR [(**Boukhris et al., 2018**) ; (**Rihane et al., 2021**)]. En Tunisie, la prévalence du CG EBV-positif variait entre 4,1% (**Trimeche et al., 2009**) et 14,81% selon la population examinée (**Benayed-Guerfale et al., 2011**), suite à des analyses par test d'ISH.

Un nombre considérable des études menées dans le même contexte que la présente étude, ont donné des résultats mitigés, indiquant des différences régionales dans la prévalence du cancer gastrique EBV-positif. Au Brésil, **Brasil-Costa et al. (2022)** ont mis en évidence la présence de virus dans seulement 1,05% (2/191) par FISH. Similairement a une étude ultérieure menée en Italie, sur 70 échantillons du type FFPE testés par hybridation chromogénique *in situ* (CISH), 3% étaient positifs pour l'infection à EBV (**Valentini et al., 2019**). Dans une cohorte Chinoise, **Jia et al. (2021)**, ont effectué une ISH sur 1 328 CG réséqués chirurgicalement, dont 4,1 % étaient des patients CGaEBV. De même, 6,22 % de la population testée en Espagne sont infectées par l'EBV (**Martinez-Ciarpaglini et al., 2019**). La présence d'EBV a été explorée dans une cohorte Russe où 9,57% des personnes ont été testée positives pour EBER (**Danilova et al., 2022**). En Thaïlande, en Allemagne et au Pérou, la présence de l'EBV dans les tissus gastriques cancéreux a été confirmée de manière positive à des taux de 12,1%, 23%, et 41,8%, respectivement, par le biais des techniques d'ISH, de la PCR et de la qPCR [(**Wanvimonsuk et al., 2019**) ; (**Moore et al., 2020**) ; (**Castañeda et al., 2022**)].

En revanche, **Saxena et al. (2008)** et **Del Moral-Hernandez et al. (2019)** ont trouvé les prévalences les plus élevées en Inde (50,3%) et dans le Sud-ouest du Mexique (87,5 %) respectivement. La méthode utilisée dans ces études était la PCR pour amplifier un segment de la région EBNA1. Selon **Nogueira et al. (2017)** l'EBV a été détecté par PCR en temps réel pour amplifier un segment de la région BamH1W dans 90,2 % des cas de cancer de l'estomac, tandis que des EBER ISH ont été détectés dans 11 % des cas en Portugal.

L'absence d'ADN d'EBV dans notre étude peut être expliquée par le fait que ce virus n'est pas un facteur de risque du CG dans la population étudiée de l'Ouest Algérien, ou bien peut être lié aux conditions de préparation et de conservation des échantillons ou à la faible quantité et fragmentation d'ADN extrait à partir des tissus FFPE, car il a été rapporté que l'EBV est mieux être extrait à partir des biopsies fraîches que des tissus FFPE pour éviter les résultats faux négatifs [(**Tavakoli et al., 2020**) ; (**Nguyen et al., 2022**)].

Dans des études antérieures, la positivité de l'EBV était significativement corrélée à certaines caractéristiques clinico-pathologiques (**Pyo et al., 2020**). Les tumeurs gastriques EBV positives ont tendance à être des cohortes plus jeunes [(**Yanagi et al., 2019**) ; (**Sun et al., 2020**)], ont une plus grande prépondérance masculine [(**Yanagi et al., 2019**) ; (**Sun et al., 2020**) ; (**Pyo et al., 2020**) ; (**Hirabayashi et al., 2023**)], surviennent plus souvent dans le type diffus par

rapport au type intestinal (**Hirabayashi et al., 2023**) et dans la région proximale par rapport à la région distale [(**Hirabayashi et al., 2023**) ; (**Yanagi et al., 2019**) ; (**Sun et al., 2020**) ; (**Tavakoli et al., 2020**) ; (**Weadick et al., 2021**)]. De plus, le programme de recherche (TCGA) a montré des mutations de PIK3CA, une hyperméthylation sévère de l'ADN, une amplification de JAK2, CD274 et PDCD1LG2, ce qui peut améliorer notre compréhension du mécanisme cancérogène de l'EBV (**Jafari-Sales et al., 2022**).

Par ailleurs, et dans l'intention de détecter l'ADN du HPV, des réactions de PCR à partir des tissus FFPE ont été réalisées. C'est la méthode la plus couramment utilisée dans des études sur le CG [(**Candido et al., 2013**) (**Zeng et al., 2016**) (**Fakhraei et al., 2016**)].

De toute évidence, toute estimation de la prévalence du HPV dans un ensemble d'échantillons de tissus dépend de la méthode de détection utilisée. Les tests basés sur la PCR couramment utilisés comprennent les systèmes GP5+/GP6+ et MY09/MY11 qui amplifient les séquences de la région L1 du génome du HPV (**Evans et al., 2005**). Le couple d'amorces MY09/MY11 flanque une séquence d'environ 450 pb, tandis que la paire GP5+/GP6+, flanque une séquence d'environ 150 pb, qui est interne à la séquence flanquée par MY. Ces deux paires d'amorces sont efficaces pour amplifier un large spectre de génotypes du HPV, et chaque paire peut être utilisée en une réaction de PCR unique ou en PCR "nichée" [(**Candido et al., 2013**) ; (**Venceslau et al., 2014**) ; (**Fakhraei et al., 2016**) ; (**Bozdayi et al., 2019**)].

Dans la présente étude, seules les amorces GP5+/GP6+ ont réussi à détecter l'ADN du HPV, cela peut s'expliquer par la plus petite taille du fragment d'ADN amplifié par le système GP-PCR. Ainsi, cet oligonucléotide a une plus grande efficacité dans la détection du HPV dans les échantillons avec de l'ADN fragmentés (**Venceslau et al., 2014**).

Le taux d'infection par le HPV était de 1,36 % (1/73) dans notre population d'études. Dans des études antérieures au Brésil, Iran et Soudan, l'infection à HPV était observée dans 3 % (**De Souza et al., 2018**), 5% (**Fakhraei et al., 2016**) et 6,7% (**Elemam et Bakhit, 2016**) des cas du CG respectivement. Les prévalences les plus élevées ont été trouvées dans la population turque avec 38% selon l'étude de **Bozdayi et al. (2019)** et 44,7% selon l'étude de **Erol et al. (2009)** et en Irak avec 44.4% selon l'étude de **Mallakh et al. (2022)**. Par contre, dans l'étude de **Saegusa et al. (1997)** au Japon, **Yuan et al. (2013)** en Chine et **Sniectura et al. (2014)**

en Europe centrale, l'ADN du HPV n'a été pas démontrée dans des échantillons, ce qui les a amenés à conclure que le HPV n'est pas susceptible d'être impliqué dans la carcinogenèse gastrique au sein des populations étudiées.

D'autre part, selon une méta-analyse de **Zeng *et al.* (2016)**, le HPV pourrait avoir un rôle potentiel dans la pathogenèse du CG, et sa prévalence combinée était estimée de 28,0 % parmi les 30 études incluses et le HPV16 était 3 fois plus fréquemment détecté que le HPV18. Une autre méta-analyse menée par **Bae. (2021)**, afin d'interpréter deux revues systématiques quantitatives précédentes enquêtant sur l'association entre l'infection au HPV et le risque du CG a conclu que la proportion de cas positifs au HPV dans les études chinoises était 1,43 fois plus élevée que celle des études non chinoises et 2,81 fois plus faible chez les témoins.

Les co-infections augmentent la susceptibilité des hôtes aux cancers en perturbant les réponses immunitaires. Elles agissent principalement comme des cofacteurs dans le développement du cancer et influencent les comportements tumoraux en réponse aux traitements. Une corrélation accrue de la coexistence du virus d'EBV et du HPV a été observée chez les patients atteints de cancer. Plusieurs études ont signalé une co-infection EBV-HPV dans divers types de carcinomes, tels que le carcinome du nasopharynx, le cancer du col de l'utérus, du sein et de la prostate [(**Shi *et al.*, 2016**) ; (**Nahand *et al.*, 2021**)]. Dans le cas du CG, la présence de ces deux virus au sein de la même population a été étudiée par **Anwar *et al.* (1995)**, **de Souza *et al.* (2018)** et **Boukhris *et al.* (2021)**. Cependant, ces études n'ont pas détecté la "coprésence" supposée lorsque le HPV et l'EBV sont tous deux présents dans les tumeurs, ce qui suggère que la "co-infection" qui se produit lorsque le HPV et l'EBV infectent la même cellule épithéliale était absente (**Blanco *et al.*, 2021**).

2.7. Conclusion

Notre étude n'a pas réussi à confirmer la présence du génome de l'EBV dans les tissus du CG de la population de l'Ouest Algérien, ainsi qu'il n'y a pas suffisamment de preuves d'une association significative entre le HPV et le CG. Les différences dans les résultats de la détection du HPV et de l'EBV peuvent être attribuées à divers facteurs tels que les méthodes utilisées, le type de matériel étudié (matériel congelé, matériel de paraffine), le choix des amorces, problème de population (facteurs génétiques) ainsi que des différences dans les facteurs environnementaux et géographiques. Par conséquent, d'autres investigations sont nécessaires pour confirmer une telle association.

3. Identification des anomalies moléculaires au sein du gène KRAS

3.1. Objectif

L'objectif fixé au début de cette étude était de détecter des mutations dans certains des gènes conducteurs les plus couramment mutés dans le cancer gastrique (TP53, KRAS, CDH1, ARDIA, APC, PIK3CA). Cependant, pour des raisons budgétaires, la recherche des mutations a été limitée à un seul gène : KRAS. Plus précisément, l'accent a été mis sur la détection des mutations de l'exon 2 de ce gène à partir des échantillons de tissus gastriques des patients de l'Ouest Algérien, en utilisant la méthode de séquençage Sanger.

3.2. Analyses statistiques

L'analyse des mutations a été réalisée par le logiciel IVG 2.16.1 (the Integrative Q12 Genomics Viewer) et le site Web Clinvar NCBI, ensuite la relation entre les mutations de l'exon 2 du gène KRAS et les caractéristiques clinico-pathologiques de tous les cas a été examinée par Microsoft Excel 2010.

3.3. Matériel et Méthodes

3.3.1. Sujets d'étude, échantillonnage et extraction d'ADN génomique

Le statut mutationnel du gène KRAS a été évalué sur 40 échantillons d'ADN provenant de la collection de 73 d'échantillons qui ont été pré-extraits et stockés en aliquotes à -20 °C.

Les détails sur la méthode de préparation des échantillons et l'extraction de l'ADN ont été exposés dans la section Matériel et Méthodes de l'étude visant à déterminer la fréquence des cancers gastriques associés aux virus EBV et HPV dans la région de l'Ouest Algérien.

3.3.2. Analyse mutationnelle

L'analyse mutationnelle du gène KRAS a été réalisée par le séquençage Sanger suivant trois étapes, décrites ci-dessous : amplification de la zone d'intérêt (KRAS exon 2), électrophorèse sur gel d'agarose, purification et séquençage.

➤ Amplification d'exon 2 du gène KRAS

Les étapes d'amplification ont été effectuées au sein de laboratoire LAMAABE faculté des sciences de la nature et de la vie et sciences de la terre et de l'univers, université de Tlemcen.

Les amorces utilisées pour obtenir un amplicon de 179 pb sont :

KRAS F : 5'-AGGCCTGCTGAAAATGACTGAATA-3'

KRAS R : 5'-TGTATCAAAGAATGGTCCTGCAC-3'

Pour les réactions de PCR avec un volume final de 25 µl, un mélange réactionnel (réactifs du kit WiraGen PCR) ont été préparés comme mentionné dans le tableau 7.

Tableau 7 : composition pour une réaction PCR

Composant	Concentration	Volume (µl)
10X Taq buffer	1X	2,5
2,5 Mm d’NTPs	200 µM	2
Amorce F	0,25 µM	0,625
Amorce R	0,25 µM	0,625
Taq polymerase	2,5 U	0,5
H2O	-	17,75
ADN	-	1

Les conditions de cycles de PCR étaient les suivantes : un cycle de dénaturation initial à 95 °C pendant 15 min suivies de 35 cycles de 95°C pendant 30 s, 60°C pendant 90 s et 72 °C pendant 90 s, puis un cycle final de 72°C pendant 10 min.

➤ **Électrophorèse sur gel d’agarose**

Après amplification, un volume de 5 µl de chaque réaction PCR a été séparé par l’électrophorèse pendant 40 min à 100 V sur un gel d'agarose à 2 % pour confirmer la taille, la quantité et la pureté de chaque produit PCR.

➤ **Purification et séquençage**

Cette étape a été réalisée via une prestation du service au le laboratoire « Gene Life Sciences » à sidi bel Abbés, selon le programme suivant :

Les produits PCR purifiés ont été séquencés dans les directions sens et anti sens dans des réactions et des duplicatas séparés. Chaque réaction contenait 4 µl d’ADN modèle, 2 µl de l’amorce PCR appropriée, 10 µl d’eau et 2 µl BigDye Terminator v3.1 Ready Reaction Mix (biosystèmes appliqués).

Chaque réaction a été chauffée à 96 °C pendant 1 min, suivie de 25 cycles à 96 °C pendant 10 s pour la dénaturation, 50 °C pendant 5 s pour l'hybridation et 60 °C pendant 4 s pour la polymérisation. Les produits de séquençage ont été purifiés à l'aide d'une méthode de précipitation à l'éthanol pour éliminer les réactifs non incorporés et assurer une charge neutre, brièvement, les produits de séquençage ont été lavés dans un mélange de précipitation d'éthanol de 80 µl (NaAc de 3 µl, éthanol à 62,5 µl à 95 % et eau de 14,5 µl) et l'ADN a été mis en pastilles par centrifugation (13 000, 15 min). La pastille a de nouveau été lavée dans 200 µl 75 % d'éthanol et centrifugée (13 000, 5 min). L'ADN granulé a été séché à l'air et réhydraté dans du formamide de 15 µl, puis chargé sur un réseau capillaire d'analyseur génétique 3130 pour la détection (biosystèmes appliqués). Deux séquences sens et deux séquences anti sens pour chaque échantillon ont été alignées à l'aide de Bionumerics v3.5 (Applied Maths) pour obtenir une séquence composite. La qualité de chaque séquence a été évaluée visuellement, et la séquence de mauvaise qualité a été modifiée et supprimée.

3.4. Résultats

➤ **Electrophorèse sur gel d'agarose des amplicons KRAS**

Tous les cas étudiés présentaient des bandes fluorescentes de 179 pb après électrophorèse sur gel d'agarose et détection avec un transilluminateur-UV.

➤ **Type et fréquence des mutations du gène KRAS**

Après le séquençage de Sanger, nous avons obtenu des électrophérogrammes à partir de lesquels les codons et les substitutions des bases étaient identifiés, dont deux exemples sont présentés dans la figure 14.

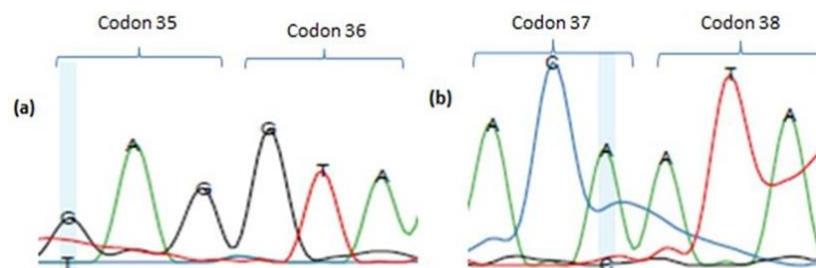


Figure 14 : des électrophérogrammes de séquençage Sanger du gène KRAS, (a) : la substitution T>G dans le codon 35, (b) : la substitution C>A dans le codon 37.

Nous n'avons détecté les mutations dans 9 codons de l'exon 2 dont quatre était significativement mutés qui sont le codon 37 (74,07%), 25 (51,85%), 31 (33,33%) et 35 (29,62%), et qui ont conduit à la production des substitutions c.109C>A (p.Gln>Asp), c.75C> (p.Asp>Tyr), c.91C>A (p.Lys>Asn) et c.105T>G (p.Thr>Ser) respectivement (Tableau 8). Il est à noter que 62,96 % (17 sur 27) patients ont des mutations dans plus qu'un seul codon.

Tableau 8 : Répartition des variantes de KRAS

Mutation KRAS				
Codon	Nombre de cas	%	Changement de nucléotide	Changement d'acide aminé
37	20	(74,07%)	c.109C>A	p.Glu>Stop
35	8	(29,62%)	c.105T>G	p.Thr>Thr
31	9	(33,33%)	c.91C>A	p.Gln>Stop
28	1	(3,70%)	c.83A>T	p.phe>Tyr
26	1	(3,70%)	c.77TT>T	p.Asn>Asn
25	14	(51,85%)	c.75C>A	p.Gln>Asp
23	1	(3,70%)	c.67G>T	p.Leu>Ile
20	1	(3,70%)	c.58T>TT	p.Thr>Thr
19	1	(3,70%)	c.57C>CC	p.Leu>Trp

Gln : glutamine (Q), **Asp** : acide aspartique (D), **Asn** : asparagine (N), **Tyr** : tyrosine (Y), **Ile** : isoleucine (I), **Glu** : acide glutamique (E), **Thr** : thréonine (T), **Leu** : leucine (L), **Trp** : tryptophane (W).

➤ **Distribution des caractéristiques tumorales selon le statut KRAS**

Un total de 40 cas de CG a été inclus dans l'analyse mutationnel, dont 28(70%) étaient des hommes et 12(30%) étaient des femmes avec un sexe-ratio de 2,33, l'âge moyen étaient de 59,62 ans avec une extrémité allons de 26 à 90 ans, 65% des patients avaient plus de 60 ans et 55% avaient un adénocarcinome modérément différencié.

Concernant l'association entre les caractéristiques clinico-pathologiques des patients et le statut KRAS, le taux de mutation KRAS dans la population de l'ouest Algérien était de 67,5%

(27 sur 40), dont 18 (66,66%) étaient des hommes contre 9 (33,33%) femmes avec un sexe-ratio de 2, la majorité des mutations ont été survenue chez des patients de plus de 60 ans (62,96%) et dans un adénocarcinome modérément différencié (48,14%) ainsi que dans un adénocarcinome bien différencié (33,33%) (Tableau 9).

Tableau 9 : distribution des caractéristiques tumorales selon le statut KRAS

Caractéristiques	Mutations KRAS		
	Globale (40)	Type Mutant (27)	Type sauvage (13)
Totale	40 (100%)	27 (67,5%)	13 (32,5%)
Sexe :			
Homme	28 (70%)	18 (66,66%)	10 (76,92%)
Femme	12 (30%)	9 (33,33%)	3 (23,07%)
Âge :			
>45	6 (15%)	4 (14,81%)	2 (15,38%)
45-60	8 (20%)	6 (22,22%)	2 (15,38%)
<60	26 (65%)	17 (62,96%)	9 (69,23%)
Degré de différenciation :			
A. bien différencié	11 (27,5%)	9 (33,33%)	2 (15,38%)
A. modérément différencié	22 (55%)	13 (48,14%)	9 (69,23%)
A. mal différencié	7 (17,5%)	5 (18,51%)	2 (15,38%)

A : Adénocarcinome

3.5. Discussion

La caractérisation systématique des mutations somatiques dans les génomes cancéreux est essentielle pour comprendre la maladie (**Kan et al., 2010**). Dans le CG, un certain nombre de gènes ont été identifiés comme conducteurs, y compris APC, ARID1A, BRAF, CDH1, TP53, CTNNB1 et KRAS [(**Cancer Genome Atlas Research Network, 2014**) ; (**Nemtsova et al., 2020**)]. La détection de mutations dans les principaux gènes moteurs peut avoir une valeur pronostique significative pour les patients atteints de CG et fournir un ensemble

indépendant de données génétiques cliniques et moléculaires liées à ce cancer (**Nemtsova et al., 2020**).

Le premier rapport sur les mutations de KRAS dans ce cancer a été publié en 1986. Depuis lors, de nombreuses études ont examiné le statut mutationnel de KRAS (**Gürsoy et al., 2022**), dont la fréquence a varié de 10 % à 15% (**Won et Choi, 2022**). Les mutations les plus fréquentes de ce gène dans le CG affectant spécifiquement les codons 12 et 13 de l'exon 2. Cependant, les informations sur les mutations KRAS en dehors de ces hotspots soient rares (**Queirós et al., 2015**).

Ces mutations sont fortement associées à une résistance aux traitements anti-EGFR (**Alkader et al., 2023**), car il a été démontré *in vitro* que la mutation KRAS pourrait être responsable d'une activation acquise de la voie de signalisation RAS/MAPK en aval de l'EGFR qui serait indépendante de la liaison du ligand au récepteur, et qui pourrait donc induire une résistance aux anticorps anti-EGFR (**Perkins et al., 2010**). La surexpression et les mutations activatrices des EGFR dans le CG ont été rapportées (**Kwon et al., 2019**), et l'utilité des inhibiteurs de l'EGFR dans le traitement du CG fait toujours l'objet de débats [(**Ayatollahi et al., 2018**) (**Gürsoy et al., 2022**)]. En 2011, **Lui et al. (2011)** ont suggéré qu'un petit sous-ensemble des patients atteints d'un adénocarcinome gastrique pourrait répondre à un traitement anti-EGFR de type TKI. De même **Shimozaki et al. (2023)** ont rapporté que les mutations de KRAS dans le CG étaient un facteur pronostique indépendant de faible survie et pouvaient prédire une faible efficacité du trastuzumab. Ainsi que peut être utile comme marqueur prédictif chez les patients atteints de CG métastatique et récidivante traités par chimiothérapie combinée SP (**Matusaka et al., 2016**).

Afin de clarifier le statut mutationnel KRAS dans la cancérogenèse gastrique dans une population de l'ouest de l'Algérie, la fréquence des mutations dans l'exon 2 de ce gène a été étudiée au sein de 40 cas.

Diverses méthodes de laboratoire ont été utilisées pour détecter les mutations du gène KRAS. La plupart des méthodes incluent l'utilisation de la PCR pour amplifier la région appropriée du gène KRAS, y compris les exons 2 et 3, puis utilisent différentes méthodes pour distinguer le type sauvage des séquences mutantes dans les codons clés. Les méthodes de détection comprennent séquençage des acides nucléiques, méthodes de PCR allèle-spécifiques, analyse du polymorphisme conformationnel simple brin, analyse de la courbe de fusion, hybridation de sondes et autres (**Anderson, 2011**). Pour notre analyse, nous avons utilisé la

méthode de séquençage de Sanger. Historiquement, le séquençage de Sanger a été la méthode de choix pour détecter les mutations dans l'ADN tumoral. Le séquençage de Sanger reste une technologie polyvalente, car il peut lire de longues étendues d'ADN jusqu'à 800 paires de bases. Il peut détecter des variations nucléotidiques jusqu'à environ 10% de fréquence allélique et est très sensible aux insertions et aux délétions. Le séquençage de Sanger étant une technologie chevronnée, il a été entièrement automatisé et les coûts des consommables sont faibles (**Timar et Kashofer, 2020**). Le plus grand défi de cette méthode est la possibilité d'un faible contenu tumoral. La microdissection de la tumeur, et donc l'enrichissement en cellules tumorales de l'échantillon avant l'extraction de l'ADN, est fortement recommandée et constitue un outil puissant pour améliorer l'analyse des mutations, une pratique qui a été mise en œuvre dans cette étude (**French et al., 2011**).

Suivant cette étude, le taux de mutation de l'exon 2 de KRAS dans 40 échantillons de patients de l'ouest de l'Algérie était de 67,5 %. Les résultats d'une étude iranienne menée par **Ayatollahi et al. (2018)**, ont révélé que les mutations de KRAS étaient de 30 % dans la population étudiée. Au Japon, une étude a signalé des mutations KRAS dans 18,51% des cas (**Yashiro et al., 2005**). Les taux de mutation de KRAS dans ces études sont considérés comme élevés par rapport aux valeurs généralement trouvés dans le CG. Cependant, le taux détecté dans la présente étude est significativement supérieur à ces valeurs.

Dans une série d'études chinoises, des mutations de KRAS sont survenues chez 0 %, 4,1 %, 6,67 % et 9,8 % des patients atteints de CG [(**Chen et al., 2011**) ; (**Peng et Zhao, 2014**) ; (**Yang et al., 2018**) ; (**Fu et al., 2019**)]. Il en était de même pour la Corée, où la fréquence des mutations de KRAS variait entre 2,8 % et 9 %. [(**Lee et al., 2003**) ; (**Kim et al., 2003**) ; (**Kim et al., 2017**)]. Dans diverses études japonaises, moins de 8% des tumeurs de l'estomac avaient une activation mutationnelle de KRAS [(**Van Grieken et al., 2013**) ; (**Kuboki et al., 2016**) ; (**Matsusaka et al., 2016**) ; (**Shimozaki et al., 2022**)].

La fréquence des mutations KRAS dans les échantillons de tissus cancéreux gastriques, tels que testés à Singapour, en Inde et au Royaume-Uni, s'élevait à 1,5%, 3,19% et 5,8% respectivement [(**Van Grieken et al., 2013**) ; (**Ponnala et Madireddi, 2019**)]. Selon l'étude réalisée par **Lordick et al. (2010)** dans sept institutions en Allemagne et en Autriche, une seule mutation KRAS (3,12%) a été trouvée sur une cohorte examinée de 32 échantillons. Ces variations soulignent l'hétérogénéité des taux de mutations de KRAS dans différentes régions géographiques et populations étudiées.

Les mutations de KRAS sont principalement des mutations ponctuelles d'un seul nucléotide (**Tan et Du, 2012**). Dans le cadre des cancers, les gènes Ras sont souvent porteurs de mutations faux-sens (**Won et Choi, 2022**). Les codons 37 (74,07%), 25 (51,85%), 31 (33,33%), 35 (29,62%), avaient les taux les plus élevés de mutations de l'exon 2 de KRAS dans les tissus testés ce qui ont conduit à la production des substitutions Glu37Stop, Gln25Asp, Gln31Stop, et Thr35Thr ceci est incompatible avec la littérature, car les codons 12 et 13, 61 et 146 sont connus pour être les quatre hotspots du gène KRAS (**Cook et al., 2021**), dont les modèles de substitution les plus courantes sont G12D et G13D (**Muñoz-Maldonado et al., 2019**).

Selon la base de données du catalogue des mutations somatiques dans le cancer COSMIC (Catalogue of Somatic Mutations in Cancer) (<http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>, consulté pour la dernière fois le 02/06/2023), les mutations dans le codon 19 et le codon 20 ont été signalées, en revanche les mutations dans les codons 37, 35, 31, 28, 26, 25 et 23 étaient détectées pour la première fois dans la présente étude. Un certain nombre de facteurs peuvent être la raison du profil caractéristique identifié et la question de savoir si ces mutations fournissent des informations sur l'applicabilité du gène KRAS en tant que biomarqueur dépend de divers éléments, notamment la réponse au traitement, des études de corrélation avec des paramètres cliniques et des essais fonctionnels pour déterminer l'impact biologique de ces mutations, ce qui souligne l'importance de mener des futures enquêtes spécifiquement axées sur la population de l'ouest Algérien afin d'approfondir davantage cette étude.

Dans notre population, un pourcentage important des mutations a été observé chez des patients de sexe masculin, âgés de plus de 60 ans et dans des cas d'adénocarcinomes gastriques modérément différenciés. Ces résultats suggèrent que les mutations de KRAS pourraient avoir un rôle spécifique chez les hommes, exercer une influence sur les patients plus âgés et contribuer au développement et à la progression de la tumeur. Ces observations pourraient s'expliquer de manière différente comme étant les caractéristiques clinico-pathologiques les plus courantes dans cette population. Dans des études antérieures, aucune association statistiquement significative n'a été rapportée entre les caractéristiques clinico-pathologiques et les mutations du gène KRAS [**Liu et al., 2009**] ; (**Hewitt et al., 2015**).

3.6. Conclusion

En résumé, suite à cette étude moléculaire, nous avons constaté un taux très élevé de mutations de l'exon 2 du gène KRAS, avec un statut exceptionnel par rapport à ce qui est connu à l'échelle mondiale. Cela nous a conduits à nous interroger sur le rôle et la spécificité des mutations KRAS chez la population algérienne.

Ces résultats soulèvent la possibilité que les mutations de KRAS dans les tissus gastriques pourraient contribuer à la carcinogenèse chez les patients algériens. Il est crucial d'entreprendre des études supplémentaires pour corroborer ou réfuter nos résultats, ainsi que pour examiner d'autres mutations génétiques en vue d'une meilleure compréhension du profil moléculaire et d'évaluation l'efficacité du traitement chez les patients atteints de CG. Une telle démarche permettrait d'élucider la relation entre ces mutations et le pronostic de la maladie.

Conclusion générale

Conclusion générale

Le CG est une affection fréquente qui présente un rapport élevé entre la mortalité et l'incidence, son pronostic est souvent sombre en raison du manque de dépistage précoce et de traitements efficaces. Parmi les tumeurs malignes liées aux infections, ce cancer occupe une place prépondérante à l'échelle mondiale. Il est largement reconnu que cette forme de cancer est étroitement associée à l'infection par *H. pylori*, qu'éventuellement par les virus EBV et HPV. Sur le plan morphologique et moléculaire, cette maladie se caractérise par une grande diversité et son développement se déroule sur une longue période en plusieurs étapes, influencées par divers facteurs, notamment les mutations génétiques dans des gènes clés tels que TP53, KRAS, ARID1A, et PIK3CA.

Par conséquent, les chercheurs se concentrent sur l'identification des facteurs de risque et l'analyse approfondie du profil moléculaire du CG. Cela permet non seulement de comprendre les bases moléculaires de la maladie, mais aussi d'identifier les gènes ayant une utilité clinique, en particulier les cibles thérapeutiques potentielles et spécifiques, dont l'objectif est de développer des biomarqueurs moléculaires qui pourraient améliorer la précision du diagnostic, prédire la progression de la maladie et guider les décisions de traitement.

Cette étude nous a donné l'occasion d'évaluer le profil épidémiologique du CG dans la Wilaya de Tlemcen, de rechercher l'éventuelle contribution des virus oncogènes (HPV, EBV) en tant que facteurs de risque au sein d'une population de l'ouest algérien, et de caractériser les mutations du gène KRAS dans cette même population, de ce fait, au cours d'une période de cinq ans (2011-2015), nous avons enregistré 394 cas de CG, ce qui en fait l'un des dix cancers les plus fréquents dans la wilaya de Tlemcen. La prédominance était masculine (60,4%), les patients de 50 à 70 ans représentaient la tranche d'âge prédominante, soit 50,3% des cas. Quant au risque de CG lié aux des infections virales, 1,36% des cas (1/73) étaient positifs pour le HPV, tandis que aucun cas d'infection par l'EBV n'a été détecté. En ce qui concerne le statut de l'exon 2 du gène KRAS, le taux de mutation dans la population de l'ouest algérien était de 67,5% (27 sur 40). Les résultats obtenus indiquent que le CG est l'un des cancers les plus fréquents dans la wilaya de Tlemcen, soulignant qu'il est essentiel de sensibiliser la population à l'importance du dépistage précoce. Les initiatives de dépistage devraient être mises en place pour encourager les personnes à se faire examiner régulièrement, en particulier celles qui présentent des symptômes tels que des troubles digestifs persistants, une perte de

poids inexpliquée ou une anémie. Ainsi que, il est essentiel de mettre en place des programmes de sensibilisation sur les facteurs de risque et les mesures de prévention du CG. De plus, nos observations révèlent que les virus (EBV, HPV) ne constituent pas un facteur de risque dans la population de l'ouest algérien. En revanche, les mutations du gène KRAS sont très fréquentes par rapport aux données de la littérature mondiale, ce qui nous amène à nous interroger sur son rôle dans la carcinogenèse gastrique.

Il serait intéressant de poursuivre cette étude par des futures investigations portant sur un échantillon représentatif de tumeurs gastriques. D'une part, il serait pertinent de se concentrer sur la détection des virus oncogènes en utilisant des techniques de biologie moléculaire telles que la PCR avec des amorces ciblant une petite région spécifique de l'ADN tumoral, ou encore la PCR nichée afin d'augmenter la sensibilité de la méthode et de valider de manière plus précise les résultats positifs par l'utilisation de la méthode ISH ainsi que de compléter ces résultats positifs en déterminant les types d'EBV et du HPV associés, car une étude approfondie de la prévalence de ces infections dans la population locale pourrait fournir une meilleure compréhension de leur impact sur le développement du CG. D'autre part, il serait important d'analyser les mutations dans le gène KRAS afin de vérifier si le profil mutationnel découvert est caractéristique de la population de l'ouest algérien. Il conviendrait également d'approfondir l'étude du profil moléculaire en recherchant d'éventuelles altérations (épi) génétiques dans d'autres gènes clés, ce qui est essentiel pour la caractérisation moléculaire des génomes du CG en Algérie.

Il est important de souligner que la mise en place d'une collaboration étroite multidisciplinaire impliquant des oncologues, des gastro-entérologues, des spécialistes des maladies infectieuses et des généticiens peut contribuer à améliorer les stratégies de prévention, de dépistage et de traitement du CG en Algérie.

Références bibliographiques

Références Bibliographies

- **Abbas, M., Faggian, A., Sintali, D. N., Khan, G. J., Naeem, S., Shi, M., & Dingding, C. (2018).** Current and future biomarkers in gastric cancer. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 103, 1688-1700.
- **Abe, H., Kaneda, A., & Fukayama, M. (2015).** Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma: use of host cell machineries and somatic gene mutations. *Pathobiology*, 82(5), 212-223.
- **Abouelkhair, M. A., & Kennedy, M. (2022).** Papillomaviridae and Polyomaviridae. *Veterinary Microbiology*, 484-488.
- **Abudoukadeer, A., Niyazi, M., Aikula, A., Kamilijian, M., Sulaiman, X., Mutailipu, A., & Abudula, A. (2015).** Association of EBV and HPV co-infection with the development of cervical cancer in ethnic Uyghur women. *Eur J Gynaecol Oncol*, 36(5), 546-50.
- **Adamson, A. L., & Kenney, S. (2001).** Epstein-barr virus immediate-early protein BZLF1 is SUMO-1 modified and disrupts promyelocytic leukemia bodies. *Journal of virology*, 75(5), 2388-2399.
- **Alain, S., Hantz, S., & Denis, F. (2010).** Papillomavirus: les virus et la physiopathologie de l'infection. *Médecine thérapeutique/Pédiatrie*, 13(1), 5-19.
- **Alain, S., Hantz, S., & Denis, F. (2010).** Papillomavirus: les virus et la physiopathologie de l'infection. *Médecine thérapeutique/Pédiatrie*, 13(1), 5-19.
- **Alkader, M. S., Altaha, R. Z., Badwan, S. A., Halalmeh, A. I., Al-Khawaldeh, M. H., Atmeh, M. T., ... & Maaita, F. M. (2023).** Impact of KRAS Mutation on Survival Outcome of Patients With Metastatic Colorectal Cancer in Jordan. *Cureus*, 15(1).
- **Al-Mahrouqi, H., Parkin, L., Sharples, K. (2011).** Incidence of stomach cancer in oman and the other gulf cooperation council countries. *Oman Med J*, 26(4), 258
- **Almonacid Urrego, I. C., Almonacid Urrego, C. C., Rosas Arango, S. M., Hernández Rojas, E. D. C., & González Devia, J. L. (2021).** The current outlook of human papillomavirus and its association with digestive tract cancer. *Revista Logos Ciencia & Tecnología*, 13(1), 129-143.
- **Al-Refaie, W. B., Hu, C. Y., Pisters, P. W., & Chang, G. J. (2011).** Gastric adenocarcinoma in young patients : a population-based appraisal. *Annals of surgical oncology*, 18, 2800-2807.
- **Al-Thawadi, H., Gupta, I., Jabeen, A., Skenderi, F., Aboukassim, T., Yasmeen, A., ... & Al Moustafa, A. E. (2020).** Co-presence of human papillomaviruses and Epstein–Barr virus is linked with advanced tumor stage : a tissue microarray study in head and neck cancer patients. *Cancer cell international*, 20(1), 1-13.
- **Amiel, C. (2013).** Le virus Epstein-Barr (EBV) : physiopathogénèse et diagnostic. *Revue Francophone*

des Laboratoires, 2013(456), 47-55.

- **Anderson, S. M. (2011).** Laboratory methods for KRAS mutation analysis. *Expert review of molecular diagnostics*, 11(6), 635-642.
- **Ang, T. L., & Fock, K. M. (2014).** Clinical epidemiology of gastric cancer. *Singapore medical journal*, 55(12), 621.
- **Anwar, K., Nakakuki, K., Imai, H., & Inuzuka, M. (1995).** Infection of human papillomavirus (hpv) and epstein-barr-virus (ebv) and p53 overexpression in human gastric-carcinoma. *International Journal of Oncology*, 7(2), 391-397.
- **Aoude, M., Mousallem, M., Abdo, M., Youssef, B., Kourie, H. R., & Al-Shamsi, H. O. (2022).** Gastric cancer in the Arab World: a systematic review. *Eastern Mediterranean Health Journal*, 28(7), 521-531.
- **Aslane, M., Al Haj, A., Henneb, A., Khenchouche, A., & Houali, K. (2016).** Characteristics of gastric carcinoma associated with Epstein Barr virus in Algeria. *Pharm Lett*, 8(17), 169-78.
- **Asombang, A. W., Rahman, R., & Ibdah, J. A. (2014).** Gastric cancer in Africa: current management and outcomes. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 20(14), 3875.
- **Atri-Schuller, A., Abushukair, H., Cavalcante, L., Hentzen, S., Saeed, A., & Saeed, A. (2022).** Tumor Molecular and Microenvironment Characteristics in EBV-Associated Malignancies as Potential Therapeutic Targets: Focus on Gastric Cancer. *Current Issues in Molecular Biology*, 44(11), 5756-5767.
- **Aviles-Jimenez, F., Vazquez-Jimenez, F., Medrano-Guzman, R., Mantilla, A., & Torres, J. (2014).** Stomach microbiota composition varies between patients with non-atrophic gastritis and patients with intestinal type of gastric cancer. *Scientific reports*, 4(1), 4202.
- **Awad, H. A., Hajeer, M. H., Abulihya, M. W., Al-Chalabi, M. A., & Al Khader, A.A. (2017).** Epidemiologic characteristics of gastric malignancies among Jordan University Hospital patients. *Saudi medical journal*, 38(9), 965.
- **Ayatollahi, H., Tavassoli, A., Jafarian, A. H., Alavi, A., Shakeri, S., Shams, S. F.,... & Bahrami, A. (2018).** KRAS codon 12 and 13 mutations in gastric cancer in the Northeast Iran. *Iranian Journal of Pathology*, 13(2), 167.
- **Azari, H., Nazari, E., Mohit, R., Asadnia, A., Maftooh, M., Nassiri, M., ... & Avan, A. (2023).** Machine learning algorithms reveal potential miRNAs biomarkers in gastric cancer. *Scientific Reports*, 13(1), 6147.
- **Baccili Cury Megid, T., Farooq, A. R., Wang, X., & Elimova, E. (2023).** Gastric Cancer: Molecular Mechanisms, Novel Targets, and Immunotherapies: From Bench to Clinical Therapeutics. *Cancers*, 15(20), 5075.

- **Badoual, C., Péré, H., Roussel, H., Mohamed, A. S., & Tartour, É. (2013).** Les cancers des voies aérodigestives supérieures associés aux papillomavirus. *Médecine*
- **Bae, J. M. (2021).** Human papillomavirus infection and gastric cancer risk: A meta-epidemiological review. *World journal of virology*, 10(5), 209.
- **Bai, Y., Xie, T., Wang, Z., Tong, S., Zhao, X., Zhao, F., ... & Shen, L. (2022).** Efficacy and predictive biomarkers of immunotherapy in Epstein-Barr virus-associated gastric cancer. *Journal for Immunotherapy of Cancer*, 10(3).
- **Baj, J., Forma, A., Dudek, I., Chilimoniuk, Z., Dobosz, M., Dobrzyński, M., ... & Portincasa, P. (2022).** The Involvement of Human Papilloma Virus in Gastrointestinal Cancers. *Cancers*, 14(11), 2607.
- **Batra, U., & Nathany, S. (2021).** Biomarker series: KRAS:-A narrative review. *Cancer Research, Statistics, and Treatment*, 4(3), 516-523.
- **Bekouaci, S., Nefradji, Y., Rekkache, S., Menouer, A., Mouaici, M., & Smaili, F. (2017).** Clinico-epidemiological profile of gastric cancer in Algerian patients age 45 and under. *Annals of Oncology*, 28, iii19.
- **Benarba, B., Meddah, B., & Hamdani, H. (2014).** Cancer incidence in North West Algeria (Mascara) 2000-2010: results from a population-based cancer registry. *EXCLIjournal*, 13, 709.
- **BenAyed-Guerfali, D., Ayadi, W., Miladi-Abdennadher, I., Khabir, A., Sellami-Boudawara, T., Gargouri, A., & Mokdad-Gargouri, R. (2011).** Characteristics of Epstein-Barr virus variants associated with gastric carcinoma in Southern Tunisia. *Virology journal*, 8(1), 1-9.
- **Berger, H., Marques, M. S., Zietlow, R., Meyer, T. F., Machado, J. C., & Figueiredo, C. (2016).** Gastric cancer pathogenesis. *Helicobacter*, 21, 34-38.
- **Bessis, D., & Laurent, R. (2008).** Infections à Herpesviridae. Manifestations dermatologiques des maladies infectieuses, métaboliques et toxiques : *Dermatologie et médecine*, vol. 2, 88-117.
- **Blanco, R., Carrillo-Beltrán, D., Corvalán, A. H., & Aguayo, F. (2021).** High-Risk Human Papillomavirus and Epstein-Barr Virus Coinfection: A Potential Role in Head and Neck Carcinogenesis. *Biology*, 10(12), 1232.
- **Boukhris, S. A., El Khadir, M., Benajah, D. A., El Rhazi, K., Ibrahimi, S. A., El Abkari, M., ... & Bennani, B. (2018).** Infection à l'Epstein-Barr virus et cancer gastrique : quelle association?. *Revue d'Épidémiologie et de Santé Publique*, 66, S166-S167.
- **Boukhris, S. A., Karim, S., Souho, T., Benajah, D. A., Ibrahimi, S. A., Chbani, L., ... & Bennani, B. (2021).** Gastric Cancer and Associated Pathogens: Is There Any Association in Moroccan Region?.
- **Boundedjar, A., Melzi, M. A., Idir, H., & Heba, N. (2022).** General Oncology Care in Algeria. In *Cancer*

in the Arab World (pp. 15-30). Singapore : Springer Singapore.

- **Bozdayi, G., Dinc, B., Avcikucuk, H., Turhan, N., Altay-Kocak, A., Ozkan, S., ... & Bostanci, B. (2019).** Is human papillomavirus and Helicobacter pylori related in gastric lesions. *Clin. Lab*, 65.
- **Braga-Neto, M. B., Carneiro, J. G., de Castro Barbosa, A. M., Silva, I. S., Maia, D.C., Maciel, F. S., ... & Braga, L. L. (2018).** Clinical characteristics of distal gastric cancer in young adults from Northeastern Brazil. *BMC cancer*, 18, 1-7.
- **Brasil-Costa, I., de Souza, C. R. T., Costa, I. B., Dos Santos, L. F. P., Paixão, L. C.F., Polaro, A. A., ... & Burbano, R. M. R. (2022).** Detection of Epstein-Barr virus in gastric adenocarcinoma: qPCR and FISH comparison. *Medical Microbiology and Immunology*, 211(1), 29-36.
- **Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018).** Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, 68(6), 394-424.
- **Bucchi, D., Stracci, F., Buonora, N., & Masanotti, G. (2016).** Human papillomavirus and gastrointestinal cancer : A review. *World journal of gastroenterology*, 22(33), 7415.
- **Burke, A. P., Yen, T. S., Shekitka, K. M., & Sobin, L. H. (1990).** Lymphoepithelial carcinoma of the stomach with Epstein-Barr virus demonstrated by polymerase chain reaction. *Modern pathology: an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 3(3), 377-380.
- **Butel, J. S. (2000).** Viral carcinogenesis: revelation of molecular mechanisms and etiology of human disease. *Carcinogenesis*, 21(3), 405-426.
- **Califf, R. M. (2018).** Biomarker definitions and their applications. *Experimental Biology and Medicine*, 243(3), 213-221.
- **Camargo, M. C., Bowlby, R., Chu, A., Pedamallu, C. S., Thorsson, V., Elmore, S.,... & Rabkin, C. S. (2016).** Validation and calibration of next-generation sequencing to identify Epstein-Barr virus-positive gastric cancer in The Cancer Genome Atlas. *Gastric Cancer*, 19(2), 676-681.
- **Canale, M., Casadei-Gardini, A., Ulivi, P., Arechederra, M., Berasain, C., Lollini, P. L.,... & Avila, M. A. (2020).** Epigenetic mechanisms in gastric cancer : Potential new therapeutic opportunities. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(15), 5500.
- **Cancer Genome Atlas Research Network. (2014).** Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. *Nature*, 513(7517), 202.
- **Cândido, A. C., de Lima Filho, J. L., Martins, D. B., Mendes, C. M., Vieira, J. R., & Ferraz, A. A. (2013).** Association of human papillomavirus genomic sequences by polymerase chain reaction in gastric carcinomas in Brazil. *Anal Quant Cytopathol Histopathol*, 35(1), 1-6.

- **Castañeda, C., Castillo, M., Bernabe, L., Suarez, N., Fassan, M. et al. (2022).** The relationship between tumour infiltrating lymphocytes, Epstein-Barr virus and Helicobacter pylori infection in gastric cancer. *Ecancermedicalsecience*, 16, 1362.
- **Chakraborty, S., Hosen, M. I., Ahmed, M., & Shekhar, H. U. (2018).** Onco-multi- OMICS approach: a new frontier in cancer research. *BioMed research international*, 2018.
- **Chaturvedi, A. K. (2010).** Beyond cervical cancer : burden of other HPV-related cancers among men and women. *Journal of adolescent health*, 46(4), S20-S26.
- **Chau, C. M., Zhang, X. Y., McMahon, S. B., & Lieberman, P. M. (2006).** Regulation of Epstein-Barr virus latency type by the chromatin boundary factor CTCF. *Journal of virology*, 80(12), 5723-5732.
- **Chaudhry, S. R., Liman, M. N. P., & Peterson, D. C. (2022).** Anatomy, abdomen and pelvis, stomach. In *StatPearls [Internet]*. StatPearls Publishing.
- **Chen, H. C., Chen, H. J., Khan, M. A., Rao, Z. Z., Wan, X. X., Tan, B., & Zhang, D. Z. (2011).** Genetic mutations of p53 and k-ras in gastric carcinoma patients from Hunan, China. *Tumor Biology*, 32, 367-373.
- **Chen, N., Hu, Y., Huang, R. Z., & Chen, D. L. (2023).** Circular RNA circTNIK promotes tumor progression and metastasis in gastric cancer by regulating ZEB2. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*.
- **Chen, X. Z., Chen, H., Castro, F. A., Hu, J. K., & Brenner, H. (2015).** Epstein–Barr virus infection and gastric cancer: a systematic review. *Medicine*, 94(20).
- **Cherif, M. H., Zaidi, Z., Abdellouche, D., Hamdi, S., Lakhdari, N., Bendjazia, A. D., ... & Guerra, D. (2010).** Registre du cancer de Sétif (Algérie): incidence, tendance et survie, 1986–2005. *Journal africain du cancer/African Journal of Cancer*, 4(2), 245-258.
- **Chia, N. Y., & Tan, P. (2016).** Molecular classification of gastric cancer. *Annals of Oncology*, 27(5), 763-769.
- **Chua, H. H., Lee, H. H., Chang, S. S., Lu, C. C., Yeh, T. H., Hsu, T. Y., ... & Tsai, C. H. (2007).** Role of the TSG101 gene in Epstein-Barr virus late gene transcription. *Journal of virology*, 81(5), 2459-2471.
- **Colquhoun, A., Arnold, M., Ferlay, J., Goodman, K. J., Forman, D., & Soerjomataram, I. (2015).** Global patterns of cardia and non-cardia gastric cancer incidence in 2012. *Gut*, 64(12), 1881-1888.
- **Compare, D., Rocco, A., & Nardone, G. (2010).** Risk factors in gastric cancer. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 14(4), 302-308.
- **Conti, C. B., Agnesi, S., Scaravaglio, M., Masseria, P., Dinelli, M. E., Oldani, M., & Uggeri, F.**

- (2023). Early gastric cancer: update on prevention, diagnosis and treatment. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 20(3), 2149.
- **Cook, J. H., Melloni, G. E., Gulhan, D. C., Park, P. J., & Haigis, K. M. (2021).** The origins and genetic interactions of KRAS mutations are allele- and tissue-specific. *Nature communications*, 12(1), 1808.
 - **Correia, S., Bridges, R., Wegner, F., Venturini, C., Palser, A., Middeldorp, J. M.,... & Farrell, P. J. (2018).** Sequence variation of Epstein-Barr virus : viral types, geography, codon usage, and diseases. *Journal of virology*, 92(22), e01132-18.
 - **Cuzzuol, B. R., Vieira, E. S., Araújo, G. R. L., Apolonio, J. S., de Carvalho, L. S., da Silva Junior, R. T., ... & de Melo, F. F. (2020).** Gastric cancer : a brief review, from risk factors to treatment. *Archives of Gastroenterology Research*, 1(2), 34-39.
 - **D'Abramo, C. M., & Archambault, J. (2011).** Small molecule inhibitors of human papillomavirus protein-protein interactions. *The open virology journal*, 5, 80.
 - **Daniels, I. R., Allum, W.H. (2005).** The anatomy and physiology of the stomach. In *Upper gastrointestinal surgery*, 17-37.
 - **Danilova, N. V., Mikhailov, I. A., Kalinin, D. V., Oleynikova, N. A., Chayka, A. V., Khomyakov, V. M., ... & Malkov, P. G. (2022).** Study of gastric adenocarcinomas association with the Epstein-Barr virus-encoded small RNAs. *Arkhiv Patologii*, 84(2), 5-12.
 - **de Martel, C., Forman, D., & Plummer, M. (2013).** Gastric cancer : epidemiology and risk factors. *Gastroenterology Clinics*, 42(2), 219-240.
 - **de Souza, C. R. T., Almeida, M. C. A., Khayat, A. S., da Silva, E. L., Soares, P. C., Chaves, L. C., & Burbano, R. M. R. (2018).** Association between Helicobacter pylori, Epstein-Barr virus, human papillomavirus and gastric adenocarcinomas. *World journal of gastroenterology*, 24(43), 4928.
 - **Del Moral-Hernández, O., Castañón-Sánchez, C. A., Reyes-Navarrete, S., Martínez-Carrillo, D. N., Betancourt-Linares, R., Jiménez-Wences, H., ... & Fernández-Tilapa, G. (2019).** Multiple infections by EBV, HCMV and Helicobacter pylori are highly frequent in patients with chronic gastritis and gastric cancer from Southwest Mexico : An observational study. *Medicine*, 98(3).
 - **Delecluse, H. J., Fink, S., Tsai, M. H., & Shumilov, A. (2017).** Le virus d'Epstein- Barr et le centriole, nouvelles liaisons dangereuses. *Médecine /sciences*, 33(6-7), 567- 569.
 - **Denis, F., Hanz, S., & Alain, S. (2008).** Clairance, persistance et récidence de l'infection à Papillomavirus. *Gynécologie obstétrique & fertilité*, 36(4), 430-440.
 - **Deniz, Z., Uraz, S., Holem, R., Ozaras, R., & Tahan, V. (2022).** Human Papillomavirus Infection and Oropharyngeal and Gastrointestinal Cancers : A Causal Relationship?. *Diseases*, 10(4), 94.

- **Dias, E. P., da Rocha, M. L., de Oliveira Carvalho, M. O., & de Amorim, L. M. D. F. (2009).** Detection of Epstein-Barr virus in recurrent tonsillitis. *Brazilian Journal of otorhinolaryngology*, 75(1), 30-34.
- **Dieudonne, Y., Martin, M., Korganow, A. S., Boutboul, D., & Guffroy, A. (2021).** EBV et immunodépression. *La Revue de Médecine Interne*, 42(12), 832-843.
- **Doorbar, J. (2006).** Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clinical science*, 110(5), 525-541.
- **Doorbar, J., Egawa, N., Griffin, H., Kranjec, C., & Murakami, I. (2015).** Human papillomavirus molecular biology and disease association. *Reviews in medical virology*, 25, 2-23.
- **Doorbar, J., Quint, W., Banks, L., Bravo, I. G., Stoler, M., Broker, T. R., & Stanley, M. A. (2012).** The biology and life-cycle of human papillomaviruses. *Vaccine*, 30, F55-F70.
- **Dugan, J. P., Coleman, C. B., & Haverkos, B. (2019).** Opportunities to target the lifecycle of Epstein-Barr virus (EBV) in EBV-associated lymphoproliferative disorders. *Frontiers in oncology*, 9, 127.
- **Dupont, C., Armant, D. R., & Brenner, C. A. (2009).** Epigenetics: definition, mechanisms and clinical perspective. In *Seminars in reproductive medicine*, 27 (05), 351-357.
- **Durães, C., Almeida, G. M., Seruca, R., Oliveira, C., & Carneiro, F. (2014).** Biomarkers for gastric cancer : prognostic, predictive or targets of therapy?. *Virchows Archiv*, 464, 367-378.
- **Ebrahimi, V., Soleimani, A., Ebrahimi, T., Azargun, R., Yazdani, P., Eyvazi, S., & Tarhriz, V. (2020).** Epigenetic modifications in gastric cancer: Focus on DNA methylation. *Gene*, 742, 144577.
- **Eide, M. L., & Debaque, H. (2012).** Méthodes de détection des HPVs et techniques de génotypage dans le dépistage du cancer du col utérin. In *Annales de pathologie*, 32 (6), 401-409.
- **Elemam, Y., & Bakhit, I. (2016).** Immunohistochemical based detection of HPV in gastric cancer among sudanese patient.
- **Elghali, M. A., Gouader, A., Bouriga, R., Mahjoub, M., Jarrar, M. S., Ziadi, S., ... & Ltaeif, R. (2018).** Gastric adenocarcinomas in Central Tunisia: evolution specificities through two decades and relation with helicobacter pylori. *Oncology*, 95, 121-128.
- **Ellis, H. (2011).** Anatomy of the stomach. *Surgery (Oxford)*, 29(11), 541-543.
- **Elmajjaoui, S., Ismaili, N., Zaidi, H., Elkacemi, H., Hassouni, K., Kebdani, T., & Benjaafar, N. (2014).** Epidemiological, clinical, pathological, and therapeutic aspects of gastric cancer in Morocco. *Clin Cancer Investig J*, 3(1), 3-8.
- **Epstein, M. A., Achong, B. G., & Barr, Y. M. (1964).** Virus particles in cultured lymphoblasts from Burkitt's lymphoma. *The Lancet*, 283(7335), 702-703.

- **Erol, D., Bulut, Y., Yüce, H., & Ozercan, I. H. (2009).** Investigation of the presence of human papillomavirus DNA in various gastrointestinal carcinoma samples. *Mikrobiyoloji bulteni*, 43(2), 259-268.
- **Evans, M. F., Adamson, C. S., Simmons-Arnold, L., & Cooper, K. (2005).** Touchdown General Primer (GP5+/GP6+) PCR and optimized sample DNA concentration support the sensitive detection of human papillomavirus. *BMC clinical pathology*, 5, 1-14.
- **Fakhraei, F., Haghshenas, M. R., Hosseini, V., Rafiei, A., Naghshvar, F., & Alizadeh-Navaei, R. (2016).** Detection of human papillomavirus DNA in gastric carcinoma specimens in a high-risk region of Iran. *Biomedical reports*, 5(3), 371-375.
- **Fattahi, S., Kosari-Monfared, M., Ghadami, E., Golpour, M., Khodadadi, P., Ghasemiyan, M., & Akhavan-Niaki, H. (2018).** Infection-associated epigenetic alterations in gastric cancer : New insight in cancer therapy. *Journal of cellular physiology*, 233(12), 9261-9270.
- **Fehim, S., Bouhaous, R., Diaf, M., Drici, A. M., & Khaled, M. B. (2017).** Epidemiological profile of gastric cancer in the northwestern region of Algeria: about 116 cases. *Journal of Gastrointestinal Oncology*, 8(4), 659.
- **Fernandes, Q., Gupta, I., Vranic, S., & Al Moustafa, A. E. (2020).** Human papillomaviruses and epstein–barr virus interactions in colorectal cancer: A briefreview. *Pathogens*, 9(4), 300.
- **Figueiredo, C., Costa, S., Karameris, A., & Machado, J. C. (2015).** Pathogenesis of gastric cancer. *Helicobacter*, 20, 30-35.
- **French, D., Smith, A., Powers, M. P. et Wu, A. H. (2011).** La détection de la mutation KRAS dans le cancer colorectal par un réseau de puces génétiques disponible dans le commerce se compare bien au séquençage de Sanger. *Clinica Chimica Acta*, 412(17- 18), 1578-1581.
- **Fu, D. G. (2015).** Epigenetic alterations in gastric cancer. *Molecular medicine reports*, 12(3), 3223-3230.
- **Fu, X. H., Chen, Z. T., Wang, W. H., Fan, X. J., Huang, Y., Wu, X. B., ... & Wang, J. P. (2019).** KRAS G12V mutation is an adverse prognostic factor of Chinese gastric cancer patients. *Journal of Cancer*, 10(4), 821.
- **Fukayama, M., Hino, R., & Uozaki, H. (2008).** Epstein–Barr virus and gastric carcinoma: virus–host interactions leading to carcinoma. *Cancer science*, 99(9), 1726- 1733.
- **Fukayama, M. (2010).** Epstein-Barr virus and gastric carcinoma. *Pathology international*, 60(5), 337-350.
- **García-Alfonso, P., Pérez-Solero, G. T., Alsar, J. S., Martin, A. M., & Parrondo, J. (2021).** Biomarkers in early colorectal, esophageal, and gastric cancer. *Clin Case Rep Rev*, 7, 1-7.

- **Gequelin, L. C. F., Riediger, I. N., Nakatani, S. M., Biondo, A. W., & Bonfim, C. M. (2011).** Epstein-Barr virus : general factors, virus-related diseases and measurement of viral load after transplant. *Revista brasileira de hematologia e hemoterapia*, 33, 383-388.
- **Germi, R., Baccard, M., Seigneurin, J. M., & Morand, P. (2011).** Infections à virus Epstein-Barr. *EMC-Maladies infectieuses*, 8(4), 1-14.
- **Gheit, T. (2019).** Mucosal and cutaneous human papillomavirus infections and cancer biology. *Frontiers in Oncology*, 9, 355.
- **Goossens, N., Nakagawa, S., Sun, X., & Hoshida, Y. (2015).** Cancer biomarker discovery and validation. *Translational cancer research*, 4(3), 256.
- **Grabsch, H. I., & Tan, P. (2013).** Gastric cancer pathology and underlying molecular mechanisms. *Digestive surgery*, 30(2), 150-158.
- **Graham, S. V. (2010).** Human papillomavirus : gene expression, regulation and prospects for novel diagnostic methods and antiviral therapies. *Future microbiology*, 5(10), 1493-1506.
- **Grm, H. S., Bergant, M., & Banks, L. (2009).** Human papillomavirus infection, cancer & therapy. *Indian Journal of Medical Research*, 130(3), 277-285.
- **Gruffat, H., Kadjouf, F., Mariamé, B., & Manet, E. (2012).** The Epstein-Barr virus BcRF1 gene product is a TBP-like protein with an essential role in late gene expression. *Journal of virology*, 86(11), 6023-6032.
- **Guan, Y., Jakimovski, D., Ramanathan, M., Weinstock-Guttman, B., & Zivadinov, R. (2019).** The role of Epstein-Barr virus in multiple sclerosis: from molecular pathophysiology to in vivo imaging. *Neural regeneration research*, 14(3), 373.
- **Gulley, M. L. (2015).** Genomic assays for Epstein-Barr virus-positive gastric adenocarcinoma. *Experimental & molecular medicine*, 47(1), e134-e134.
- **Gullo, I., Carneiro, F., Oliveira, C., & Almeida, G. M. (2018).** Heterogeneity in gastric cancer : from pure morphology to molecular classifications. *Pathobiology*, 85(1-2), 50-63.
- **Gullo, I., Grillo, F., Mastracci, L., Vanoli, A., Carneiro, F., Saragoni, L., ... & Fassan, M. (2020).** Precancerous lesions of the stomach, gastric cancer and hereditary gastric cancer syndromes. *Pathologica*, 112(3), 166.
- **Guo, X., Zhang, Y., Zhang, Z., Lu, L., Liu, Y., Li, Z., ... & Pan, K. (2023).** Gastric cancer-associated long non-coding RNA profiling and noninvasive biomarker screening based on a high-risk population cohort. *Cancer Medicine*.
- **Gürsoy, D., Seçinti, İ. E., Doğan, E., & Temiz, M. (2022).** Clinicopathologic features and KRAS

mutation incidence of gastric carcinomas. *Journal of Contemporary Medicine*, 12(1), 1-5.

- **Hatton, O. L., Harris-Arnold, A., Schaffert, S., Krams, S. M., & Martinez, O. M. (2014).** The interplay between Epstein–Barr virus and B lymphocytes: implications for infection, immunity, and disease. *Immunologic research*, 58, 268-276.
- **Hewitt, L. C., Hutchins, G. G., Melotte, V., Saito, Y., & Grabsch, H. I. (2015).** KRAS, BRAF and gastric cancer. *Transl Gastrointest Cancer*, 4(6), 429-47.
- **Hippocrate, A., Oussaief, L., & Joab, I. (2011).** Possible role of EBV in breast cancer and other unusually EBV-associated cancers. *Cancer letters*, 305(2), 144-149 □
- **Hirabayashi, M., Georges, D., Clifford, G. M., & de Martel, C. (2023).** Estimating the Global Burden of Epstein-Barr Virus–Associated Gastric Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 21(4), 922-930.
- **Holland, J. F. (2010).** *Holland-Frei cancer medicine 8 (Vol. 8)*. PMPH-USA.
- **Holm, B., Barsuhn, S., Behrens, H. M., Krüger, S., & Röcken, C. (2023).** The tumor biological significance of RNF43 and LRP1B in gastric cancer is complex and context- dependent. *Scientific Reports*, 13(1), 3191.
- **Hong, X., & Liu, F. (2022).** Molecular Biomarkers for Gastric Cancer. *Frontiers in Oncology*, 12.
- **Hussein, W. M., Anwar, W. A., Attaleb, M., Mazini, L., Försti, A., Trimbitas, R. D., & Khyatti, M. (2016).** A review of the infection-associated cancers in North African countries. *Infectious agents and cancer*, 11, 1-12.
- **Ignatova, E., Seriak, D., Fedyanin, M., Tryakin, A., Pokataev, I., Menshikova, S.,... & Ajani, J. A. (2020).** Epstein–Barr virus-associated gastric cancer: disease that requires special approach. *Gastric Cancer*, 23, 951-960.
- **Iizasa, H., Nanbo, A., Nishikawa, J., Jinushi, M., & Yoshiyama, H. (2012).** Epstein-Barr Virus (EBV)-associated gastric carcinoma. *Viruses*, 4(12), 3420-3439.
- **Ilic, M., & Ilic, I. (2022).** Epidemiology of stomach cancer. *World journal of gastroenterology*, 28(12), 1187.
- **Isobe, T., Hashimoto, K., Kizaki, J., Miyagi, M., Aoyagi, K., Koufuji, K., & Shirouzu, K. (2013).** Characteristics and prognosis of gastric cancer in young patients. *Oncology reports*, 30(1), 43-49.
- **Jafari-Sales, A., Shariat, A., Baghi, H. B., Baradaran, B., & Jafari, B. (2022).** The Presence of Human Papillomavirus and Epstein-Barr Virus Infection in Gastric Cancer: A Systematic Study. *Oncologie*, 24(3).
- **Jafari-Sales, A., Shariat, A., Bannazadeh-Baghi, H., Baradaran, B., & Jafari, B. (2023).** Human

Papillomavirus (HPV) Prevalence and E6 Protein Expression in Gastric Cancer Tissue Samples Compared with Non-malignant and Control Groups in East Azerbaijan Province, Iran, 2021. *Iranian Journal of Medical Microbiology*, 17(1), 58- 65.

- **Jia, X., Guo, T., Li, Z., Zhang, M., Feng, Y., Dong, B., ... & Ji, J. (2021).** Clinicopathological and immunomicroenvironment characteristics of Epstein–Barr virus-associated gastric cancer in a chinese population. *Frontiers in oncology*, 10, 586752.
- **Jin, Z., Jiang, W., & Wang, L. (2015).** Biomarkers for gastric cancer : Progression in early diagnosis and prognosis. *Oncology letters*, 9(4), 1502-1508.
- **Jonaitis, P., Kiudelis, V., Streleckiene, G., Gedgaudas, R., Skieceviciene, J., & Kupcinskas, J. (2022).** Novel Biomarkers in the Diagnosis of Benign and Malignant Gastrointestinal Diseases. *Digestive Diseases*, 40(1), 1-13.
- **Kajitani, N., Satsuka, A., Kawate, A., & Sakai, H. (2012).** Productive lifecycle of human papillomaviruses that depends upon squamous epithelial differentiation. *Frontiers in microbiology*, 3, 152.
- **Kan, Z., Jaiswal, B. S., Stinson, J., Janakiraman, V., Bhatt, D., Stern, H. M., ... & Seshagiri, S. (2010).** Diverse somatic mutation patterns and pathway alterations in human cancers. *Nature*, 466(7308), 869-873.
- **Karimi, P., Islami, F., Anandasabapathy, S., Freedman, N. D., & Kamangar, F. (2014).** Gastric Cancer: Descriptive Epidemiology, Risk Factors, Screening, and Prevention Gastric Cancer. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention*, 23(5), 700-713.
- **Katona, B. W., & Rustgi, A. K. (2017).** Gastric cancer genomics: advances and future directions. *Cellular and molecular gastroenterology and hepatology*, 3(2), 211-217.
- **Kawa, K. (2000).** Epstein-Barr virus--associated diseases in humans. *International journal of hematology*, 71(2), 108-117.
- **Puneet, Kazmi, H. R., Kumari, S., Tiwari, S., Khanna, A., & Narayan, G. (2018).** Epigenetic mechanisms and events in gastric cancer-emerging novel biomarkers. *Pathology & Oncology Research*, 24, 757-770..
- **Kelley, J. R., Duggan, J. M. (2003).** Gastric cancer epidemiology and risk factors. *Journal of clinical epidemiology*. 56(1), 1-9.
- **Kempkes, B., & Robertson, E. S. (2015).** Epstein-Barr virus latency: current and future perspectives. *Current Opinion in Virology*, 14, 138-144.
- **Kenney, S. C. (2007).** Reactivation and lytic replication of EBV. *Human herpesviruses: biology, therapy, and immunoprophylaxis*.

- **Kerr, J. R. (2019).** Epstein-Barr virus (EBV) reactivation and therapeutic inhibitors. *Journal of clinical pathology*, 72(10), 651-658.
- **Kim, I. J., Park, J. H., Kang, H. C., Shin, Y., Park, H. W., Park, H. R., ... & Park, J. G. (2003).** Mutational analysis of BRAF and K-ras in gastric cancers : absence of BRAF mutations in gastric cancers. *Human genetics*, 114, 118-120.
- **Kim, Y., Cho, M. Y., Kim, J., Kim, S. N., Oh, S. C., & Lee, K. A. (2017).** Profiling cancer-associated genetic alterations and molecular classification of cancer in Korean gastric cancer patients. *Oncotarget*, 8(41), 69888.
- **Kole, C., Charalampakis, N., Sakellariou, S., Papaxoinis, G., Apostolou, K. G., Machairas, N., ... & Schizas, D. (2022).** Hereditary Diffuse Gastric Cancer: A 2022 Update. *Journal of Personalized Medicine*, 12(12), 2032.
- **Krejs, G. J. (2010).** Gastric cancer : epidemiology and risk factors. *Digestive diseases*, 28(4-5), 600-603.
- **Kuboki, Y., Yamashita, S., Niwa, T., Ushijima, T., Nagatsuma, A., Kuwata, T., ... & Ohtsu, A. (2016).** Comprehensive analyses using next-generation sequencing and immunohistochemistry enable precise treatment in advanced gastric cancer. *Annals of Oncology*, 27(1), 127-133.
- **Kwon, Y., Kim, M., Jung, H. S., Kim, Y., & Jeoung, D. (2019).** Targeting autophagy for overcoming resistance to anti-EGFR treatments. *Cancers*, 11(9), 1374.
- **Landa, S. T., Dumon, K. R., & Dempsey, D. T. (2019).** Anatomy and Physiology of the Stomach and Pylorus. *The SAGES manual of foregut surgery*, 49-64.
- **Lauren, P. (1965).** The two histological main types of gastric carcinoma: diffuse and so-called intestinal-type carcinoma: an attempt at a histo-clinical classification. *Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica*, 64(1), 31-49.
- **Ławniczak, M., Gawin, A., Jaroszewicz-Heigelmann, H., Rogoza-Mateja, W., Bialek, A., Kulig, J., ... & Starzyńska, T. (2020).** Analysis of clinicopathologic characteristics of gastric cancer in patients ≤ 40 and ≥ 40 years of age. *Scandinavian journal of gastroenterology*, 55(1), 62-66.
- **Lee, J., Lee, M. A., Kim, I. H., & Roh, S. Y. (2016).** Clinical characteristics of young-age onset gastric cancer in Korea. *BMC gastroenterology*, 16, 1-7.
- **Lee, S. H., Lee, J. W., Soung, Y. H., Kim, H. S., Park, W. S., Kim, S. Y., ... & Yoo, N. J. (2003).** BRAF and KRAS mutations in stomach cancer. *Oncogene*, 22(44), 6942-6945.
- **Lee, Y. Y., & Derakhshan, M. H. (2013).** Environmental and lifestyle risk factors of gastric cancer. *Archives of Iranian medicine*, 16(6), 0-0.
- **Lepiller, Q., Puget, L., Debernardi, A., & Prétet, J. L. (2021).** Infections à papillomavirus humains et

lésions associées. *Journal de Pédiatrie et de Puériculture*, 34(3), 122-129.

- **Li, G., Zhou, Z., Wang, Z., & Wang, Z. (2023).** Assessing Epstein–Barr virus in gastric cancer: clinicopathological features and prognostic implications. *Infectious Agents and Cancer*, 18(1), 11.
- **Li, H., Liu, S., Hu, J., Luo, X., Li, N., Bode, A. M., & Cao, Y. (2016).** Epstein-Barr virus lytic reactivation regulation and its pathogenic role in carcinogenesis. *International journal of biological sciences*, 12(11), 1309.
- **Li, Y., & Xu, C. (2017).** Human papillomavirus-related cancers. *Infectious agents associated cancers: Epidemiology and molecular biology*, 23-34.
- **Liu, Z. M., Liu, L. N., Li, M., Zhang, Q. P., Cheng, S. H., & Lu, S. (2009).** Mutation detection of KRAS by high-resolution melting analysis in Chinese with gastric cancer. *Oncology reports*, 22(3), 515-520.
- **Liu, Z., Liu, L., Li, M., Wang, Z., Feng, L., Zhang, Q., ... & Lu, S. (2011).** Epidermal growth factor receptor mutation in gastric cancer. *Pathology*, 43(3), 234-238.
- **Lordick, F., Carneiro, F., Cascinu, S., Fleitas, T., Haustermans, K., Piessen, G., ... & Smyth, E. C. (2022).** Gastric cancer: ESMO Clinical Practice Guideline for diagnosis, treatment and follow-up☆. *Annals of Oncology*, 33(10), 1005-1020.
- **Lordick, F., Lubber, B., Lorenzen, S., Hegewisch-Becker, S., Folprecht, G., Wöll, E., ... & Peschel, C. (2010).** Cetuximab plus oxaliplatin/leucovorin/5-fluorouracil in first-line metastatic gastric cancer: a phase II study of the Arbeitsgemeinschaft Internistische Onkologie (AIO). *British journal of cancer*, 102(3), 500-505.
- **Lowy, D. R. et Schiller, J. T. (2012).** Réduire le cancer associé au HPV à l'échelle mondiale. *Cancer prevention research*, 5(1), 18-23.
- **Lu, W., Wei, H., Li, M., Wang, H., Liu, L., Zhang, Q., ... & Lu, S. (2015).** Identification of KRAS and PIK3CA but not BRAF mutations in patients with gastric cancer. *Molecular Medicine Reports*, 12(1), 1219-1224.
- **Luo, Y., Liu, Y., Wang, C., & Gan, R. (2021).** Signaling pathways of EBV-induced oncogenesis. *Cancer Cell International*, 21, 1-11.
- **Lupo, J., Thiebaut-Bertrand, A., Epaulard, O., Morand, P., & Germe, R. (2019).** Virus d'Epstein-Barr et syndromes lymphoprolifératifs post-transplantation. *Revue Francophone des Laboratoires*, 2019(515), 26-35.
- **Ma, T. Y., Liu, W. K., Chu, Y. L., Jiang, X. Y., An, Y., Zhang, M. P., & Zheng, J. W. (2007).** Detection of human papillomavirus type 16 DNA in formalin-fixed,

paraffin-embedded tissue specimens of gastric carcinoma. *European journal of gastroenterology & hepatology*, 19(12), 1090-1096.

- **Mac, M., & Moody, C. A. (2020).** Epigenetic regulation of the human papillomavirus life cycle. *Pathogens*, 9(6), 483.
- **Machlowska, J., Baj, J., Sitarz, M., Maciejewski, R., & Sitarz, R. (2020).** Gastric cancer: epidemiology, risk factors, classification, genomic characteristics and treatment strategies. *International journal of molecular sciences*, 21(11), 4012.
- **Madu, C. O., & Lu, Y. (2010).** Novel diagnostic biomarkers for prostate cancer. *Journal of Cancer*, 1, 150.
- **Mahadevan, V. (2014).** Anatomy of the stomach. *Surgery (Oxford)*, 32(11), 571-574.
- **Mallakh, M. K., Mahmood, M. M., & Ali, S. H. M. (2022).** Expression of a cell cycleregulatory protein (P73) correlated with IL-10 levels in HPV-infected gastric cancer patients. *Bulletin of National Institute of Health Sciences*, 140(1), 1123-1132.
- **Mansfield, P. F. (2011).** Clinical features, diagnosis, and staging of gastric cancer. *Last literature review*: May.
- **Mao, Y., Yang, W., Qi, Q., Yu, F., Wang, T., Zhang, H., ... & Jin, G. (2019).** Blood groups A and AB are associated with increased gastric cancer risk: evidence from a large genetic study and systematic review. *BMC cancer*, 19(1), 1-9.
- **Maréchal, V., & Piolot, T. (2001).** Le virus epstein-barr: structure et cycle biologique. *Revue Francaise des Laboratoires*, 2001(337), 25-31.
- **Martinez-Ciarpaglini, C., Fleitas-Kanonnikoff, T., Gambardella, V., Llorca, M., Mongort, C., Mengual, R., ... & Cervantes, A. (2019).** Assessing molecular subtypes of gastric cancer : microsatellite unstable and Epstein-Barr virus subtypes. Methods for detection and clinical and pathological implications. *ESMO open*, 4(3), e000470.
- **Maruvada, P., Wang, W., Wagner, P. D., & Srivastava, S. (2005).** Biomarkers in molecular medicine: cancer detection and diagnosis. *Biotechniques*, 38(S4), S9-S15.
- **Matsuoka, T., & Yashiro, M. (2018).** Biomarkers of gastric cancer: Current topics and future perspective. *World journal of gastroenterology*, 24(26), 2818.
- **Matusaka, S., Kobunai, T., Yamamoto, N., Chin, K., Ogura, M., Tanaka, G., ... & Yamaguchi, T. (2016).** Prognostic impact of KRAS mutant type and MET amplification in metastatic and recurrent gastric cancer patients treated with first-line S-1 plus cisplatin chemotherapy. *Genes & cancer*, 7(1-2), 27.
- **Maurmann, S., Fricke, L., Wagner, H. J., Schlenke, P., Hennig, H., Steinhoff, J. et Jabs, W. J.**

- (2003). Paramètres moléculaires pour un diagnostic précis de la réactivation asymptomatique du virus d'Epstein-Barr chez les porteurs sains. *Journal of clinical microbiology*, 41(12), 5419-5428.
- **McBride, A. A. (2008).** Replication and partitioning of papillomavirus genomes. *Advances in virus research*, 72, 155-205.
 - **McKenzie, J., & El-Guindy, A. (2015).** Epstein-Barr virus lytic cycle reactivation. *Epstein Barr Virus Volume 2: One Herpes Virus: Many Diseases*, 237-261.
 - **McLean, M. H., & El-Omar, E. M. (2014).** Genetics of gastric cancer. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*, 11(11), 664-674.
 - **Miller, G. (1990).** The switch between latency and replication of Epstein-Barr virus. *Journal of Infectious Diseases. Vol.161(5)*. pp. 833-844.
 - **Moore, A., Hikri, E., Goshen-Lago, T., Barkan, T., Morgenstern, S. et al. (2020).** Young-onset gastric cancer and Epstein-Barr Virus (EBV)—A major player in the pathogenesis? *BMC Cancer*, 20(1), 1–7.
 - **Mordente, A., Meucci, E., Martorana, G. E., & Silvestrini, A. (2015).** Cancer biomarkers discovery and validation: state of the art, problems and future perspectives. *Advances in Cancer Biomarkers: From biochemistry to clinic for a critical revision*, 9-26.
 - **Morgan, E., Arnold, M., Camargo, M. C., Gini, A., Kunzmann, A. T., Matsuda, T.,... & Soerjomataram, I. (2022).** The current and future incidence and mortality of gastric cancer in 185 countries, 2020–40 : A population-based modelling study. *EClinicalMedicine*, 47, 101404.
 - **Morshed, K., Polz-Gruszka, D., Szymański, M., & Polz-Dacewicz, M. (2014).** Human papillomavirus (HPV)—structure, epidemiology and pathogenesis. *Otolaryngologia Polska*, 68(5), 213-219.
 - **Mougin, C., Humbey, O., Gay, C., & Riethmuller, D. (2000).** Papillomavirus humains, cycle cellulaire et cancer du col de l'utérus. *Journal de gynécologie obstétrique et biologie de la reproduction*, 29(1), 13-20.
 - **Mougin, C., Nicolier, M., & Decrion-Barthod, A. Z. (2008).** HPV et cancers: mécanismes de l'oncogénèse. *Revue francophone des laboratoires*, 2008(405), 35-42.
 - **Moussaoui, H., Fermas, N., Kara, L., Abdoun, M., Bouaoud, S., Hamdi Cherif, M. (2022).** Cancer gastrique dans la région Est et Sud-Est de l'Algérie 2014–2018: incidence, répartition géographique et évolution. *ALGERIAN JOURNAL OF HEALTH SCIENCES*, 04 (02), 155– 166.
 - **Muñoz-Maldonado, C., Zimmer, Y., & Medová, M. (2019).** A comparative analysis of individual RAS mutations in cancer biology. *Frontiers in oncology*, 9, 1088.
 - **Münger, K., Baldwin, A., Edwards, K. M., Hayakawa, H., Nguyen, C. L., Owens, M.,...& Huh, K. (2004).** Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis. *Journal of virology*, 78(21), 11451-

- **Münz, C. (2019).** Latency and lytic replication in Epstein–Barr virus-associated oncogenesis. *Nature Reviews Microbiology*, 17(11), 691-700.
- **Murata, T., & Tsurumi, T. (2014).** Switching of EBV cycles between latent and lytic states. *Reviews in medical virology*, 24(3), 142-153.
- **Nahand, J. S., Khanaliha, K., Mirzaei, H., Moghoofei, M., Baghi, H. B., Esghaei, M., ... & Bokharaei-Salim, F. (2021).** Possible role of HPV/EBV coinfection in anoikis resistance and development in prostate cancer. *BMC cancer*, 21, 1-19.
- **Naseem, M., Barzi, A., Brezden-Masley, C., Puccini, A., Berger, M. D., Tokunaga, R., ... & Lenz, H. J. (2018).** Outlooks on Epstein-Barr virus associated gastric cancer. *Cancer treatment reviews*, 66, 15-22.
- **Nasr, R., Shamseddine, A., Mukherji, D., Nassar, F., & Temraz, S. (2020).** The crosstalk between microbiome and immune response in gastric cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(18), 6586.
- **Necula, L., Matei, L., Dragu, D., Neagu, A. I., Mambet, C., Nedeianu, S., ... & Chivu-Economescu, M. (2019).** Recent advances in gastric cancer early diagnosis. *World journal of gastroenterology*, 25(17), 2029.
- **Nemtsova, M. V., Kalinkin, A. I., Kuznetsova, E. B., Bure, I. V., Alekseeva, E. A., Bykov, I. I., ... & Strelnikov, V. V. (2020).** Clinical relevance of somatic mutations in main driver genes detected in gastric cancer patients by next-generation DNA sequencing. *Scientific Reports*, 10(1), 1-11.
- **Nguyen, H. T., Tatipamula, V. B., Do, D. N., Huynh, T. C., & Dang, M. K. (2022).** Retrieving high-quality genomic DNA from formalin-fixed paraffin-embedded tissues for multiple molecular analyses. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 52(1), 48-55.
- **Niclauss, N., Gütgemann, I., Dohmen, J., Kalff, J. C., & Lingohr, P. (2021).** Novel biomarkers of gastric adenocarcinoma: current research and future perspectives. *Cancers*, 13(22), 5660.
- **Nie, Y., Wu, K., Yu, J., Liang, Q., Cai, X., Shang, Y., ... & Fan, D. (2017).** A global burden of gastric cancer : the major impact of China. *Expert review of gastroenterology & hepatology*, 11(7), 651-661.
- **Nie, Y., Zhao, W., Lu, L., & Zhou, F. (2023).** Predictive biomarkers and new developments of immunotherapy in gastric cancer: a 2023 update. *American Journal of Cancer Research*, 13(7), 3169.
- **Nogueira, C., Mota, M., Gradiz, R., Cipriano, M. A., Caramelo, F., Cruz, H., ... & Leitão, M. (2017).** Prevalence and characteristics of Epstein–Barr virus-associated gastric carcinomas in Portugal. *Infectious agents and cancer*, 12, 1-8.
- **Obtel, M., Nejari, C., Zidouh, A., Belakhel, L., Bendahhou, K., El Menzhi, O., ... & Bekkali, R.**

- (2014). Epidemiologic Profile of the Stomach Cancers in Morocco. *OpenAccess Library J*, 1, 1-7.
- **Oleynikova, N. A., Danilova, N. V., Grimuta, M. O., & Malkov, P. G. (2021).** Epstein–Barr Virus in the Development of Colorectal Cancer. *Современныетехнологии в медицине*, 13(4 (eng)), 82-91.
 - **Odumade, O. A., Hogquist, K. A., & Balfour Jr, H. H. (2011).** Progress and problems in understanding and managing primary Epstein-Barr virus infections. *Clinical microbiology reviews*, 24(1), 193-209.
 - **Orenay-Boyacioglu, S., Kasap, E., Gerceker, E., Yuceyar, H., Demirci, U., Bilgic, F., & Korkmaz, M. (2018).** Expression profiles of histone modification genes in gastric cancer progression. *Molecular biology reports*, 45(6), 2275-2282.
 - **Ouhoumane, N. (2013).** Les infections au virus du papillome humain (HPV) et le portrait des cancers associés à ces infections au Québec. *desLibris*.
 - **Palrasu, M., Zaika, E., El-Rifai, W., Que, J., & Zaika, A. I. (2021).** Role of bacterial and viral pathogens in gastric carcinogenesis. *Cancers*, 13(8), 1878.
 - **Pańczyszyn, A., Boniewska-Bernacka, E., & Głąb, G. (2018).** Telomeres and telomerase during human papillomavirus-induced carcinogenesis. *Molecular diagnosis & therapy*, 22, 421-430.
 - **Park, J. C., Lee, Y. C., Kim, J. H., Kim, Y. J., Lee, S. K., Hyung, W. J., ... & Kim, C. B. (2009).** Clinicopathological aspects and prognostic value with respect to age: an analysis of 3,362 consecutive gastric cancer patients. *Journal of surgical oncology*, 99(7), 395-401.
 - **Pasupathi, P., & Pichandi, S. (2011).** Chronic tobacco smoking and gastric cancer: a review. *Int J Cur Biomed Phar Res.*, 1(2), 48-66.
 - **Patel, T. N., Roy, S., & Ravi, R. (2017).** Gastric cancer and related epigenetic alterations. *Ecancermedicalscience*, 11.
 - **Peng, N., & Zhao, X. (2014).** Comparison of K-ras mutations in lung, colorectal and gastric cancer. *Oncology letters*, 8(2), 561-565.
 - **Perkins, G., Lièvre, A., Ramacci, C., Méatchi, T., de Reynies, A., Emile, J. F., ... & Laurent-Puig, P. (2010).** Additional value of EGFR downstream signaling phosphoprotein expression to KRAS status for response to anti-EGFR antibodies in colorectal cancer. *International journal of cancer*, 127(6), 1321-1331.
 - **Petca, A., Borislavski, A., Zvanca, M. E., Petca, R. C., Sandru, F., & Dumitrascu, M. C. (2020).** Non-sexual HPV transmission and role of vaccination for a better future. *Experimental and therapeutic medicine*, 20(6), 1-1.
 - **Pinidis, P., Tsikouras, P., Iatrakis, G., Zervoudis, S., Koukouli, Z., Bothou, A., ... & Vladareanu, S. (2016).** Human papilloma virus' life cycle and carcinogenesis. *Maedica*, 11(1), 48.

- **Polat, E., Duman, U., Duman, M., Peker, K. D., Akyuz, C., Yasar, N. F., ... & Yol, S. (2014).** Preoperative serum tumor marker levels in gastric cancer. *Pakistan Journal of Medical Sciences*, 30(1), 145.
- **Polz-Gruszka, D., Morshed, K., Stec, A., & Polz-Dacewicz, M. (2015).** Prevalence of Human papillomavirus (HPV) and Epstein-Barr virus (EBV) in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma in south-eastern Poland. *Infectious agents and cancer*, 10(1), 1-7.
- **Ponnala, D., S, Madireddi, K. CS. (2019).** The role of K-Ras Gene Mutation in Stomach Cancer in Southern India. *Archives of Biochemistry and Molecular Biology*, 1, 032-037.
- **Poorolajal, J., Moradi, L., Mohammadi, Y., Cheraghi, Z., & Gohari-Ensaf, F. (2020).** Risk factors for stomach cancer: a systematic review and meta-analysis. *Epidemiology and health*, 42.
- **Prétet, J. L., Charlot, J. F., & Mougin, C. (2007).** Aspects virologiques et carcinologiques des papillomavirus humains HPV. *Bulletin de l'Académie nationale de médecine*, 191(3), 611-623.
- **Pyo, J. S., Kim, N. Y., & Kang, D. W. (2020).** Clinicopathological significance of EBV-infected gastric carcinomas : a meta-analysis. *Medicina*, 56(7), 345.
- **Qiao, Y. W., Zhao, X. Q., Liu, J., & Yang, W. J. (2019).** Clinicopathological features of Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma : A systematic review and meta-analysis. *J. BUON*, 24(3), 1092-1099.
- **Queirós, P., Pinheiro, H., Carvalho, J., Oliveira, P., Gullo, I., Carneiro, F., ... & Oliveira, C. (2015).** KRAS mutations in microsatellite instable gastric tumours: impact of targeted treatment and intratumoural heterogeneity. *Virchows Archiv*, 467,383-392.
- **Ramazani, Y., Mardani, E., Najafi, F., Moradinazar, M., & Amini, M. (2021).** Epidemiology of gastric cancer in North Africa and the Middle East from 1990 to 2017. *Journal of Gastrointestinal Cancer*, 52, 1046-1053.
- **Randén-Brady, R., Carpén, T., Jouhi, L., Syrjänen, S., Haglund, C., Tarkkanen, J., ... & Hagström, J. (2019).** In situ hybridization for high-risk HPV E6/E7 mRNA is a superior method for detecting transcriptionally active HPV in oropharyngeal cancer. *Human Pathology*, 90, 97-105.
- **Rawla, P., & Barsouk, A. (2019).** Epidemiology of gastric cancer : global trends, risk factors and prevention. *Gastroenterology Review/Przegląd Gastroenterologiczny*, 14(1), 26-38.
- **Renzulli, M., Clemente, A., Spinelli, D., Ierardi, A. M., Marasco, G., Farina, D., ... & Golfieri, R. (2020).** Gastric cancer staging: is it time for magnetic resonance imaging?. *Cancers*, 12(6), 1402.
- **Ribeiro, J., Oliveira, C., Malta, M., & Sousa, H. (2017).** Epstein–Barr virus gene expression and latency pattern in gastric carcinomas: a systematic review. *Future Oncology*, 13(6), 567-579.

- **Rihane, F. E., Erguibi, D., Elyamine, O., Abumsimir, B., Ennaji, M. M., & Chehab, F. (2021).** Helicobacter pylori co-infection with Epstein-Barr virus and the risk of developing gastric adenocarcinoma at an early age: Observational study infectious agents and cancer. *Annals of Medicine and Surgery*, 68, 102651.
- **Rivaller, P., Cho, Y. G., & Wang, F. (2002).** Complete genomic sequence of an Epstein-Barr virus-related herpesvirus naturally infecting a new world primate: a defining point in the evolution of oncogenic lymphocryptoviruses. *Journal of virology*, 76(23), 12055-12068.
- **Roizman, B. (1982).** The family herpesviridae: general description, taxonomy, and classification. *The herpesviruses*, 1-23.
- **Rona, K. A., Schwameis, K., Zehetner, J., Samakar, K., Green, K., Samaan, J., ... & Lipham, J. C. (2017).** Gastric cancer in the young : An advanced disease with poor prognostic features. *Journal of surgical oncology*, 115(4), 371-375.
- **Roncin, L., Touzalin, A., & Fleury, H. J. (2009).** Papillomavirus humains et tumeurs des voies aérodigestives supérieures. *Lettre Infectiol*, 24, 19-27.
- **Saegusa, M., Hashimura, M., Takano, Y., Ohbu, M., & Okayasu, I. (1997).** Absence of human papillomavirus genomic sequences detected by the polymerase chain reaction in oesophageal and gastric carcinomas in Japan. *Molecular Pathology*, 50(2), 101.
- **Saito, M., & Kono, K. (2021).** Landscape of EBV-positive gastric cancer. *Gastric Cancer*, 24(5), 983-989.
- **Santoro, R., Carboni, F., Lepiane, P., Ettore, G. M., & Santoro, E. (2007).** Clinicopathological features and prognosis of gastric cancer in young European adults. *Journal of British Surgery*, 94(6), 737-742.
- **Sarhadi, V. K., & Armengol, G. (2022).** Molecular biomarkers in cancer. *Biomolecules*, 12(8), 1021.
- **Saxena, A., Nath Prasad, K., Chand Ghoshal, U., Krishnani, N., Roshan Bhagat, M., & Husain, N. (2008).** Association of Helicobacter pylori and Epstein-Barr virus with gastric cancer and peptic ulcer disease. *Scandinavian journal of gastroenterology*, 43(6), 669-674.
- **Segondy, M. (2008).** Classification des papillomavirus (HPV). *Revue francophone des laboratoires*, 2008(405), 23-25.
- **Sempionatto, J. R., Lasalde-Ramírez, J. A., Mahato, K., Wang, J., & Gao, W. (2022).** Wearable chemical sensors for biomarker discovery in the omics era. *Nature Reviews Chemistry*, 1-17.
- **Senapati, R., Senapati, N. N., & Dwibedi, B. (2016).** Molecular mechanisms of HPV mediated neoplastic progression. *Infectious Agents and Cancer*, 11, 1-11.

- **Shah, D., & Bentrem, D. (2022).** Environmental and genetic risk factors for gastric cancer. *Journal of surgical oncology*, 125(7), 1096-1103.
- **Shah, K. M., & Young, L. S. (2009).** Epstein–Barr virus and carcinogenesis: beyond Burkitt's lymphoma. *Clinical microbiology and infection*, 15(11), 982-988.
- **Shen, J., Luo, M., Liu, L., Chen, Q. Y., Tang, L. Q., & Mai, H. Q. (2021).** Incidence and trend of Epstein-Barr virus-related cancer: A surveillance, epidemiology, and end results program based study.
- **Shi, J., Qu, Y. P., & Hou, P. (2014).** Pathogenetic mechanisms in gastric cancer. *World journal of gastroenterology: WJG*, 20(38), 13804.
- **Shi, Y., Peng, S. L., Yang, L. F., Chen, X., Tao, Y. G., & Cao, Y. (2016).** Co-infection of Epstein-Barr virus and human papillomavirus in human tumorigenesis. *Chinese journal of cancer*, 35, 1-9.
- **Shimozaki, K., Shinozaki, E., Yamamoto, N., Imamura, Y., Osumi, H., Nakayama, I., ... & Yamaguchi, K. (2023).** KRAS mutation as a predictor of insufficient trastuzumab efficacy and poor prognosis in HER2-positive advanced gastric cancer. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 149(3), 1273-1283.
- **Shinozaki, A., Sakatani, T., Ushiku, T., Hino, R., Isogai, M., Ishikawa, S., ... & Fukayama, M. (2010).** Downregulation of MicroRNA-200 in EBV-Associated Gastric Carcinoma Downregulation of miR-200 in EBV-Associated Gastric Carcinoma. *Cancer Research*, 70(11), 4719-4727.
- **Shinozaki-Ushiku, A., Kunita, A., & Fukayama, M. (2015).** Update on Epstein-Barr virus and gastric cancer. *International journal of oncology*, 46(4), 1421-1434.
- **Shuto, T., Nishikawa, J., Shimokuri, K., Yanagi, A., Takagi, T., Takagi, F., ... & Sakaida, I. (2019).** Establishment of a screening method for Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma by droplet digital PCR. *Microorganisms*, 7(12), 628.
- **Singh, J., Kumar, P., Verma, K., Tiwary, S. K., Narayan, G., & Dixit, V. K. (2021).** Molecular genetic changes in gastric carcinoma. *International Journal of Molecular and Immuno Oncology*, 6(1), 30-46.
- **Smatti, M. K., Al-Sadeq, D. W., Ali, N. H., Pintus, G., Abou-Saleh, H., & Nasrallah, G. K. (2018).** Epstein–Barr virus epidemiology, serology, and genetic variability of LMP-1 oncogene among healthy population : an update. *Frontiers in oncology*, 8, 211.
- **Smola, S. (2017).** Immunopathogenesis of HPV-associated cancers and prospects for immunotherapy. *Viruses*, 9(9), 254.
- **Snietura, M., Waniczek, D., Piglowski, W., Kopec, A., Nowakowska-Zajdel, E., Lorenc, Z., & Muc-Wiergon, M. (2014).** Potential role of human papilloma virus in the pathogenesis of gastric cancer. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 20(21), 6632.

- **Stanland, L. J., & Luftig, M. A. (2020).** The role of EBV-induced hypermethylation in gastric cancer tumorigenesis. *Viruses*, 12(11), 1222.
- **Sun, K., Jia, K., Lv, H., Wang, S. Q., Wu, Y., Lei, H., & Chen, X. (2020).** EBV- positive gastric cancer: current knowledge and future perspectives. *Frontiers in oncology*, 10, 583463.
- **Szymonowicz, K. A. et Chen, J. (2020).** Aspects biologiques et cliniques des cancers liés au VPH. *Cancer biology & medicine*, 17(4), 864.
- **Takatsu, Y., Hiki, N., Nunobe, S., Ohashi, M., Honda, M., Yamaguchi, T., ... & Sano, T. (2016).** Clinicopathological features of gastric cancer in young patients. *Gastric Cancer*, 19, 472-478.
- **Tan, C., & Du, X. (2012).** KRAS mutation testing in metastatic colorectal cancer. *World journal of gastroenterology : WJG*, 18(37), 5171.
- **Tan, P., & Yeoh, K. G. (2015).** Genetics and molecular pathogenesis of gastric adenocarcinoma. *Gastroenterology*, 149(5), 1153-1162.
- **Tarupi, W., de Vries, E., Cueva, P., & Yépez, J. (2019).** Stagnation in decreasing gastric cancer incidence and mortality in Quito: time trend analysis, 1985–2013. *Journal of cancer epidemiology*, 2019.
- **Tavakoli, A., Monavari, S. H., Solaymani Mohammadi, F., Kiani, S. J., Armat, S., & Farahmand, M. (2020).** Association between Epstein-Barr virus infection and gastric cancer : a systematic review and meta-analysis. *BMC cancer*, 20(1), 1-14.
- **Tekesin, K., Gunes, M. E., Tural, D., Akar, E., Zirtiloglu, A., Karaca, M., ... & Ozet, A. (2019).** Clinicopathological characteristics, prognosis and survival outcome of gastric cancer in young patients: A large cohort retrospective study. *future*, 1(3).
- **Thrift, A. P., & El-Serag, H. B. (2020).** Burden of gastric cancer. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 18(3), 534-542.
- **Timar, J., & Kashofer, K. (2020).** Molecular epidemiology and diagnostics of KRAS mutations in human cancer. *Cancer and Metastasis Reviews*, 39, 1029-1038.
- **Toda, K., Nagasaka, T., Umeda, Y., Tanaka, T., Kawai, T., Fuji, T., ... & Fujiwara, T. (2015).** Genetic and epigenetic alterations of netrin-1 receptors in gastric cancer with chromosomal instability. *Clinical Epigenetics*, 7(1), 1-18.
- **Toh, J. W., & Wilson, R. B. (2020).** Pathways of gastric carcinogenesis, *Helicobacter pylori* virulence and interactions with antioxidant systems, vitamin C and phytochemicals. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(17), 6451.
- **Tommasino, M. (2014).** The human papillomavirus family and its role in carcinogenesis. In *Seminars in cancer biology*, 26, 13-21.

- **Tonoyan, L., Chevalier, M., Vincent-Bugnas, S., Marsault, R., & Doglio, A. (2020).** Detection of Epstein–Barr virus in periodontitis : a review of methodological approaches. *Microorganisms*, 9(1), 72.
- **Torre, L. A., Siegel, R. L., Ward, E. M., & Jemal, A. (2016).** Global Cancer Incidence and Mortality Rates and Trends—An Update. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention*, 25(1), 16-27.
- **Trimeche, M., Ksiâa, F., Ziadi, S., Mestiri, S., Hachana, M., Gacem, R. B., ... & Korbi, S. (2009).** Prevalence and characteristics of Epstein–Barr virus-associated gastric carcinomas in Tunisia. *European journal of gastroenterology & hepatology*, 21(9), 1001-1007.
- **Tsang, C. M., Deng, W., Yip, Y. L., Zeng, M. S., Lo, K. W., & Tsao, S. W. (2014).** Epstein-Barr virus infection and persistence in nasopharyngeal epithelial cells. *Chinese journal of cancer*, 33(11), 549.
- **Usui, G., Matsusaka, K., Mano, Y., Urabe, M., Funata, S., Fukayama, M., ... & Kaneda, A. (2021).** DNA methylation and genetic aberrations in gastric cancer. *Digestion*, 102(1), 25-32.
- **Valentini, A. M., Di Pinto, F., Coletta, S., Guerra, V., Armentano, R., & Caruso, M. L. (2019).** Tumor microenvironment immune types in gastric cancer are associated with mismatch repair however, not HER2 status. *Oncology Letters*, 18(2), 1775-1785.
- **Van der Post, R. S., Oliveira, C., Guilford, P., & Carneiro, F. (2019).** Hereditary gastric cancer : What's new? Update 2013–2018. *Familial cancer*, 18, 363-367.
- **Van Doorslaer, K. (2013).** Evolution of the papillomaviridae. *Virology*, 445(1-2), 11-20.
- **Van Grieken, N. C. T., Aoyama, T., Chambers, P. A., Bottomley, D., Ward, L. C., Inam, I., ... & Grabsch, H. I. (2013).** KRAS and BRAF mutations are rare and related to DNA mismatch repair deficiency in gastric cancer from the East and the West: results from a large international multicentre study. *British journal of cancer*, 108(7), 1495- 1501.
- **Venceslau, E. M., Bezerra, M. M., Lopes, A. C. M., Souza, É. V., Onofre, A. S. C., Melo, C. M. D., ... & Onofre, F. B. D. M. (2014).** HPV detection using primers MY09/MY11 and GP5+/GP6+ in patients with cytologic and/or colposcopic changes. *Jornal brasileiro de patologia e medicina laboratorial*, 50, 280-285.
- **Wang, H., Chen, X. L., Liu, K., Bai, D., Zhang, W. H., Chen, X. Z., & Hu, J. K. (2020).** Associations between gastric cancer risk and virus infection other than Epstein-Barr virus: a systematic review and meta-analysis based on epidemiological studies. *Clinical and translational gastroenterology*, 11(7).
- **Wang, H., Shen, L., Li, Y., & Lv, J. (2020).** Integrated characterisation of cancer genes identifies key molecular biomarkers in stomach adenocarcinoma. *Journal of clinical pathology*, 73(9), 579-586.
- **Wang, K., Yuen, S. T., Xu, J., Lee, S. P., Yan, H. H., Shi, S. T., ... & Leung, S. Y. (2014).** Whole-

genome sequencing and comprehensive molecular profiling identify new driver mutations in gastric cancer. *Nature genetics*, 46(6), 573-582.

- **Wang, L., Xiao, S., Zheng, Y., & Gao, Z. (2023).** CircRNA circSLIT2 is a novel diagnostic and prognostic biomarker for gastric cancer. *Wiener klinische Wochenschrift*, 1-6.
- **Wang, Q., Liu, G., & Hu, C. (2019).** Molecular classification of gastric adenocarcinoma. *Gastroenterology Research*, 12(6), 275-282.
- **Wang, R., Liu, K., & Chen, X. Z. (2019).** Associations between gastric cancer risk and virus infection other than Epstein-Barr virus: The protocol of a systematic review and meta-analysis based on epidemiological studies. *Medicine*, 98(32).
- **Wanvimonsuk, S., Thitiwanichpiwong, P., Keelawat, S., Mutirangura, A., Kitkumthorn, N. (2019).** Distribution of the Epstein-Barr virus in the normal stomach and gastric lesions in Thai population. *Journal of Medical Virology*, 91(3), 444–449. DOI 10.1002/jmv.25318.
- **Weadick, C., McLaughlin, R. A., Ramsey, M., Al-Julandani, N., Power, D. G., Bennett, M. W., ... & Duffy, A. G. (2021).** The incidence of Epstein-Barr Virus- associated gastric cancer in an Irish population.
- **Wei, J., Huang, Y., Wu, N., Yu, L., & Liu, B. (2016).** KRAS mutation and protein levels in gastric cancer patients and response to MEK inhibitors. *Annals of Oncology*, 27, vi214.
- **Weiss, L. M., & Chen, Y. Y. (2013).** EBER in situ hybridization for Epstein–Barr virus. *Hematological Malignancies*, 223-230.
- **Won, Y., & Choi, E. (2022).** Mouse models of Kras activation in gastric cancer. *Experimental & Molecular Medicine*, 1-6.
- **Wong, M. C., Huang, J., Chan, P. S., Choi, P., Lao, X. Q., Chan, S. M., ... & Liang, P. (2021).** Global incidence and mortality of gastric cancer, 1980-2018. *JAMA network open*, 4(7), e2118457-e2118457.
- **Wu, H. H., Lin, W. C., & Tsai, K. W. (2014).** Advances in molecular biomarkers for gastric cancer : miRNAs as emerging novel cancer markers. *Expert reviews in molecular medicine*, 16, e1.
- **Yanagi, A., Nishikawa, J., Shimokuri, K., Shuto, T., Takagi, T., Takagi, F., ... & Sakaida, I. (2019).** Clinicopathologic Characteristics of Epstein–Barr Virus-Associated Gastric Cancer Over the Past Decade in Japan. *Microorganisms*, 7(9), 305.
- **Yang, J., Liu, Z., Zeng, B., Hu, G., & Gan, R. (2020).** Epstein–Barr virus-associated gastric cancer: A distinct subtype. *Cancer letters*, 495, 191-199.
- **Yang, L., Ying, X., Liu, S., Lyu, G., Xu, Z., Zhang, X., ... & Ji, J. (2020).** Gastric cancer:

Epidemiology, risk factors and prevention strategies. *Chinese Journal of Cancer Research*, 32(6), 695.

- **Yang, Q., Huo, S., Sui, Y., Du, Z., Zhao, H., Liu, Y., ... & Zhang, G. (2018).** Mutation status and immunohistochemical correlation of KRAS, NRAS, and BRAF in 260 Chinese colorectal and gastric cancers. *Frontiers in oncology*, 8, 487.
- **Yashiro, M., Nishioka, N., & Hirakawa, K. (2005).** K-ras mutation influences macroscopic features of gastric carcinoma. *Journal of Surgical Research*, 124(1), 74-78.
- **Yau, T. O., Tang, C. M., & Yu, J. (2014).** Epigenetic dysregulation in Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma: disease and treatments. *World journal of gastroenterology*, 20(21), 6448-6456.
- **Ye, D. M., Xu, G., Ma, W., Li, Y., Luo, W., Xiao, Y., ... & Zhang, Z. (2020).** Significant function and research progress of biomarkers in gastric cancer. *Oncology letters*, 19(1), 17-29.
- **Yoda, Y., Takeshima, H., Niwa, T., Kim, J. G., Ando, T., Kushima, R., ... & Ushijima, T. (2015).** Integrated analysis of cancer-related pathways affected by genetic and epigenetic alterations in gastric cancer. *Gastric Cancer*, 18, 65-76.
- **Yu, J., & Zheng, W. (2018).** An alternative method for screening gastric cancer based on serum levels of CEA, CA19-9, and CA72-4. *Journal of Gastrointestinal Cancer*, 49, 57-62.
- **Yuan, X. Y., Wang, M. Y., Wang, X. Y., Chang, A. Y., & Li, J. (2013).** Non-detection of Epstein-Barr virus and Human Papillomavirus in a region of high gastric cancer risk indicates a lack of a role for these viruses in gastric carcinomas. *Genetics and molecular biology*, 36, 183-184.
- **Yusefi, A. R., Lankarani, K. B., Bastani, P., Radinmanesh, M., & Kavosi, Z. (2018).** Risk factors for gastric cancer: a systematic review. *Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP*, 19(3), 591.
- **Zanella, L., Riquelme, I., Buchegger, K., Abanto, M., Ili, C., & Brebi, P. (2019).** A reliable Epstein-Barr Virus classification based on phylogenomic and population analyses. *Scientific reports*, 9(1), 1-11.
- **Zeng, Z. M., Luo, F. F., Zou, L. X., He, R. Q., Pan, D. H., Chen, X., ... & Chen, G. (2016).** Human papillomavirus as a potential risk factor for gastric cancer: a meta-analysis of 1,917 cases. *OncoTargets and therapy*, 7105-7114.
- **Zhang, B., Yao, K., Xu, M., Wu, J., & Cheng, C. (2021).** Deep learning predicts EBV status in gastric cancer based on spatial patterns of lymphocyte infiltration. *Cancers*, 13(23), 6002.
- **Zhang, Z., Wu, H., Chong, W., Shang, L., Jing, C., & Li, L. (2022).** Liquid biopsy in gastric cancer: predictive and prognostic biomarkers. *Cell Death & Disease*, 13(10), 903.
- **Zuo, L. L., Zhu, M. J., Du, S. J., Lu, J. H., & Li, G. Y. (2014).** The entry of Epstein-Barr virus into B lymphocytes and epithelial cells during infection. *Bing du xue bao= Chinese Journal of Virology*, 30(4),

476-482.

- **Zygulska, A. L., & Pierchalski, P. (2022).** Novel diagnostic biomarkers in colorectal cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(2), 852.