

UNIVERSITE DE LAUSANNE  
FACULTE DE BIOLOGIE ET DE MEDECINE  
INSTITUT UNIVERSITAIRE DE PATHOLOGIE

Directeur : Professeur Fred T. Bosman

**Expression des récepteurs aux facteurs de croissance (autres que KIT et PDGFRA) dans les tumeurs stromales gastro-intestinales**

**Etude anatomo-clinique et immunohistochimique de 80 cas**

**THESE**

**préparée sous la direction  
du Professeur Louis Guillou**

**et présentée à la Faculté de Biologie et de Médecine de l'Université de Lausanne  
pour l'obtention du grade de**

**DOCTEUR EN MEDECINE**

par

**Patrick ROUHANI**

Médecin diplômé de la Confédération Suisse

Originaire de Lausanne (Vaud)

Lausanne 2007

VI  
149  
Rou

BMTc 3439

## Résumé

Les tumeurs stromales gastro-intestinales (GISTs) sont des tumeurs de malignité variable du tractus gastro-intestinal d'évolution difficilement prévisible. Plus de 95% d'entre elles expriment les récepteurs KIT (90%) ou PDGFRA (5%), deux récepteurs aux facteurs de croissance à activité tyrosine-kinase. Peu de données existent quant à l'expression éventuelles d'autres récepteurs aux facteurs de croissance dans les GISTs.

### Buts de l'étude:

Les buts de cette étude étaient double: 1 - évaluer l'expression de plusieurs récepteurs aux facteurs de croissance, à l'exclusion de KIT et PDGFRA, au sein d'un collectif de GISTs; 2 - voir s'il existait une corrélation entre l'expression d'un ou plusieurs de ces récepteurs, les données anatomo-pathologiques et/ou l'évolution clinique

### Matériel et méthodes

80 GISTs ont été examinées sur le plan clinique, anatomo-pathologique, immunohistochimique et évolutif. L'immunoexpression des récepteurs aux facteurs de croissance suivants a été examinée: IGF-1r – *insulin-like growth factor-1 receptor*, FGFR – *fibroblast growth factor receptor*, C-MET – *hepatocyte growth factor receptor*, TGFβr (type 1) – *transforming growth factor beta receptor, type 1*, CD105/endogline, RET et NGFR/gp75 (*nerve growth factor receptor*).

### Résultats

52.7% des GISTs exprimaient C-MET, 50% CD105/endogline, 36.7% RET, 25% NGFR/gp75, 17.5% TGFβr, 7.5% FGFR, et 0% IGF-1r. La présence ou non d'une expression de CD105 et son intensité étaient significativement associées à une évolution défavorable, tant pour les patients présentant une maladie localisée au diagnostic que pour ceux qui étaient métastatiques au diagnostic. L'expression de C-MET était aussi corrélée, mais de façon moins significative, à une évolution défavorable. En analyse multivariée, l'expression de CD105 est un facteur pronostique indépendant défavorable.

### Conclusion

Les GISTs expriment de façon variable des récepteurs aux facteurs de croissance autres que KIT et PDGFRA. Les récepteurs au TGFβ, au FGF et à l'IGF sont peu exprimés. L'endogline/CD105 et le récepteur C-MET sont plus fréquemment exprimés et leur expression est associée à une évolution clinique défavorable.

## **Remerciements**

J'exprime toute ma reconnaissance au Professeur Louis Guillou qui m'a soutenu durant toute la réalisation de cette thèse.

J'adresse également mes remerciements au laboratoire pour la confection des coupes et aux techniciennes d'immunohistochimie pour m'avoir initié à leur travail.

Ma gratitude va également aux médecins traitants et leurs secrétaires qui m'ont permis d'obtenir les suivis cliniques des patients.

Finalement, je tiens à remercier Christelle, mon épouse, pour sa compréhension lors de mes nombreuses absences et son aide notamment pour la dactylographie et Alexis, mon fils, toujours de bonne humeur et source d'énergie pour terminer cette thèse.

**Table des matières**

Introduction.....	5
Patients , matériel et méthodes.....	15
Sélection des patients.....	15
Matériel et méthodes.....	16
Analyses statistiques.....	18
Résultats.....	20
Données cliniques.....	20
Données anatomo-pathologiques.....	20
Evolution des patients et analyses statistiques.....	23
Discussion.....	27
Conclusion.....	31
Tableaux 1 à 5.....	33
Figures 1 à 19.....	39
Bibliographie.....	51
Liste des abréviations.....	62

## Introduction

Les tumeurs stromales gastro-intestinales (GISTs) sont les tumeurs mésenchymateuses les plus courantes du tube digestif (80%). On les observe le plus fréquemment dans l'estomac mais elles peuvent aussi se développer dans l'intestin grêle, le côlon, le rectum et plus rarement en localisation extra-digestive (péritoine, mésentère, rétropéritoine) [1-6]. Sur le plan immunohistochimique, les GISTs expriment généralement les marqueurs CD34 (60-70%), h-caldesme (60-75%), le marqueur DOG1 (*discovered on GIST-1*) (100%) et la protéine kinase C théta (PKC $\theta$ ) (80-90%). Ces marqueurs sont utiles pour l'identification des GISTs. A l'inverse, les GISTs sont généralement négatives pour les marqueurs comme la protéine S100, la desmine et les kératines [6].

La plupart des GISTs quelque soit leur caractéristique expriment la protéine KIT, produit du gène C-KIT qui se trouve sur le bras long du chromosome 4 (4q11-121) [5-6]. La protéine KIT est un récepteur tyrosine kinase transmembranaire qui interagit avec un ligand spécifique qui est le facteur de croissance des mastocytes/des cellules souches (SCF - *stem cell factor*). Ce récepteur tyrosine kinase KIT présente d'importantes homologies structurales avec d'autres récepteurs tyrosine kinase comme les récepteurs du *macrophage colony stimulating factor 1* (M-CSF1r), du *platelet derived growth factor* (PDGFr) et du *FMS-like tyrosine kinase 3* (FLT3) (Fig. 1). La liaison de KIT avec son ligand entraîne une homodimérisation, une initiation de l'activité tyrosine kinase et une phosphorylation des substrats situés en aval dans la cascade de signalisation intra-cellulaire : AKT, PI3K, PLC $\gamma$ , STAT1, STAT3, MAPK p42/44, S6K, membres de la famille des kinases Sarc, etc.. responsables à terme d'une activité anti-proliférative et anti-apoptotique [3-6] (Fig. 2). Grâce à l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques, il a été démontré que la voie PI3K/mTOR

était un intermédiaire essentiel dans la transmission du signal oncogénique du récepteur KIT au reste de la cascade de signalisation intracellulaire [5].

La plupart des GISTs ont une ou plusieurs mutations avec gain de fonction dans le proto-oncogène C-KIT, les mutations dans les exons 11 et 9 étant les plus fréquemment rencontrées (Fig. 3). Des mutations dans les exons 13 et 17 existent également. [5-7]. Ces mutations activatrices peuvent être divisées en deux types ; mutations de type « régulatrice » (exons 11 et 9), qui affectent la fonction de la kinase et mutations de type « poche enzymatique » (exons 13 et 17) qui altèrent la séquence d'acides aminés formant le site enzymatique [5, 8].

Les études récentes ont montré que tous les GISTs indépendamment de leur agressivité et de leur taille ont une ou des mutations activatrices dans le gène KIT [5-9]. Ainsi, l'activation de KIT constitue une étape importante dans la pathogénèse des GISTs et le produit du gène KIT devient ainsi une cible thérapeutique universelle et privilégiée [5-9]. Le fait d'observer des mutations activatrices de KIT dans des GIST de très petite taille (< 1cm) montre qu'il s'agit d'un phénomène précoce dans la pathogénèse de ces tumeurs. Néanmoins, la présence seule de certaines mutations activatrices n'est pas suffisante pour développer une tumeur. Ainsi, les patients porteurs de GISTs familiales qui se caractérisent par la présence de mutations activatrices germinales de KIT ne développent des tumeurs qu'au moment de l'adolescence. Ceci laisse à penser que d'autres mutations dans KIT ou dans d'autres gènes ou bien d'autres anomalies chromosomiques sont nécessaires au développement et/ou à la progression de ces tumeurs. En accord avec cette théorie, la coexistence de plusieurs types de mutations de KIT a été observées dans certaines GISTs de stade avancé de même qu'un gain (surtout en 5p, 8q, 17q, et 20q) ou une perte (surtout

en 14q, et 22q mais aussi en 1p, 9p, et 11p) de certaines régions chromosomiques et des anomalies d'autres gènes comme PDGFRA, p14, p16, p63, p53, AKT1, NF2 etc.. [5-12].

Certains patients porteurs d'une neurofibromatose de type 1 (maladie de von Recklinghausen, NF1) ont une propension à développer des GISTs multiples tout le long du tube digestif et plus particulièrement dans l'intestin grêle. Ces tumeurs sont rarement (<10% des cas) porteuses de mutations de KIT ou PDGRA. A l'inverse, elles contiennent souvent des mutations du gène NF1 [5, 6,13-15].

Le STI-571 (imatinib mesylate - Glivec<sup>TM</sup>) qui s'est révélé être un inhibiteur spécifique et efficace de certains récepteurs tyrosine kinase (comme le produit du gène de fusion BCR-ABL dans la leucémie myéloïde chronique [5]) est de plus en plus utilisé dans le traitement des GISTs malignes multirécidivantes et/ou métastatiques [5,16,17] qui surexpriment la protéine KIT. De façon intéressante, la réponse antitumorale à cet agent est assez étroitement corrélée au type de mutation observé dans le gène KIT (70-80% de réponse si la mutation siège dans l'exon 11 du gène KIT, 30-50% si la mutation siège dans l'exon 9, 0-10% si les exons 13 ou 17 sont impliqués ou si il n'y a pas de mutation détectable.) [5,6,10,16,17]

Environ 5 à 7% des GISTs n'expriment pas la protéine KIT [5,7,18-20]. Récemment, il a été démontré que 35% [18] à 70% [19] des ces tumeurs KIT-négatives portent des mutations du gène codant pour le récepteur tyrosine kinase *platelet derived growth factor A* (PDGFRA) (Fig. 3). Fait intéressant, ces tumeurs ont la particularité de présenter souvent un morphotype épithélioïde et de se développer dans l'estomac, l'épiploon ou le péritoine [5,18-20]. Les mutations de KIT et de PDGFRA sont mutuellement exclusives [18,19].

Comme pour KIT, les mutations de PDGFRA sont activatrices et 40% d'entre elles sont sensibles au traitement par imatinib mésylate. Les mutations conférant une résistance au traitement par imatinib mésylate portent surtout sur le codon D842 de l'exon 18 de PDGFRA [5,18,19].

Après exclusion des GISTs qui expriment KIT ou PDGFRA, il reste environ 2% de tumeurs stromales digestives (ou extra-digestives) qui correspondent morphologiquement à des GISTs mais ne sont pas connues pour exprimer des récepteurs tyrosine kinase. Dans cette dernière catégorie lésionnelle se trouvent notamment les GISTs survenant dans le cadre de la triade de Carney [5,6,20,21] ; ce syndrome se définissant par la présence synchrone ou métachrone, chez un même patient, d'une GIST maligne (souvent de l'estomac), d'un hamartochondrome pulmonaire et d'un paragangliome extrasurrénalien. A ce jour, excepté KIT et PDGFRA, il n'y a que peu de littérature traitant de l'expression des récepteurs aux facteurs de croissance (dont certains à activité tyrosine kinase) dans les GISTs [22,23].

Le but de cette étude était de voir si, à côté de KIT et PDGFRA, d'autres facteurs de croissance, y compris ceux à activité tyrosine kinase, intervenaient dans le développement et l'évolution des GISTs, comme cela a été déjà démontré pour C-MET, HER/neu, FMS et PDGF dans les sarcomes de l'os et des tissus mous [24]. En effet, si l'existence de GISTs exprimant des récepteurs à activité tyrosine-kinase autres que KIT et PDGFRA se confirmait, les patients porteurs de ce dernier type de tumeur pourraient aussi être traités par des anti-tyrosine kinases (comme le STI571 – imatinib mesylate (Glivec™ ), ou d'autres anti-tyrosine kinases comme SU5416, SU6668, PTK787, SU11248 [16,25-27].

Parmi ces facteurs de croissance, seuls ceux dont l'expression était détectable par immunohistochimie sur des tissus préalablement fixés et inclus en paraffine ont été investigués, à savoir l'*insulin-like growth factor-1 receptor (sous-unité alpha)* (IGF-1r), le *fibroblast growth factor receptor* (FGFr), l'*hepatocyte growth factor receptor/C-MET* (HGFr/C-MET), le *nerve growth factor receptor* (NGFr), l'endogline/CD105, le *transforming growth factor beta receptor 1* (TGF $\beta$ r-type 1), et RET.

IGF-1R et IGF-2R (*Insulin growth factor receptor 1 et 2*) sont des protéines proches l'une de l'autre. IGF-1R est de structure similaire au récepteur à l'insuline avec 2 sous-unités  $\alpha$  et 2 sous-unités  $\beta$ . Les sous-unités  $\alpha$  lient le ligand tandis que les sous-unités  $\beta$  transmettent le signal induit par le ligand. Les sous-unités  $\beta$  contiennent trois domaines ; le domaine juxtamembranaire, le domaine tyrosine kinase et le domaine C-terminal. L'activation de IGF-1R induit son autophosphorylation et la phosphorylation d'autres substrats à l'origine d'une cascade de réactions intracellulaires ayant un impact sur le contrôle de la prolifération et de la survie cellulaire. IGF-2R est une protéine transmembranaire avec un petit domaine cytoplasmique qui n'a pas d'activité kinase propre mais exprime une activité mannose-6-phosphate récepteur. Les facteurs de croissance IGF1 et IGF2 sont des protéines qui peuvent être produites par des tissus normaux (notamment le foie) mais aussi par le stroma de certains cancers, ou par certaines cellules tumorales (ex. certaines tumeurs fibreuses solitaires de la plèvre sécrètent une substance à activité IGF à l'origine de crises d'hypoglycémie chez les patients concernés [28,29]). Les IGF et leurs récepteurs et régulateurs respectifs jouent aussi un rôle important dans la croissance de certains sarcomes comme le sarcome d'Ewing/PNET, l'ostéosarcome, le léiomyosarcome ou le rhabdomyosarcome [24,30-31].

L'endogline (CD105) fonctionne comme un composant accessoire du complexe *transforming growth factor-beta receptor* (TGF $\beta$ r). Elle est impliquée dans le développement et le remodelage des vaisseaux [32]. Il s'agit d'une glycoprotéine homodimérique membranaire de 180 kilodaltons, exprimée par les cellules endothéliales normales mais aussi surexprimée par les cellules endothéliales de certaines tumeurs. Dans les tumeurs solides, CD105 est pratiquement exclusivement exprimé dans les cellules endothéliales des vaisseaux péri et intra-tumoraux et/ou dans les cellules du stroma. Rarement, il peut être exprimé directement par les cellules tumorales (expression cytoplasmique). Ceci a notamment été observé dans les méningiomes et certains sarcomes des tissus mous comme les léiomyosarcomes, fibrosarcomes et angiosarcomes [32]. Cette expression peut être mise en évidence par immunohistochimie. L'immunomarquage est intense dans les tissus avec importante néoangiogénèse active alors qu'il est habituellement absent ou faible dans les vaisseaux des tissus normaux. L'intensité de l'immunomarquage par les anticorps anti-endogline est souvent proportionnelle à la quantité de microvaisseaux que contient la tumeur. Cette dernière propriété est été utilisée pour déterminer le niveau de néoangiogénèse intratumorale et sa valeur pronostique éventuelle. Ainsi, chez les patients porteurs d'un carcinome pulmonaire non-à-petites-cellules, d'un carcinome du sein, du col utérin, de l'endomètre ou de la prostate, une expression intense d'endogline semble être un indicateur de mauvais pronostic [33]. Le développement de substances anti-endogline (anticorps anti-CD105 couplés à une toxine ou à un produit radioactif) pourrait constituer une voie prometteuse dans le traitement de certains néoplasies (comme le cancer du sein) [33].

La famille du TGF $\beta$  consiste en 5 peptides (TGF $\beta$ 1 à 5) qui participent aux processus de croissance et de différenciation cellulaire, y compris la formation de la matrice extracellulaire, l'angiogenèse et le développement de la chimiotaxie des fibroblastes. In vitro, les TGF $\beta$  stimulent de façon prédominante la prolifération des cellules mésenchymateuses et inhibent la croissance des cellules épithéliales. In vivo, ils agissent surtout comme inhibiteurs de la croissance cellulaire [24]. Toutes les lignées cellulaires immunitaires ; lymphocytes B et T, cellules dendritiques et macrophages sécrètent du TGF $\beta$  qui régule négativement leur prolifération, différenciation et activation par d'autres cytokines. Il y a deux types de récepteurs TGF $\beta$ , les récepteurs 1 et 2 qui correspondent respectivement à des glycoprotéines trans-membranaires de 53 et 75 kd, avec une activité sérine-thréonine kinase. L'activation des récepteurs au TGF $\beta$  entraîne une cascade de signalisation intracellulaire qui fait intervenir, notamment, des effecteurs de la famille *Smad*. Ces derniers sont des régulateurs de la transcription de gènes impliqués dans le cycle cellulaire comme p21 [34]. Chez l'homme, il a été démontré qu'un dysfonctionnement de la cascade de signalisation induite par TGF $\beta$  intervenait dans la génèse du carcinome du pancréas, au travers notamment d'une inactivation de *Smad4* [35]. Les données concernant le rôle de TGF $\beta$  et de ses récepteurs dans la génèse et la croissance des tumeurs conjonctives demeurent encore très limitées.

C-MET est une protéine à activité tyrosine kinase, produit du gène MET situé sur le chromosome 7 (7q31), dont le ligand est le facteur de croissance des hépatocytes (*hepatocyte growth factor*, appelé aussi *scatter factor* - HGF/SF) [36]. C-MET est composé d'une chaîne  $\alpha$  qui se situe à la surface de la cellule et d'une chaîne  $\beta$  trans-membranaire. La chaîne  $\beta$  se caractérise par un site extracellulaire destiné au ligand HGF/SF, et une

activité kinase intracellulaire. Le ligand HGF/SF est produit surtout par des cellules mésenchymateuses comme les fibroblastes, les cellules musculaires lisses, mais aussi les cellules gliales, les macrophages et les lymphocytes T [37]. Au travers de son activation (par autophosphorylation), C-MET intervient dans la prolifération, la différenciation et la motilité cellulaire [38]. La dérégulation de C-MET dans les tumeurs peut être ligand-dépendante (exemple : production anormalement exagérée de HGF et du récepteur par la tumeur, réalisant une boucle autocrine) ou ligand-indépendante (exemple : surexpression de MET par la tumeur). Une surexpression de C-MET peut s'effectuer au travers de plusieurs mécanismes : amplification du gène, mutations activatrices (comme pour le gène KIT), création d'un gène de fusion avec transcription du gène chimérique (exemple : le gène chimérique TPR-MET dans certaines lignées d'ostéosarcome [37]) ou d'un défaut de régulateurs « négatifs ». La surexpression de C-MET peut aussi résulter d'une transactivation par d'autres récepteurs membranaires comme certaines intégrines, CD44, et EGF [37]. Une expression augmentée de C-MET a été observée dans de multiples cancers comme certains carcinomes de la thyroïde, du colon, du pancréas ou des ovaires, ainsi que dans certaines tumeurs conjonctives des os [37,39] et des tissus mous (ex. , rhabdomyosarcome, sarcome de Kaposi) [37,40,41]. L'activation de C-MET est souvent associée à des tumeurs de haut grade et de mauvais pronostic [42], notamment en ce qui concerne certains carcinomes de haut grade des glandes salivaires [43] et le lymphome B diffus à grandes cellules [44]. En 2003, une étude portant sur 115 sarcomes des tissus mous a montré une corrélation significative entre, d'une part, l'immunoexpression de C-MET et, d'une part, le grade de la tumeur (les tumeurs exprimant le plus C-MET étant de grade 3) et la densité en microvaisseaux intra-tumoraux, laissant supposer que la protéine MET pourrait avoir une fonction angiogénique [41].

La famille des « *Fibroblast Growth Factors* » (FGF) comporte 10 membres qui jouent un rôle important dans la croissance des cellules mesenchymateuses normales et tumorales et dans la stimulation de l'angiogenèse. Une caractéristique commune aux FGF est leur haute affinité pour l'héparane-sulfate et les protéoglycans héparane-sulfates. La famille des récepteurs au FGF qui comprend 5 membres (Fig. 1), se caractérise par une activité tyrosine kinase et peuvent partager plusieurs ligands. Les récepteurs au FGF (FGFr) partagent une même structure, comprenant un segment extracellulaire composé de 3 boucles avec ponts disulfures, un domaine similaire aux immunoglobulines, un seul domaine trans-membranaire, un domaine juxta-membranaire, 2 sites tyrosines kinase et une extrémité C-terminale avec un domaine d'autophosphorylation [24]. Plusieurs types d'altérations des récepteurs au FGF (ex. amplification du récepteur, épissage alternatif, etc..) à caractère oncogénique ont été décrites dans les leucémies myéloïdes aiguës, les lymphomes, et certains carcinomes gastriques, mammaires et de la prostate [45]. Ainsi une coexpression de FGF7 et de son récepteur était significativement associée à un mauvais pronostic dans l'adénocarcinome pulmonaire [46]. L'expression des FGF/FGFr a été peu explorée dans les tumeurs des tissus mous. En 1998, Tamiya et al. [47] ont examiné 17 tumeurs des tissus mous et ont mis en évidence, par hybridation in situ, une expression de FGF et de FGFr dans certains léiomyosarcomes et sarcomes synoviaux.

Le récepteur aux neurotrophines p75 (P75NTR) est un récepteur qui ne possède pas d'activité kinase et appartient à la famille des récepteurs au TNF (*tumor necrosis factor*). La liaison du NGF (*nerve growth factor*) à ses récepteurs NTRK1 (appelé aussi TRKA) et p75NTR active une cascade d'évènements intracellulaires avec, à terme, un impact sur la

régulation de la croissance, de la différenciation, de la survie et de la réparation du système nerveux [48,49]. Toutes les neurotrophines (et pas seulement NGF) lient le récepteur p75 avec faible affinité [49]. P75NTR transmet des signaux positifs et négatifs tandis que le récepteur TRK1 ne transmet que des signaux positifs favorisant la survie et la croissance cellulaire. Dans le cancer du sein, la neurotrophine NGF est un stimulateur important de la survie et de la croissance des cellules tumorales. NGF est produit directement par les cellules cancéreuses et son action est transmise via les récepteurs NTRK1 et p75NTR [50]. En 2001, Astolfi et al [51] ont montré que les rhabdomyosarcomes étaient capables de produire du NGF et de montrer une expression accrue des récepteurs au NGF, laissant supposer que l'utilisation d'anticorps anti-NGF pourrait rompre la boucle d'autostimulation. Une étude immunohistochimique récente portant sur 1150 tumeurs a montré que les dermatofibrosarcomes protubérants, les rhabdomyosarcomes embryonnaires et alvéolaires et les sarcomes synoviaux ainsi que certaines tumeurs nerveuses comme les tumeurs à cellules granuleuses, les schwannomes bénins et malins, les neurofibromes, et les ganglioneuromes exprimaient p75NTR [52], confortant les résultats d'une étude plus ancienne [53]. Dans l'étude de Fanburg-Smith et al. [52], les GISTs n'exprimaient pratiquement jamais p75NTR.

RET est un récepteur doué d'une activité tyrosine kinase, dont les neurotrophines constituent les ligands exclusifs. Le gène RET se situe sur le chromosome 10 (10q11.2). Les ligands appartiennent à la famille des facteurs neurotrophiques des lignées cellulaires gliales (glial-cell line derived neurotrophic factor - GDNF). Ces ligands comprennent le GDNF, la neurturine, l'artemine et la persefine [48,54]. Le récepteur RET comprend un domaine extracellulaire, un domaine trans-membranaire et un domaine tyrosine kinase.

RET intervient dans le développement des reins, du système digestif et dans la différenciation et la survie des neurones. Certains réarrangements chromosomiques et/ou mutations de RET sont à l'origine d'une dimérisation du récepteur avec activation concomitante de l'activité kinase. Le carcinome papillaire de la thyroïde constitue le prototype du cancer dans lequel on observe des réarrangements de RET, alors que des mutations somatiques activatrices de RET sont classiquement observées dans le carcinome médullaire de la thyroïde, et notamment dans les carcinomes médullaires familiaux ou ceux survenant dans le cadre des néoplasies endocriniennes multiples de type 2A et 2B (MEN 2A et MEN2B) [45,48]. Il n'existe pratiquement pas de données dans la littérature quant à l'expression de RET dans les tumeurs mésenchymateuses.

## **Patients, matériel et méthodes**

### **A Sélection des patients**

104 patients non consécutifs porteurs d'une GIST potentielle du tube digestif, du mésentère, de l'épiploon et/ou du rétropéritoine ont été identifiés à partir des filières de l'Institut Universitaire de Pathologie de Lausanne durant la période allant du 1<sup>er</sup> janvier 1977 au 31 décembre 2001. 24 patients (23%) ont été exclus de l'étude pour les raisons suivantes (Fig. 4.): 1 – la tumeur ne correspondait pas morphologiquement à une GIST (n=6), 2 – la tumeur ne correspondait pas à une tumeur primaire mais à une récurrence locale ou à une métastase à distance (foie, ganglions) (n=6), 3 – Le matériel à disposition était insuffisant (ex. biopsies sous CT scan) ou inadéquat (fixation inappropriée) pour effectuer l'étude immunohistochimique (n=12). A terme, 80 patients porteurs d'une GIST primaire ont été retenus pour l'étude. Les 24 patients éliminés présentaient des caractéristiques cliniques (age, taille, sexe, siège de la tumeur) similaires à ceux retenus dans l'étude.

Pour tous les patients retenus pour l'étude, les données cliniques suivantes ont été colligées à partir des dossiers médicaux et des médecins contactés : âge au moment du diagnostic, sexe, localisation de la tumeur, taille de la tumeur, modalités thérapeutiques, présence ou absence d'une dissémination intra-péritonéale et/ou de métastases à distance au moment du diagnostic, et suivi clinique.

Les patients qui présentaient des métastases à distance (foie, ganglions lymphatiques) ou une dissémination péritonéale de la maladie (sous la forme de un ou plusieurs nodules péritonéaux séparés de la tumeur primaire) au moment du diagnostic ont été considérés comme métastatiques d'emblée. La récurrence locale a été définie comme la réapparition d'une tumeur intra-abdominale après exérèse macroscopiquement complète de la tumeur initiale. Une maladie tumorale intra-abdominale réapparaissant après une exérèse initiale incomplète a été considérée comme une poursuite évolutive.

## B Matériel et méthodes

Pour chaque patient, les coupes histologiques colorées par l'hématoxyline-éosine représentatives de chaque tumeur primaire ont été revues par deux pathologistes (PR et LG). Entre 1 et 25 lames par cas (médiane: 8) étaient à disposition pour la revue histologique.

Pour les 80 tumeurs examinées, des coupes supplémentaires ont été confectionnées et étudiées avec les anticorps répertoriés dans le Tableau 1, dont 4 anticorps dirigés contre des récepteurs à activité tyrosine kinase (IGFr, FGFr, C-MET et RET), un anticorps dirigé contre un récepteur sérine-thréonine kinase (TGF $\beta$ r (type 1), un anticorps dirigé contre le CD105 (endogline), une glycoprotéine membranaire associée au récepteur du TGF $\beta$ , et un anticorps dirigé contre la protéine membranaire gp75 qui est un récepteur au NGF. Cette

dernière protéine, qui appartient à la famille des récepteurs au TNF (*tumor necrosis factor*), ne possède pas d'activité kinase propre.

L'immunomarquage pour CD34, CD117 (c-kit), actine musculaire lisse, desmine, protéine S100, chromogranine A, synaptophysine, émolase spécifique des neurones (NSE), et la PGP-9.5 (protein gene product - 9.5) a été effectué en utilisant la méthode ABC (avidine-biotine-complexe)-peroxydase de Hsu et al. [55]. Les coupes tissulaires ont fait l'objet d'un démasquage antigénique préalable par la chaleur (four micro-ondes) durant 15 minutes pour tous les anticorps testés à l'exception du CD117. Les vaisseaux, les nerfs, les mastocytes interstitiels et les cellules de Cajal de la paroi digestive adjacente à la tumeur ont été utilisés comme contrôles internes positifs. Les contrôles négatifs ont été effectués en remplaçant l'anticorps primaire spécifique par un antisérum non immun. Le chromogène utilisé a été la diaminobenzidine. Les lames ont été ensuite contre-colorées avec l'hématoxyline de Mayer, déshydratées dans des alcools de degrés croissants puis recouvertes de Tissue-Teck™ et d'une lamelle protectrice.

Les immunomarquages anti-récepteurs aux facteurs de croissance ont été effectués comme suit : les coupes tissulaires ont été montées sur des lames préalablement enrobées de 3-aminopropyltriethoxy-silane et séchées une nuit à température ambiante. Par la suite, elles ont été déparaffinées dans du xylène, bloquées pour la peroxydase endogène (en utilisant un mélange de peroxyde d'hydrogène 0,1% et de méthanol pendant 30 minutes) et réhydratées dans de l'éthanol de degrés décroissants (94°/70°/40°). Les antigènes (IGF-1r, FGFr, C-MET, NGFr/gp75, CD105, TGFβr-type 1, RET) ont été démasqués en chauffant les lames pendant 15 minutes au four à micro-ondes en présence d'EDTA (0,01 mmol/l,

pH 7.5). Pour éviter une réaction immunologique aspécifique, les coupes ont été au préalable incubées avec un sérum non immun de cheval (dilution 1/30). Par la suite, elles ont été incubées avec les anticorps primaires pendant 40 minutes, puis mises en présence de l'anticorps secondaire pendant 30 minutes à température ambiante (anticorps de cheval anti-souris dilué à 1/200 ; laboratoire Vector ; BA 2000), puis, finalement, incubées pendant 30 minutes avec le complexe ABC-peroxydase (laboratoire Vector ; ABC Vector PK-4000) préparé selon les recommandations du fabricant. La diaminobenzidine a été utilisée comme chromogène. Les lames ont été ensuite contre-colorées avec l'hématoxyline de Mayer, déshydratées dans des alcools de degrés croissants puis recouvertes de Tissue-Teck™ et d'une lamelle protectrice.

Pour les immunomarquages anti-récepteurs aux facteurs de croissance, les contrôles positifs externes ont consisté en des tissus appropriés connus pour réagir avec l'anticorps utilisé, en harmonie avec les recommandations des fabricants. Les contrôles négatifs ont été effectués en remplaçant l'anticorps primaire spécifique par du sérum dilué non-spécifique. Les cellules endothéliales ont servi de témoin interne lors des immunomarquages par l'anticorps anti-CD105. Pour chaque immunomarquage positif, les données concernant l'intensité (0: pas de réactivité, + : réactivité faible, ++ : réactivité modérée, +++ : réactivité forte) et l'étendue (marquage focal *versus* diffus) du marquage ont été colligées. Les figures 5A et 5B illustrent un exemple de marquage respectivement positif (Fig. 5A) et négatif (Fig. 5B) pour CD105. La figure 6 illustre un immunomarquage positif pour C-MET.

### C Analyses statistiques

Les variables suivantes ont été étudiées pour leur valeur pronostique potentielle (analyses univariées): la taille de la tumeur, sa localisation, l'index mitotique, la nécrose tumorale, la cellularité, le système de grade histologique consensuel de Fletcher et al. [1] (Tableau 2), et les immunomarquages pour le CD34, l'actine musculaire lisse, la desmine, la protéine S100, la protéine PGP 9.5, l'énolase spécifique des neurones (NSE), le CD56 (N-Cam), et tous les récepteurs aux facteurs de croissance investigués. Le degré d'association entre les variables a été évalué en utilisant le test du  $\chi^2$  de Pearson ou le test exact de Fisher, selon les besoins. La méthode de Kaplan-Meier [56] a été utilisée pour calculer la survie globale (*disease specific survival* des anglophones) et la survie sans récurrence de la maladie (*disease-free survival*). La date du diagnostic a été considérée comme la date de départ. Le temps de survie globale a été défini comme le temps écoulé entre la date du diagnostic et la date du décès, ce dernier devant être lié à la maladie. Le temps de survie sans maladie correspondait au temps écoulé entre la date du diagnostic et la date de survenue de la première rechute de la maladie, qu'elle soit locale ou à distance. Les courbes de survie ont été comparées en utilisant le test du log-rank. Une valeur de  $p \leq 5\%$  a été retenue comme statistiquement significative, avec un intervalle de confiance fixé à 95%. Les patients dont le décès n'était pas directement lié à la tumeur ont été censurés. Des études multivariées basées sur le modèle de Cox [57] ont été réalisées pour identifier les facteurs pronostiques les plus importants. L'entrée des variables dans le modèle s'est faite par étapes, les variables retenues étant celles qui avaient obtenu une valeur de  $p \leq 5\%$  en analyses univariées. Les résultats des études multivariées ont été donnés en terme de risque relatif, avec des intervalles de confiance fixés à 95%. Les études univariées et multivariées ont été réalisées en utilisant le logiciel JMP version 4.0.4 (JMP, SAS Institute Inc., Cary, NC).

## Résultats

### A Données cliniques

Les principales caractéristiques anatomo-cliniques concernant les patients et leurs tumeurs sont résumées dans le Tableau 3. Sept tumeurs (8.7%) étaient de siège extra-digestif, localisées dans le mésentère, le grand épiploon, et la racine du mésentère. 20 tumeurs ont été considérées comme métastatiques d'emblée en raison de la présence au moment du diagnostic de un ou plusieurs nodules péritonéaux additionnels (14 patients), de métastases à distance (foie, ganglions lymphatiques) (2 patients) ou des deux (4 patients). Toutes tumeurs confondues, la taille tumorale variait entre 0.5 et 30 cm (médiane : 6 cm). 35 tumeurs (44.3%) présentaient un diamètre maximal  $\leq 5$  cm et 20 tumeurs (25.3%) présentaient un diamètre  $>10$ cm.

### B Données anatomo-pathologiques

Les principales caractéristiques microscopiques sont données dans le Tableau 4. Les GISTs ont été classées sur le plan histologique en tumeurs composées essentiellement ( $>75\%$ ) de cellules fusiformes (Fig. 7), de cellules rondes (Fig. 8), ou de cellules épithélioïdes (Fig. 9B), ou bien de tumeurs constituées de plusieurs types cellulaires à la fois. Dans certaines tumeurs à cellules fusiformes, les noyaux des cellules avaient tendance à se disposer en palissades, rappelant les nodules de Verocay du schwannome, ou bien le cytoplasme contenait une vacuole qui se disposait électivement à l'une des extrémités du noyau, leur conférant un aspect « en ampoule » (Fig. 9A). Certaines GISTs avaient un aspect épithélioïde (Fig. 9B), et contenaient parfois aussi un nombre variable de cellules géantes multinucléées dans lesquelles les noyaux avaient tendance à se disposer en couronne à la périphérie de la cellule. Sept (8.75%) tumeurs contenaient des atypies cellulaires diffuses

(1 cas) ou focales (6 cas) ou des foyers de cellules nettement pléomorphes, et 3 (3.75%) contenaient des images d'embolies vasculaires tumorales. 29 tumeurs (36.25%) contenaient des foyers de nécrose. Le nombre de mitoses pour 50 champs microscopiques au fort grossissement variait entre 0 et 120 (médiane : 4 mitoses; moyenne : 18 mitoses). Le nombre de mitoses pour 10 champs microscopiques au fort grossissement variait entre 0 et 36 (médiane : 2 mitoses; moyenne : 5.6 mitoses). La distribution des tumeurs en fonction de leur cellularité et de leur grade histologique selon le système consensuel de Fletcher et al. [1] est donnée dans le tableau 4. La tumeur infiltrait (avec ou sans ulcération) la muqueuse digestive dans 31 des 67 cas (46.2%) évaluables. Les bords de la tumeur étaient bien délimités dans 69 cas (88.5%) sur 78 évaluables.

Les résultats de l'étude immunohistochimique sont résumés dans le Tableau 5. Six (7.5%) GISTs n'exprimaient pas le CD117 en dépit d'une morphologie typique. De même, 10% des GISTs n'exprimaient pas le CD34. Parmi les 6 GISTs négatives pour le CD117, une seule était aussi négative pour le CD34. Cette tumeur siégeait dans l'estomac, mesurait 1 cm de diamètre maximal et entrait dans la catégorie des tumeurs "very low risk" dans le système de grade histologique consensuel de Fletcher et al. [1]. Les 5 autres tumeurs négatives pour le CD117 siégeaient dans l'estomac (n=3), le duodénum (n=1) et l'épiploon (n=1). Les 8 tumeurs qui n'exprimaient pas le CD34 étaient constituées majoritairement de cellules fusiformes (6 cas sur 8) et appartenaient aux catégories des tumeurs de très faible risque (n=3), de faible risque (n=1), de risque intermédiaire (n=2) et de haut risque (n=2) dans le système de grade histologique consensuel de Fletcher et al. [1]. Elles siégeaient dans l'estomac (n=2), l'intestin grêle (n=5) et le mésentère/épiploon (n=1). Le marquage pour l'énolase spécifique des neurones était typiquement "en aires" lorsqu'il était focal,

avec une alternance de zones marquées et de zones non marquées, alors que le marquage pour la protéine Protein Gene Product 9.5 était principalement diffus et le plus souvent intense. La chromogranine-A et la synaptophysine n'étaient pratiquement pas exprimées.

Parmi les récepteurs aux facteurs de croissance, seul CD105 était exprimé clairement dans les cellules tumorales sous la forme d'un marquage cytoplasmique diffus (Fig. 5A) ou focal, s'accompagnant souvent d'un renforcement membranaire. Les cellules endothéliales (qui expriment constitutionnellement CD105) étaient toujours marquées et ont servi de témoin interne pour ce marqueur (Fig. 5A et 5B). Sur les 80 GISTs soumises à l'anticorps anti-CD105, 40 n'exprimaient pas CD105 (Fig. 5B), 21 présentaient un marquage de faible intensité, 11 un marquage d'intensité modérée et 8 un marquage de forte intensité (Fig. 5A). Il n'y avait pas de relation entre l'intensité d'expression de CD105 et la taille de la tumeur ( $\leq 5$ cm versus  $> 5$  cm ;  $p=0.79$ ), son siège et la présence ou non de nécrose ( $p=0.8$ ). En revanche, il existait une relation entre l'intensité du marquage et le nombre de mitoses ( $p=0.0015$  ;  $n=80$ ) ; plus le nombre de mitoses était élevé, plus le marquage par CD105 était intense (Fig. 11). Il existait aussi une relation entre le grade selon Fletcher et al. et l'expression de CD105 (plus le grade était élevé, plus la tumeur exprimait CD105 ;  $p=0.029$ ). De même, les tumeurs les plus cellulaires tendaient à montrer une immunoexpression accrue de CD105 ( $p=0.078$ ). Aucune relation n'a été observée entre le mode d'expression (focal versus diffus) et la taille de la tumeur, le nombre de mitoses, la densité cellulaire ou le grade selon Fletcher et al..

Pour C-MET, 72 résultats étaient interprétables. 38 (52%) GISTs exprimaient le récepteur C-MET, incluant 24 tumeurs qui l'exprimaient faiblement et 14 tumeurs qui l'exprimaient avec une intensité modérée (Fig. 6). Aucune tumeur n'exprimait fortement C-MET (focalement ou diffusément). Il n'y avait pas de relation entre l'intensité d'expression de

C-MET et la taille de la tumeur ( $\leq 5$  cm versus  $> 5$  cm ;  $p=0.79$ ,  $n=72$ ), son siège, la présence ou non de nécrose ( $p=0.8$ ), l'intensité de l'activité mitotique ( $p=0.39$ ), la densité cellulaire ( $p=0.09$ ) et le grade selon Fletcher et al. ( $p=0.8$ ).

25% des GISTs exprimaient le récepteur gp75 au NGF, 17.5% le récepteur 1 du TGF $\beta$ , et 36.25% le récepteur RET. Il n'y avait pas de relation significative entre l'expression de ces trois derniers marqueurs et les facteurs anatomo-cliniques comme la taille et le siège de la tumeur, la présence de nécrose, le nombre de mitoses, la densité cellulaire, et le grade selon Fletcher et al. .

### C - Evolution des patients et analyses statistiques

Les données de survie ont pu être collectées pour les 80 patients (Tableaux 3 et 3bis). Le suivi clinique variait entre 1 semaine et 228 mois (médiane: 48 mois ; moyenne: 55.1 mois). 20 patients ont été considérés comme métastatiques au moment du diagnostic. Dix huit d'entre eux présentaient une dissémination intrapéritonéale de la maladie au moment du diagnostic, indépendamment de la présence ou non de métastases à distance. Parmi ces dix-huit malades, 3 d'entre eux présentaient des métastases hépatiques synchrones et un quatrième patient présentait une métastase ganglionnaire concomitante. Deux patients avaient des métastases hépatiques au moment du diagnostic sans être accompagnées de dissémination intrapéritonéale de la maladie.

21 patients (27.3%) sont décédés de leur maladie entre 1 mois et 69 mois (médiane : 22 mois ; moyenne : 23.5 mois) après le diagnostic. Parmi les 60 patients qui présentaient une maladie localisée au moment du diagnostic, 9 ont développé une ou plusieurs métastases à distance au cours de l'évolution de la maladie, entre 2 et 42 mois après le diagnostic (médiane : 14 mois ; moyenne : 15 mois). Ces métastases se situaient dans le foie ( $n=7$ ),

les ganglions (n=1) et les ganglions et l'os (n=1). 9 patients ont développé des récurrences locales « vraies » (c'est-à-dire après exérèse macroscopiquement complète préalable de la tumeur primaire), entre 8 et 54 mois après le diagnostic (médiane : 23 mois ; moyenne : 30.4 mois).

### *Analyses univariées*

Les survies globales (*disease-specific survivals*) pour le groupe des 60 patients avec maladie localisée au moment du diagnostic et pour le groupe des 20 patients métastatiques au moment du diagnostic sont montrées dans la Fig. 12. 88.4% des patients avec maladie localisée au moment du diagnostic étaient en vie à 5 ans contre 23.7% des patients métastatiques au moment du diagnostic. La médiane de survie globale était de 22 mois pour les patients métastatiques au diagnostic.

### α - Analyses univariées portant sur la population totale des patients (n=80)

Lorsque la totalité des patients était prise en considération (patients métastatiques et non métastatiques au moment du diagnostic), les facteurs associés à une réduction significative de la survie globale étaient les suivants: un grade histologique consensuel (Fletcher et al. [1]) élevé (40.9% des patients porteurs d'une tumeur de haut risque étaient vivants à 5 ans *versus* 97.1% pour ceux qui étaient porteurs d'une tumeur qui n'était pas de haut risque;  $p < 0.0001$ ), une densité cellulaire élevée (90.9% des patients porteurs d'une tumeur de densité cellulaire basse étaient vivants à 5 ans contre 51.3% pour les patients porteurs d'une tumeur de densité cellulaire haute;  $p < 0.0001$ ) (Fig. 13), un nombre de mitoses  $> 5/50$  champs (97.3% des patients porteurs d'une tumeur dont le nombre de mitoses était  $\leq 5$  pour 50 champs étaient vivants à 5 ans *versus* 35.8% pour les tumeurs ayant un nombre de

mitoses >5/50 champs;  $p < 0.0001$ ), la présence de nécrose tumorale ( $p < 0.0001$ ), une taille tumorale >8cm ( $p = 0.02$ ), une localisation tumorale extra-digestive ( $p = 0.029$ ), une infiltration de la muqueuse digestive ( $p = 0.013$ ). L'expression de protéine S100 (tumeurs négatives *versus* tumeurs positives) était aussi associée à une survie globale significativement raccourcie ( $p = 0.0001$ ) de même qu'une immunoexpression de CD105 (88.5% de survie à 5 ans pour les tumeurs négatives pour CD105 *versus* 51.9% pour les tumeurs positives;  $p = 0.0001$ ) (Fig. 14). Il existait aussi une relation entre l'intensité de l'expression de CD105 et la survie globale ( $p = 0.0005$  ;  $n = 80$ ). Bien que la différence ne soit pas significative, l'immunoexpression du récepteur au TGF $\beta$  tendait aussi à être associée à une survie plus courte ( $p = 0.074$  ;  $n = 80$ ). L'immunoexpression du récepteur C-MET et du récepteur gp75 au NGF n'étaient pas des facteurs pronostiques significatifs. Il n'y avait pas, non plus, de relation entre l'intensité de l'expression de C-MET et la survie globale ( $p = 0.3$  ;  $n = 72$ ).

$\beta$  - Analyses univariées portant uniquement sur les patients présentant une maladie localisée au moment du diagnostic (n=60)

Les facteurs associés à une réduction significative de la survie globale des patients avec une GIST localisée au moment du diagnostic étaient les suivants : un grade histologique élevé ( $p < 0.0001$ ), une densité cellulaire élevée ( $p = 0.0021$ ), un nombre de mitoses >5/50 champs ( $p < 0.0001$ ), une immunoexpression de CD105 (96.4% de survie à 5 ans pour les tumeurs négatives pour CD105 *versus* 77.9% pour les tumeurs positives;  $p = 0.012$ ) (Fig. 15), un marquage d'intensité modérée ou marquée pour CD105 ( $p = 0.014$ ), une immunoexpression de C-MET (100% de survie à 5 ans pour les tumeurs négatives pour C-MET *versus* 78.7% pour les tumeurs positives;  $p = 0.02$ ,  $n = 53$ ) (Fig.16), et une absence

d'immunoexpression de RET (100% de survie à 5 ans pour les tumeurs positives pour RET versus 82.4% pour les tumeurs négatives;  $p=0.048$ ). L'expression de CD105 était aussi associée à une réduction significative de la survie sans récurrence de la maladie (DFS) ( $p=0.0094$ ) (Fig. 17). L'intensité de marquage pour C-MET n'était significativement pas associée à la survie globale ( $p=0.06$ ).

$\gamma$  - Analyses univariées portant uniquement sur les patients métastatiques au moment du diagnostic (n=20)

En dépit de la présence de métastases au diagnostic qui réduisait considérablement la survie de ces patients, les facteurs associés à une réduction significative de cette survie globale étaient les suivants : une densité cellulaire élevée ( $p=0.0054$ ), un nombre de mitoses  $>5/50$  champs ( $p=0.0025$ ), une immunoexpression de CD105 ( $p=0.0025$ ) (Fig. 18) avec un marquage intense ( $p=0.007$ ). Une immunoexpression du récepteur C-MET (mais non l'intensité de marquage) était associée, plus faiblement, avec une survie globale raccourcie ( $p=0.026$ ,  $n=19$ ). Les autres récepteurs aux facteurs de croissance étudiés, le grade histologique selon Fletcher et al. ( $p=0.06$ ), la taille de la tumeur ( $\leq 5$ cm versus  $>5$  cm), et la présence ou non de nécrose n'étaient pas associés significativement à la survie dans ce sous-groupe de patients.

*Analyses multivariées (n=80)*

L'analyse multivariée portant sur la survie globale et incluant tous les paramètres pronostiques importants identifiés lors des études univariées comme la taille de la tumeur ( $\leq 5$ cm versus  $>5$ cm), la présence ou non de nécrose, l'âge (variable continue), la densité cellulaire (haute vs basse), le nombre de mitoses/50hpf ( $\leq 5$  vs 6-10 vs  $>10$  mitoses), le

grade selon Fletcher et al., la dissémination métastatique au diagnostic (présente vs absente), l'expression de CD105 (présente vs absente), et l'expression de C-MET (présente vs absente) a montré que la présence de métastase(s) au diagnostic, un nombre de mitoses >5/50 hpf, une immunoexpression de CD105 et la présence de nécrose tumorale étaient les facteurs pronostiques indépendants les plus importants (Fig. 19). Bien que de valeur pronostique en analyses univariées, la densité cellulaire, le grade selon Fletcher et al. et la taille tumorale n'ont pas été retenus dans le modèle comme ajoutant une information pronostique supplémentaire.

## **Discussion**

Les GISTs peuvent être considérées actuellement comme des tumeurs spécifiques à l'appareil digestif, péritoine et épiploon compris. Alors qu'auparavant, ces tumeurs étaient classées en tumeur bénignes, de malignité intermédiaire et malignes, on sait aujourd'hui qu'elles sont toutes potentiellement malignes, capables de récidiver et de donner des métastases (notamment au niveau du foie) et ce, quelle que soit leur taille (même des tumeurs <1cm peuvent métastaser) et leur aspect microscopique [1,6].

De nombreux facteurs interviennent dans la naissance, la croissance, la différenciation et le maintien des proliférations tumorales mésenchymateuses. Les récepteurs aux facteurs de croissance, et notamment ceux à activité tyrosine kinase, sont d'une grande importance, et ceci est particulièrement vrai pour les GISTs [1-10,45,58]. Dans les 10 dernières années, il a été démontré que deux d'entre eux, KIT et PDGFRA intervenaient majoritairement dans le développement et la croissance des GISTs digestives et extra-digestives [4-7,58]. L'intervention d'autres facteurs comme les récepteurs à peptides est possible, voire probable, mais a été peu explorée dans la littérature [59].

Dans notre étude immunohistochimique, 6 GISTs (7.5%) n'exprimaient pas le CD117 mais présentaient néanmoins un aspect morphologique typique et, par ailleurs, un profil immunohistochimique compatible avec ce diagnostic. Ces tumeurs n'ont pas été exclues du collectif car l'on sait maintenant qu'il existe environ 5% des GISTs qui n'expriment pas le CD117 [6,20]. Par ailleurs, le profil immunohistochimique des GISTs examinées était tout en fait en harmonie avec les données de la littérature, notamment en ce qui concernait la proportion de tumeurs positives pour chaque anticorps testé [1-6,60-62].

Les GISTs de notre collectif étaient toutes négatives pour le récepteur 1 à l'IGF (100%), et majoritairement négatives pour le récepteur au FGF (92.5%) et pour le récepteur au TGF $\beta$  (type 1) (82.5%). 75% et 62.5% respectivement des GISTs n'exprimaient pas les récepteurs p75NTR et RET. Ceci suggère que ces récepteurs n'ont probablement pas une importance capitale dans la croissance des GISTs.

En revanche, 50% et 52% des GISTs exprimaient respectivement CD105 et C-MET, laissant présager que ces deux récepteurs pourraient avoir un rôle important dans la croissance tumorale. Concernant CD105, le marquage des cellules tumorales était cytoplasmique, focal ou diffus, avec parfois un renforcement membranaire. Une revue de la littérature montre que, hormis les cellules endothéliales, CD105 (endogline) peut être exprimée dans le cytoplasme de certaines tumeurs, notamment dans certains méningiomes, léiomyosarcomes, fibrosarcomes et angiosarcomes [32]. En revanche, aucune donnée n'existe concernant l'expression de CD105 par les GISTs. De façon inattendue, les tumeurs de notre collectif qui exprimaient CD105 avaient une plus mauvaise évolution que celles qui ne l'exprimaient pas. Cette différence pronostique était présente quelle que soit les sous-populations de patients étudiées: population totale de patients et sous-groupe de

patients avec maladie localisée au diagnostic. La différence pronostique était aussi visible lorsque l'on considérait la survie sans récurrence de la maladie (disease-free survival). Plus intéressant encore, cette mauvaise influence de l'expression de CD105 était aussi observée dans le sous-groupe des patients qui étaient métastatiques au moment du diagnostic; les patients avec une tumeur CD105 positive présentant une survie globale significativement plus courte que ceux qui avaient une tumeur CD105 négative. Au vu de ces données, l'expression de CD105 semble être un facteur pronostique d'intérêt. Ceci semble se confirmer par l'analyse multivariée. Cette dernière, qui incluait tous les facteurs possédant une valeur pronostique significative en analyses univariées, a montré que la présence d'une dissémination métastatique au diagnostic, un nombre de mitoses  $>5/50$  hpf, une expression de CD105 et la présence de nécrose étaient les facteurs pronostiques les plus importants. Cette analyse permet donc de retenir l'expression du CD105 comme un facteur pronostique indépendant et défavorable, et d'éliminer un facteur confondant comme l'activité mitotique. Comme CD105 est une protéine appartenant au complexe de liaison du récepteur au TGF $\beta$ , il est possible que TGF $\beta$  joue en fait un rôle important dans le maintien ou la stimulation de la prolifération tumorale des GISTs via par exemple CD105. Peu de tumeurs (17.5%) de notre étude exprimaient le récepteur au TGF $\beta$ . Si l'on compare néanmoins la survie des patients dont la tumeur exprimait le récepteur au TGF $\beta$  à ceux dont la tumeur ne l'exprimait pas, il existe une tendance pour les patients exprimant le récepteur au TGF $\beta$  de type 1 à avoir une plus mauvaise évolution même si la différence n'est pas significative ( $p=0.07$ ). Ainsi, le TGF $\beta$  et certaines protéines associées aux récepteurs du TGF $\beta$  comme CD105 pourraient jouer un rôle significatif dans la croissance des GISTs et/ou leur évolution vers des degrés de malignité plus élevés. Ceci est en accord avec la relation étroite qui existe entre l'expression de CD105 et l'activité mitotique ( $\leq 5$  versus  $>5$

mitoses/50 hpf) ( $p=0.003$ ). Comme attendu, les tumeurs les plus cellulaires sont aussi celles qui expriment volontiers CD105 ( $p=0.07$ ). En revanche, il n'y a pas de relation évidente entre la taille de la tumeur ( $\leq 5$  cm vs  $>5$  cm) et l'expression de CD105 ( $p=0.49$ ), en accord avec la notion selon laquelle n'importe quelle GIST, quelle que soit sa taille, peut avoir une évolution maligne.

C-MET est un récepteur tyrosine kinase dont le ligand est le facteur de croissance des hépatocytes. Ce récepteur est exprimé dans le cytoplasme de plus de la moitié des GISTs, de manière focale ou diffuse. Dans le sous groupe des patients non métastatiques au diagnostic, l'expression du récepteur C-MET est un facteur de mauvais pronostic avec une survie globale significativement raccourcie ( $p=0.02$ ) chez ces patients. De même, chez les patients métastatiques au moment du diagnostic, l'expression du récepteur C-MET s'associe aussi à une mauvaise évolution ( $p=0.026$ ). Une expression augmentée de C-MET a été observée dans de multiples cancers, y compris certaines tumeurs des tissus mous (ex. rhabdomyosarcome, sarcome de Kaposi) [37,40,41]. Comme pour les GISTs, l'expression de C-MET semble s'observer plus volontiers dans les tumeurs de haut grade et de mauvais pronostic [41]. Ainsi, comme pour CD105, C-MET pourrait constituer une cible potentielle pour un traitement ciblé et l'utilisation de médicaments anti-tyrosine kinase chez les patients porteurs de GISTs de haut risque.

Ces données préliminaires doivent néanmoins être confirmées sur une plus grande série de patients, traités de façon homogène. Si cette hypothèse de travail est vraie, l'utilisation de substances bloquant la production de TGF $\beta$  (par les cellules tumorales ou les cellules du stroma) ou bloquant les récepteurs au TGF $\beta$  comme CD105 pourrait avoir un intérêt.

Certains experts pensent que l'imatinib mésylate pourrait être administré comme thérapie adjuvante aux patients présentant des tumeurs de très mauvais pronostic, c'est à dire à haut risque de récurrence locale et/ou de dissémination métastatique. Le grade selon Fletcher et al. [1] est, pour l'instant, le seul moyen d'identifier ces tumeurs à haut risque sur le plan histologique. Dans les essais européens actuellement en cours, seules les tumeurs complètement rééquies de grade intermédiaire et de haut grade ont été incluses (essai EORTC 62024). On sait par expérience que les tumeurs de grade intermédiaire selon le système de grade histologique de Fletcher et al. constituent un groupe inhomogène dans lequel se côtoient des tumeurs agressives et des tumeurs indolentes. La présence d'une expression marquée de CD105 pourrait constituer un argument en faveur d'un risque élevé d'évolution agressive et donc être utilisé pour mieux sélectionner les candidats potentiels à une thérapie adjuvante. Par ailleurs, comme la tendance actuelle est d'associer plusieurs drogues (comme les inhibiteurs de mTOR ou les dérivés de la staurosporine) à l'imatinib mésylate pour augmenter l'efficacité du traitement, on pourrait imaginer associer un anti-CD105 à l'imatinib pour traiter les patients porteurs de tumeurs agressives surexprimant CD105. Malheureusement, actuellement, il n'existe pas (encore) de drogues commercialisées ciblant spécifiquement CD105.

## **Conclusion**

Quatre-vingt tumeurs stromales gastro-intestinales (GISTs) ont été examinées sur le plan immunohistochimique à la recherche d'une expression de récepteurs aux facteurs de croissance autres que KIT et PDGFRA (CD105/endogline, TGFβr (type 1), IGF-1r, FGFR, C-MET, NGFr/gp75, Ret). Notre étude montre que les GISTs de mauvais pronostic expriment préférentiellement CD105 et C-MET dans leur cytoplasme et au niveau de leur

membrane cellulaire, deux récepteurs dont les ligands habituels sont respectivement le TGF $\beta$  et le facteur de croissance des hépatocytes. L'expression de CD105, composant accessoire du récepteur au TGF $\beta$ , montre une bonne corrélation avec la survie globale et la survie sans récurrence de la maladie. Il apparaît aussi comme un facteur pronostique indépendant dans les analyses multivariées. Connue pour être impliquée dans le développement et le remodelage des vaisseaux, CD105 semble être aussi étroitement lié à l'activité de prolifération et l'affirmation du caractère malin des GISTs. Il pourrait constituer une cible thérapeutique de choix, notamment chez les patients porteurs de GISTs richement vascularisées et d'évolution rapide.

Tableau 1. Anticorps utilisés pour les immunomarquages

<i>Anticorps</i>	<i>Clone</i>	<i>Monoclonal(M)/</i>		<i>Dilution</i>	<i>Source</i>
		<i>Polyclonal (P)</i>			
<i>CD117</i>	T595	M		1/20	Novocastra
<i>CD34</i>	Q-bend 10	M		1/80	Immunotech
<i>Actine muscul. lisse</i>	1A4	M		1/500	Sigma
<i>Desmine</i>	D33	M		1/40	Dako
<i>S100</i>	--	P		1/2000	Dako
<i>Chromogranine-A</i>	--	P		1/1000	Dako
<i>Synaptophysine</i>	--	P		1/25	Dako
<i>NSE</i>	BBS/NC/7-H14	M		1/900	Dako
<i>PGP-9.5</i>	--	P		1/800	Anawa
<i>IGF-1r</i>	24-31	M		1/1	NeoMarkers
<i>FGFr</i>	VBS-7	M		1/50	Zymed
<i>C-MET / HGFr</i>	8F11	M		1/20	Novocastra
<i>NGFr</i>	7F10	M		1/50	Novocastra
<i>CD105 (endogline)</i>	4G11	M		1/25	Novocastra
<i>TGFβr (type 1)</i>	8A11	M		1/25	Novocastra
<i>RET</i>	3F8	M		1/20	Novocastra

Tableau 2.

**GIST: estimation du risque d'évolution agressive selon le système de grade histologique consensuel (CFM Fletcher et al. Hum Pathol 2002;33:459-465)**

	<i>Taille</i>	<i>Mitoses</i>
<i>Très faible risque</i>	<i>&lt;2cm</i>	<i>&lt;5/50 hpf</i>
<i>Faible risque</i>	<i>2-5cm</i>	<i>&lt;5/50 hpf</i>
<i>Risque intermédiaire</i>	<i>&lt;5cm</i>	<i>6-10/50 hpf</i>
	<i>5-10cm</i>	<i>&lt;5/50 hpf</i>
<i>Haut risque</i>	<i>&gt;5cm</i>	<i>&gt;5/50 hpf</i>
	<i>&gt;10cm</i>	<i>peu importe</i>
	<i>peu importe</i>	<i>&gt;10/50 hpf</i>

**Tableau 3. Caractéristiques cliniques de 80 tumeurs stromales gastro-intestinales**

<b>Nombre total de patients</b>	<b>80 (100%)</b>
<b>Sexe (n=80)</b>	
Homme	33 (41.2%)
Femme	47 (58.8%)
<b>Age (n=80)</b>	
Médiane	67
Ecart	29-94
<b>Siège (n=80)</b>	
Œsophage	1 (1.3%)
Estomac	46 (57.5%)
Intestin (intestin grêle + colon + rectum)	26 (32.5%)
Extra-digestif (mésentère + épiploon)	7 (8.7%)
<b>Taille tumorale (cm) (n=79)</b>	
Médiane	6
Ecart	0.5-30
<b>Extension de la maladie au moment du diagnostic (n=80)</b>	
Tumeur primaire non métastatique au diagnostic	60 (75%)
Tumeur primaire métastatique au diagnostic	20 (25%)
<b>Suivi clinique (n=80)</b>	
Médiane de durée du suivi clinique	48 mois
<u>Survie globale (<i>Disease Specific Survival</i>) de tous les patients (n=80)</u>	
Médiane de survie globale	non calculable
Proportion de patients vivants à 5 ans	71.2%
<u>Survie globale des patients non métastatiques au moment du diagnostic (n=60)</u>	
Médiane de survie globale	non calculable
Proportion de patients vivants à 5 ans	88.4%
<u>Survie globale des patients métastatiques au moment du diagnostic (n=20)</u>	
Médiane de survie globale	22 mois
Proportion de patients vivants à 5 ans	23.7%

**Tableau 3bis. Evolution des patients**

<b>Nombre total de patients</b>	<b>80 (100%)</b>
<b>Extension de la maladie au moment du diagnostic (n=80)</b>	
<u>Tumeur primaire non métastatique au diagnostic</u>	60 (75%)
<u>Tumeur primaire métastatique au diagnostic</u>	20 (25%)
Dissémination intrapéritonéale minime de la maladie	6
Dissémination intrapéritonéale extensive de la maladie	5
Dissémination intrapéritonéale (étendue non précisée) de la maladie	3
Dissémination intrapéritonéale minime de la maladie + métastase(s) hépatique(s)	1
Dissémination intrapéritonéale extensive de la maladie + métastase(s) hépatique(s)	2
Dissémination intrapéritonéale (étendue non précisée) de la maladie + métastase ganglionnaire	1
Métastase(s) hépatique(s) seule(s)	2
<b>Evolution des patients avec maladie disséminée au diagnostic</b>	20 (25%)
Médiane de survie globale	22 mois
Proportion de patients vivants à 5 ans	23.7%
Patients décédés de la maladie	14 (0-48 mois)
<b>Evolution des patients avec maladie localisée au diagnostic</b>	60 (75%)
Médiane de survie globale	non calculable
Proportion de patients vivants à 5 ans	88.4%
Patients décédés de la maladie	7 (2-69 mois)
Causes de décès	
Poursuite évolutive après exérèse incomplète	1
Récidive locale (péritonéale) + métastase(s) hépatique(s)	2
Récidive locale (péritonéale) + métastase(s) ganglion(s) + os	1
Récidive locale (péritonéale) + métastase(s) ganglion(s)	1
Métastase(s) hépatique(s) isolée(s)	2

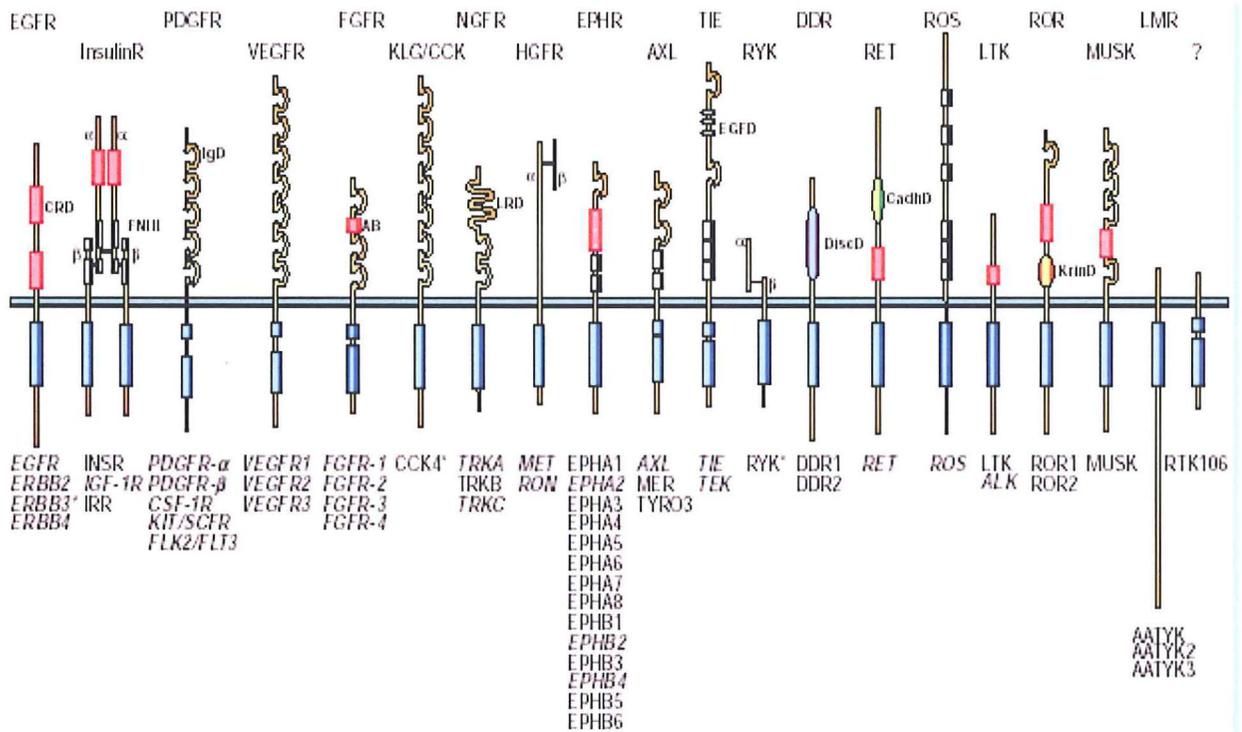
**Tableau 4. Principales caractéristiques morphologiques de 80 tumeurs stromales gastro-intestinales**

<b>Nombre total de patients</b>	<b>80 (100%)</b>
<b>Histologie</b>	
≥ 75% cellules fusiformes	64 (80%)
≥ 75% cellules rondes	4 (5%)
≥ 75% cellules épithélioïdes	4 (5%)
Mélange variable de plusieurs types cellulaires	8 (10%)
<b>Nombre de mitoses / 50 champs (G x400)</b>	
0-5 mitoses	45 (56.2%)
6-10 mitoses	10 (12.5%)
>10 mitoses	25 (31.3%)
<b>Nécrose tumorale</b>	
Absente	51 (63.75%)
< 50%	27 (33.75%)
≥ 50%	2 (2.5%)
<b>Grade FNCLCC (score de différenciation fixé à 3)</b>	
G2	66 (82.5%)
G3	14 (17.5%)
<b>Grade histologique selon CDM Fletcher et al. [1]</b>	
Very low risk	9 (11.25%)
Low risk	16 (20%)
Intermediate risk	18 (22.5%)
High risk	37 (46.25%)
<b>Densité cellulaire</b>	
Basse	40 (50%)
Haute	40 (50%)

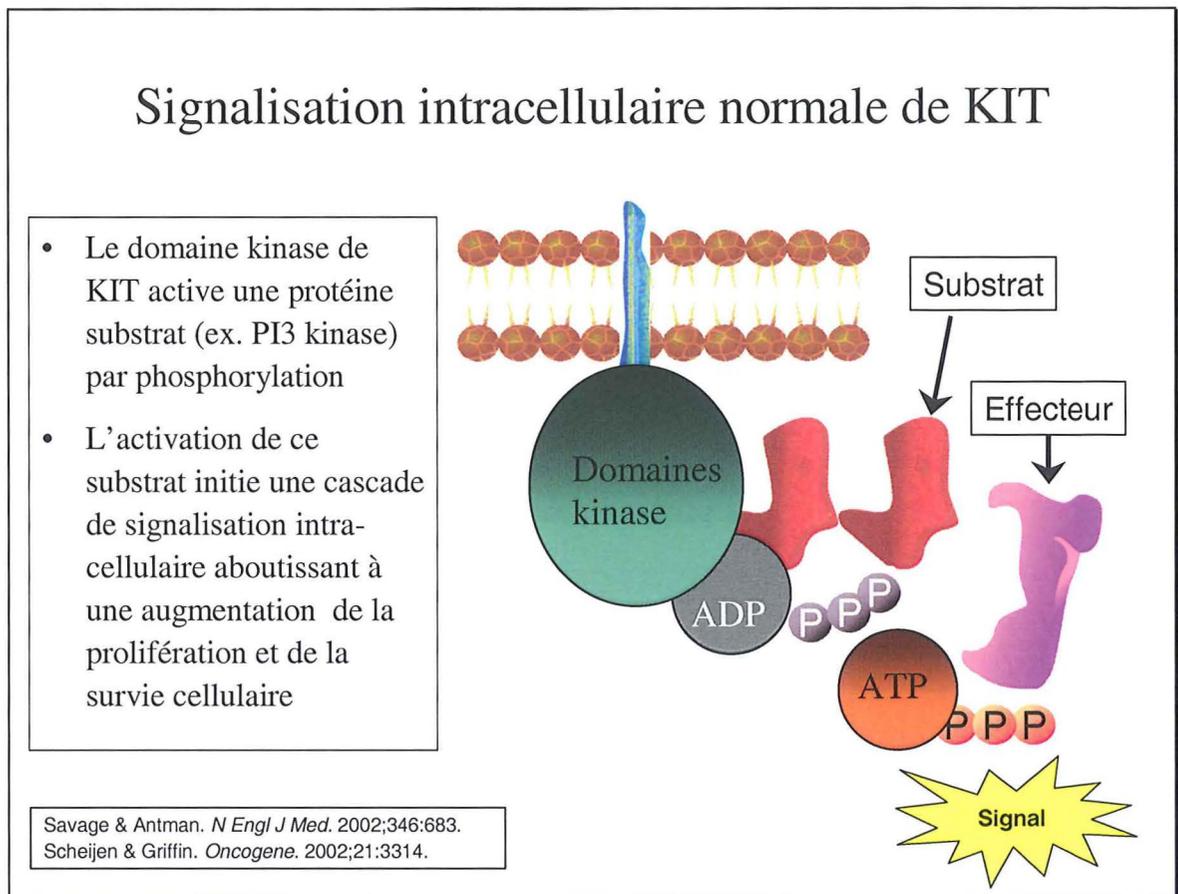
Tableau 5. Profil immunohistochimique de 80 tumeurs stromales gastro-intestinales

<i>Anticorps</i>	<i>Positivité diffuse</i>	<i>Positivité focale</i>	<i>Négativité</i>	<i>Données manquantes/ résultats ininterprétables</i>	<i>Total</i>
<i>CD117 (c-kit)</i>	55 (68.75%)	19 (23.75%)	6 (7.5%)	0	80
<i>CD34</i>	43 (53.75%)	29 (36.25%)	8 (10%)	0	80
<i>Actine muscul. lisse</i>	6 (7.5%)	29 (36.25%)	45 (56.25%)	0	80
<i>Desmine</i>	3 (3.75%)	14 (17.5%)	63 (78.75%)	0	80
<i>Protéine S100</i>	0	8 (10%)	72 (90%)	0	80
<i>NSE</i>	12 (15%)	61 (76.25%)	7 (8.75%)	0	80
<i>PGP-9.5</i>	54 (67.5%)	20 (25%)	6 (7.5%)	0	80
<i>CD56</i>	5 (6.25%)	24 (30%)	51 (63.75%)	0	80
<i>Chromogranine-A</i>	0	0	78 (97.5%)	2 (2.5%)	80
<i>Synaptophysine</i>	0	3 (3.75%)	76 (95%)	1 (1.25%)	80
<i>IGF-1r</i>	0	0	80 (100%)	0	80
<i>FGFr</i>	4 (5%)	2 (2.5%)	74 (92.5%)	0	80
<i>C-MET</i>	29 (36.25%)	9 (11.25%)	34 (42.5%)	8 (10%)	80
<i>NGFr (gp75)</i>	2 (2.5%)	18(22.5%)	60 (75%)	0	80
<i>CD105 (endogline)</i>	26 (32.5%)	14 (17.5%)	40 (50%)	0	80
<i>TGFβr (type 1)</i>	5 (6.25%)	9 (11.25%)	66 (82.5%)	0	80
<i>RET</i>	16 (20%)	13 (16.25%)	50 (62.5%)	1 (1.25%)	80

**Fig. 1. Récepteurs tyrosine kinase** (d'après Blume-Jensen et Hunter, Nature 2001; 411: 355-365.)

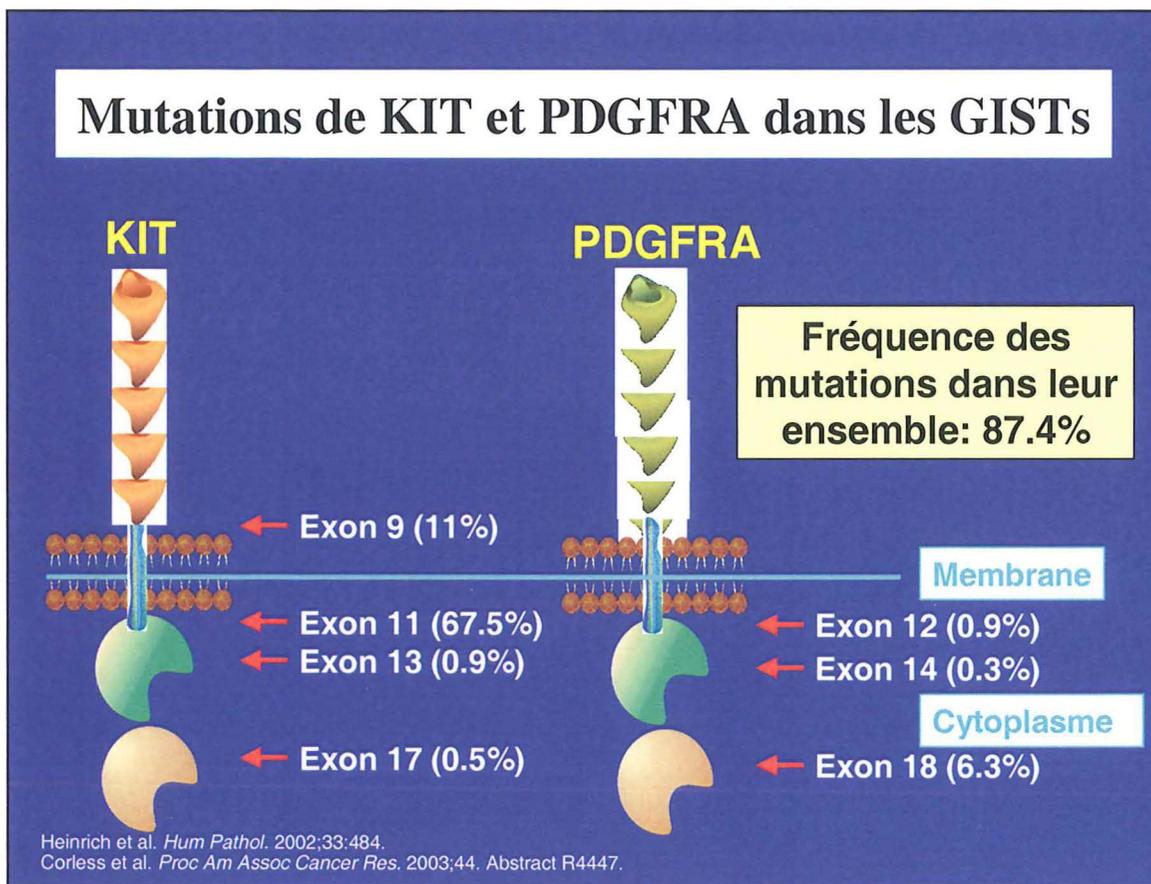


**Fig. 2. Signalisation intracellulaire normale de KIT** (d'après Savage & Antman. *N Engl J Med.* 2002;346:683 et Scheijen & Griffin. *Oncogene.* 2002;21:3314).



Le début de la cascade de signalisation intervient lorsque l'ATP se lie au domaine kinase de KIT situé près de la membrane cellulaire. Ceci permet ensuite l'attachement du substrat et sa phosphorylation. Après transfert des phosphates, le substrat phosphorylé est capable de lier et d'activer les prochains effecteurs de la cascade.

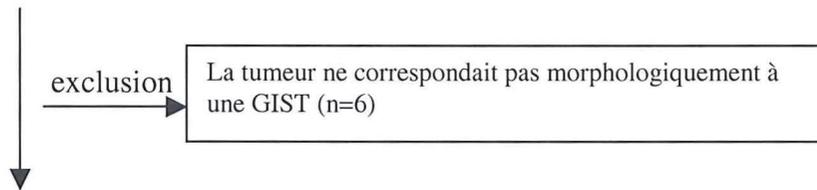
**Fig. 3. Mutations de KIT et PDGFRA dans les tumeurs stromales gastro-intestinales (GIST)** (d'après Heinrich et al. *Hum Pathol.* 2002;33:484 et Corless et al. *Proc Am Assoc Cancer Res.* 2003;44. Abstract R4447.)



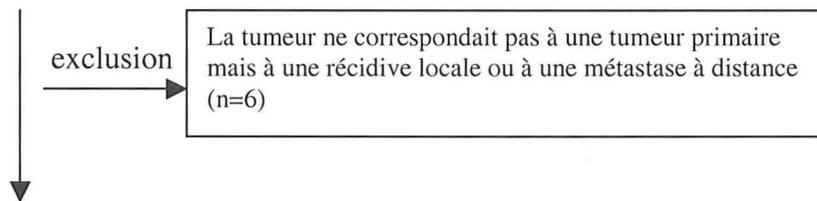
**Fig. 4. Sélection des patients (définition de la cohorte rétrospective)**

**Base de données de l'Institut Universitaire de Pathologie de Lausanne**

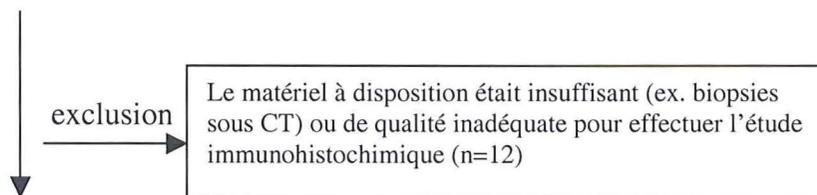
104 patients adultes non consécutifs, collectés entre le 01/01/1977 et le 31/12/2001, porteurs d'une GIST primaire du tube digestif ou du mésentère/épiploon



98 patients avec une GIST prouvée sur le plan morphologique (après révision histologique)



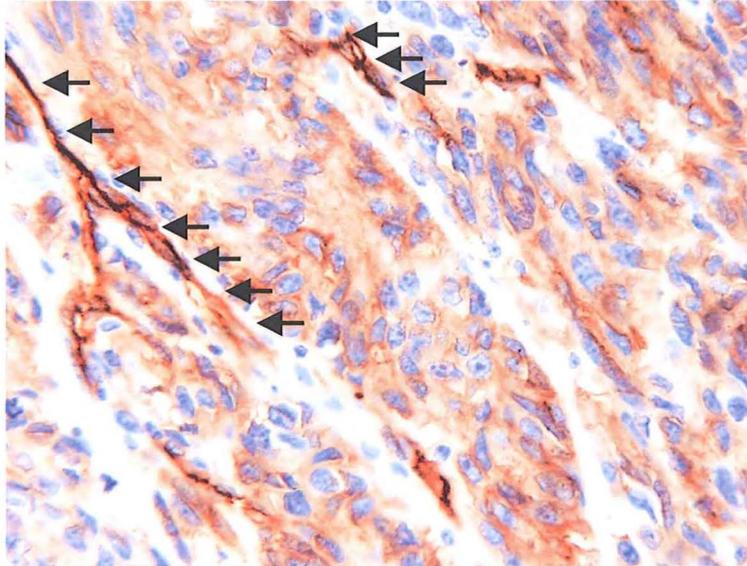
92 patients avec une GIST primaire



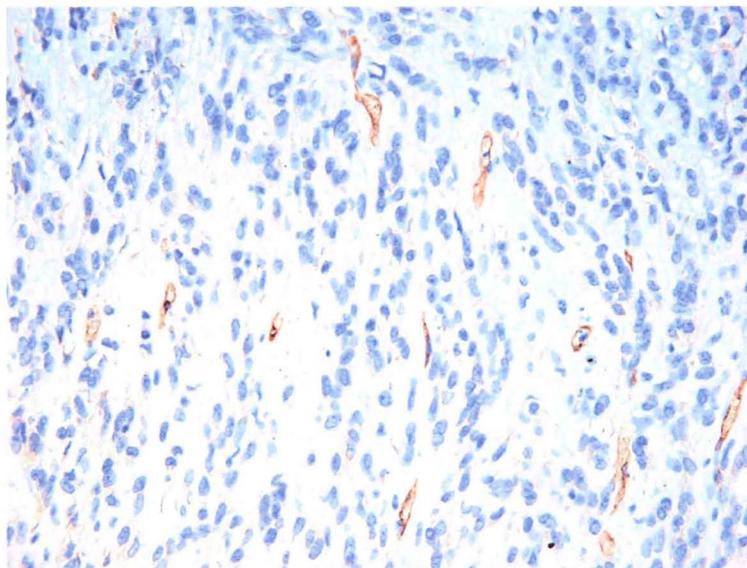
80 patients porteurs d'une GIST primaire sélectionnés pour l'étude

**Fig. 5.**

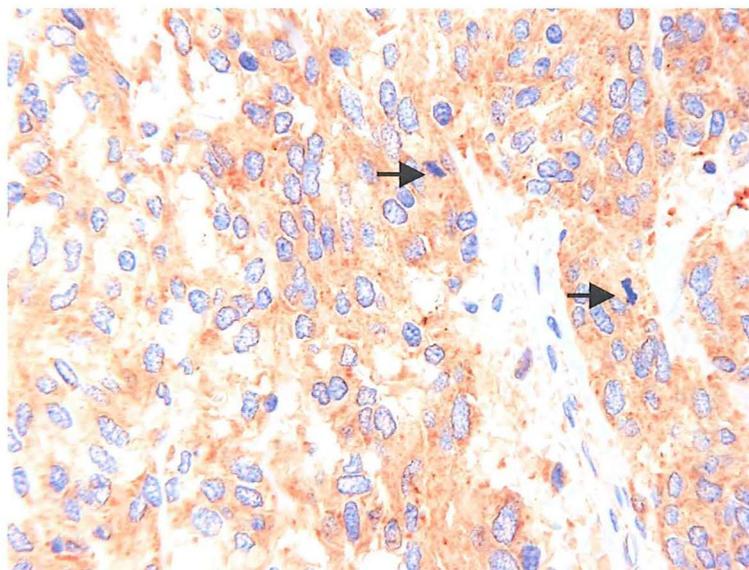
**A.** GIST de haut risque exprimant CD105 de façon marquée. Les cellules endothéliales (flèches) des vaisseaux sont aussi marquées et servent de témoin interne. x 400



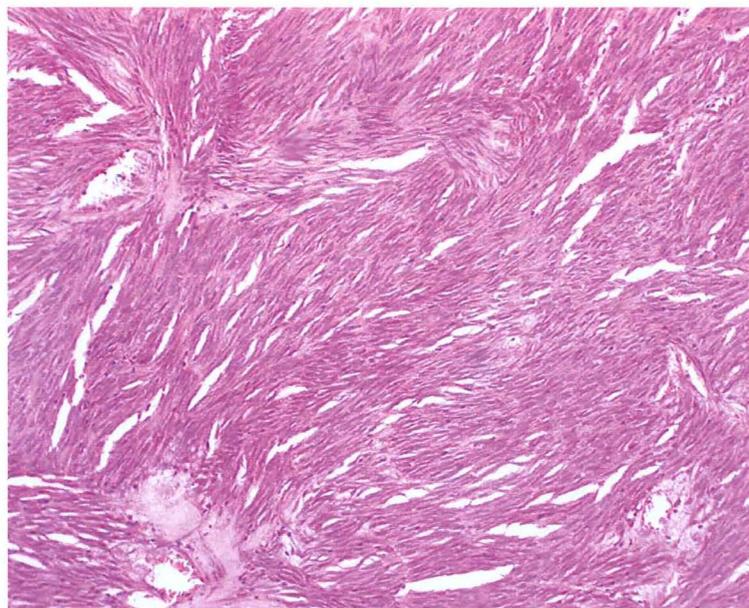
**B.** GIST de faible risque n'exprimant pas CD105. Les cellules endothéliales des vaisseaux intratumoraux réagissent avec l'anticorps anti-CD105 contrairement aux cellules tumorales. x400.



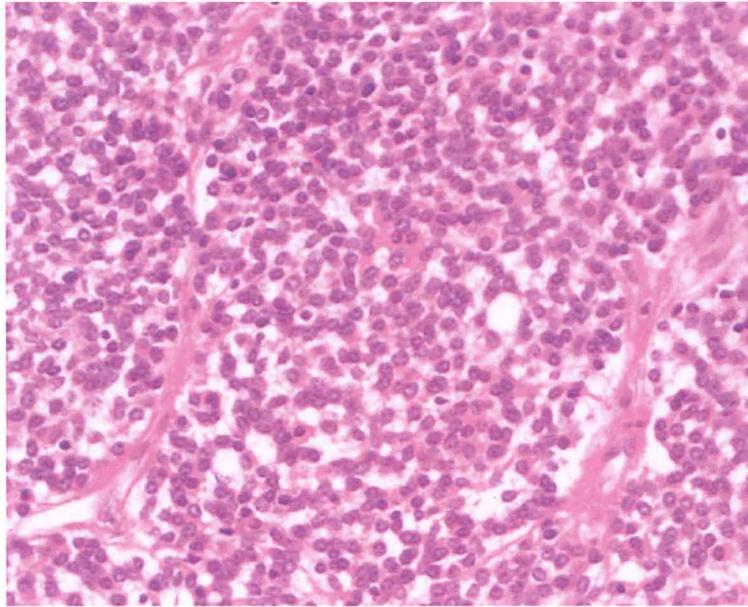
**Fig. 6.** GIST de haut risque exprimant C-MET de façon modérée. Marquage cytoplasmique des cellules. Deux mitoses sont visibles dans ce champ microscopique (flèches). x400.



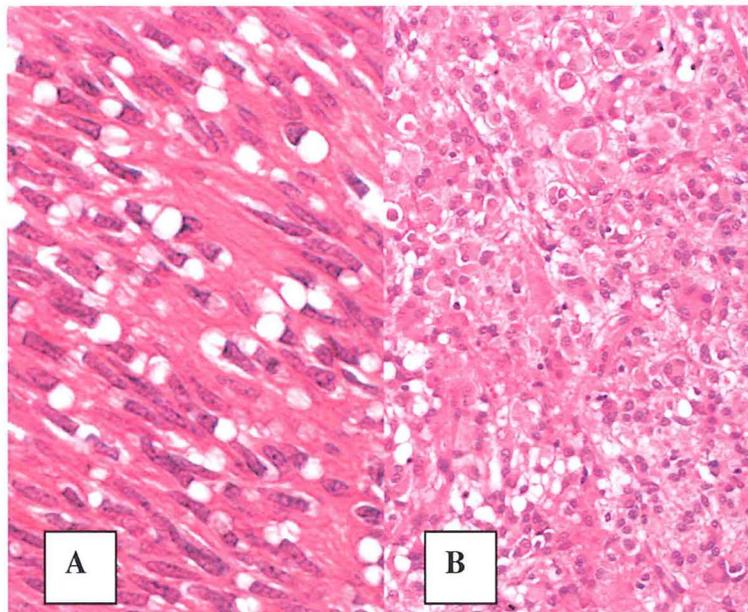
**Fig. 7.** Exemple de GIST constituée de cellules fusiformes (hematoxyline-éosine, x 200)



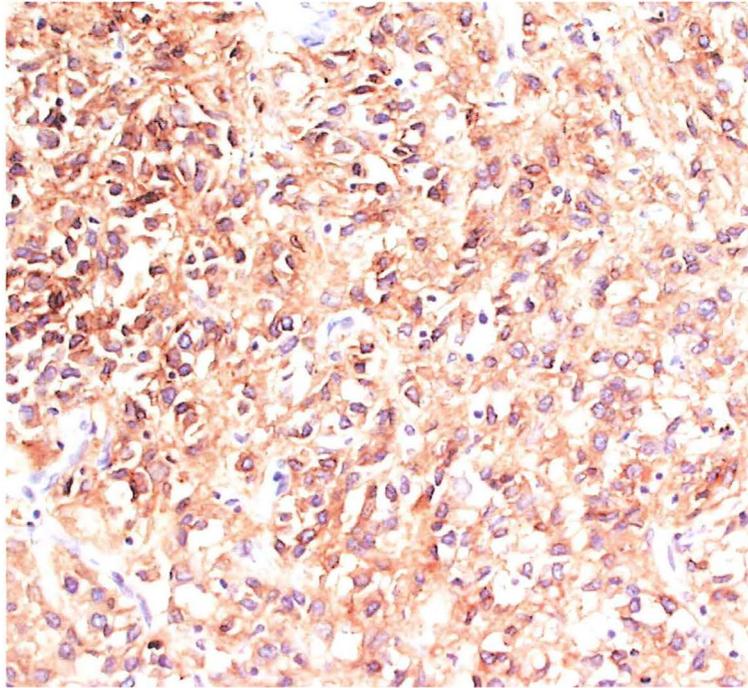
**Fig. 8. Exemple de GIST constituée de cellules rondes (hematoxyline-éosine, x 200)**



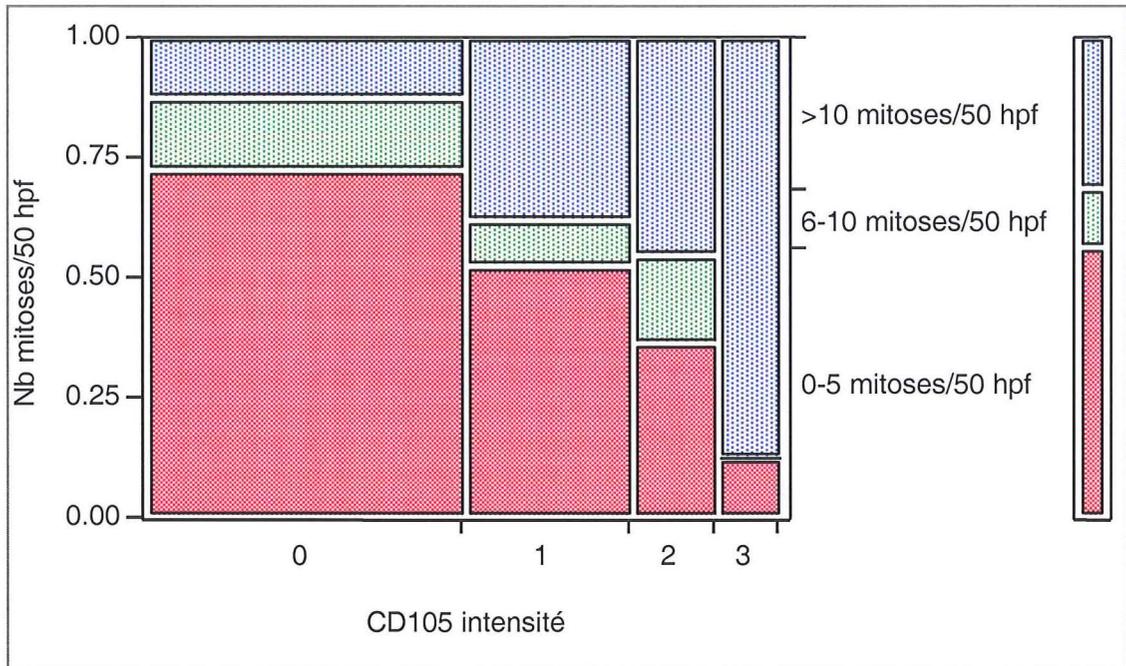
**Fig. 9. GIST constituée de cellules fusiformes avec vacuoles paranucléaires leur conférant un aspect « en ampoule » (A) et GIST d'aspect épithélioïde (B) (hematoxyline-éosine, x 600)**



**Fig. 10. GIST. Positivité diffuse pour le CD117 (anticorps anti-protéine kit, x 200)**

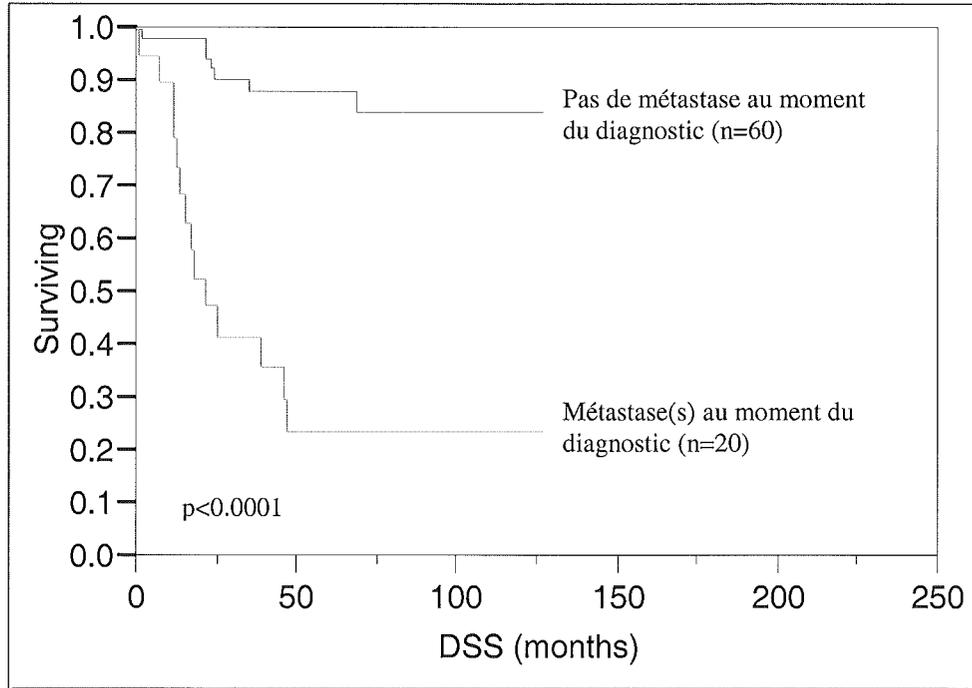


**Fig 11 . Relation entre l'intensité du marquage par l'anticorps anti-CD105 et le nombre de mitoses (n=80)**

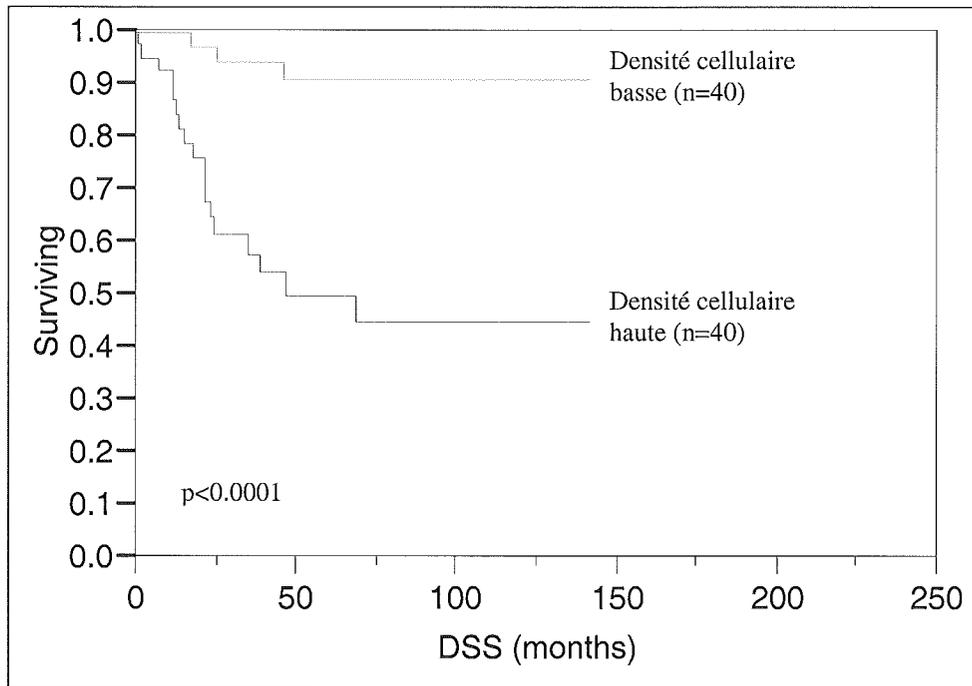


Intensité du marquage : 0 : absence de marquage, 1 : marquage faible, 2 : marquage modéré, 3. marquage intense

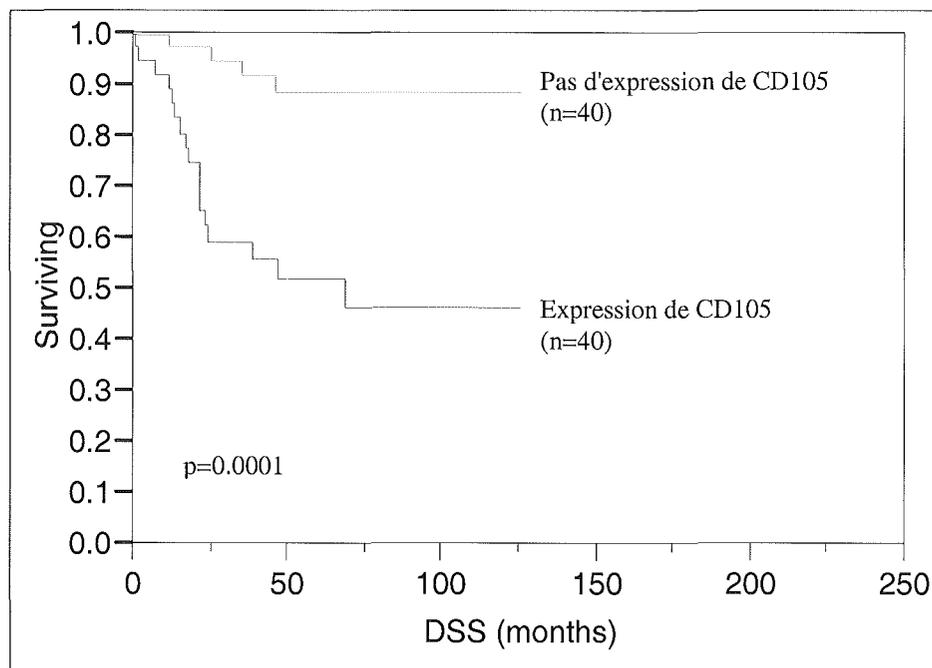
**Fig. 12. Survie globale (disease-specific survival) en fonction de la dissémination de la maladie au moment du diagnostic (n=80)**



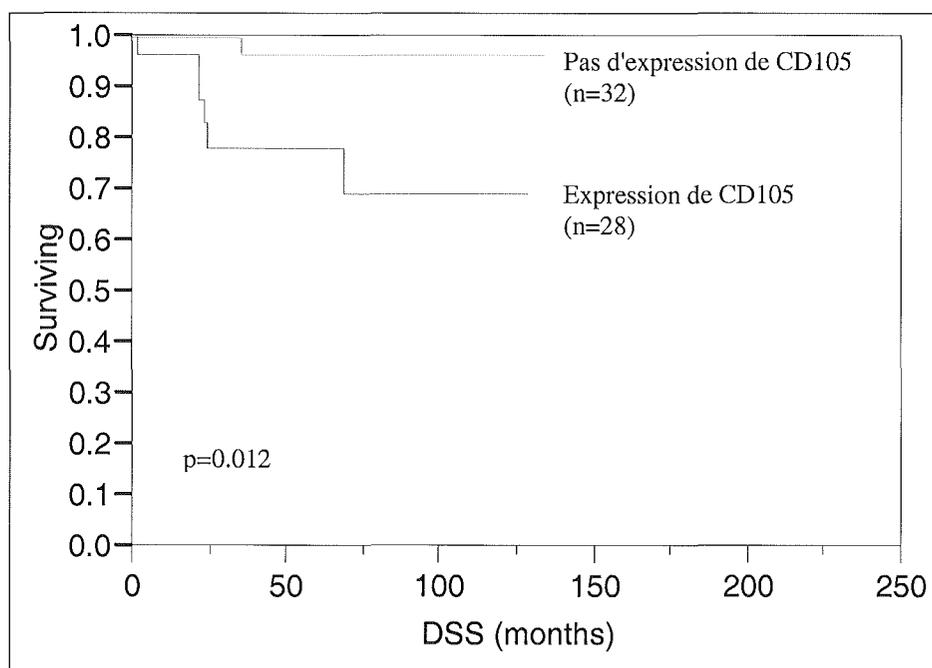
**Fig. 13. Survie globale (DSS) en fonction de la densité cellulaire (n=80)**



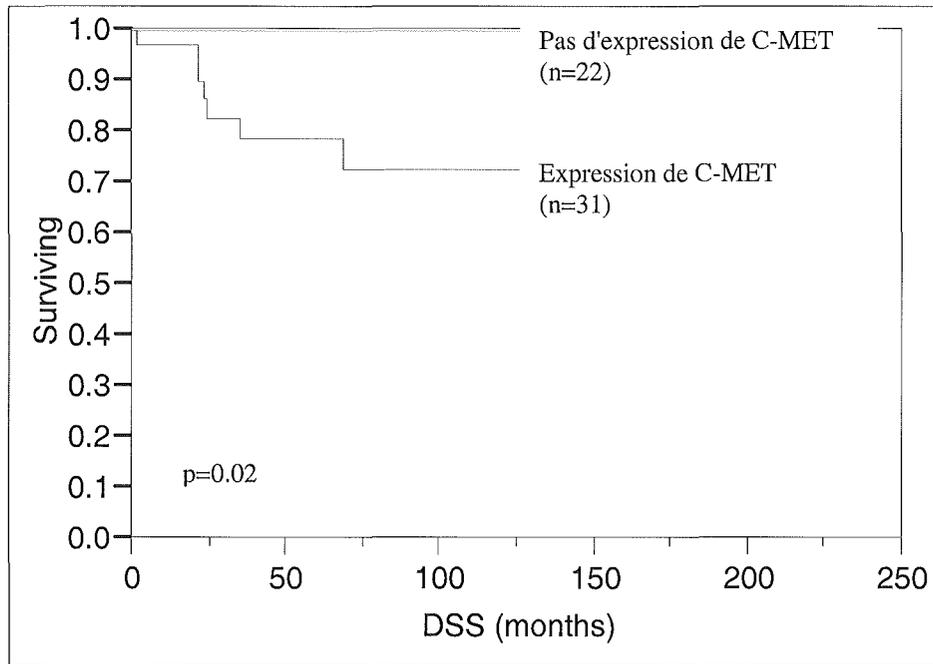
**Fig. 14. Survie globale (DSS) en fonction de l'expression de CD105 (tous les patients; n=80)**



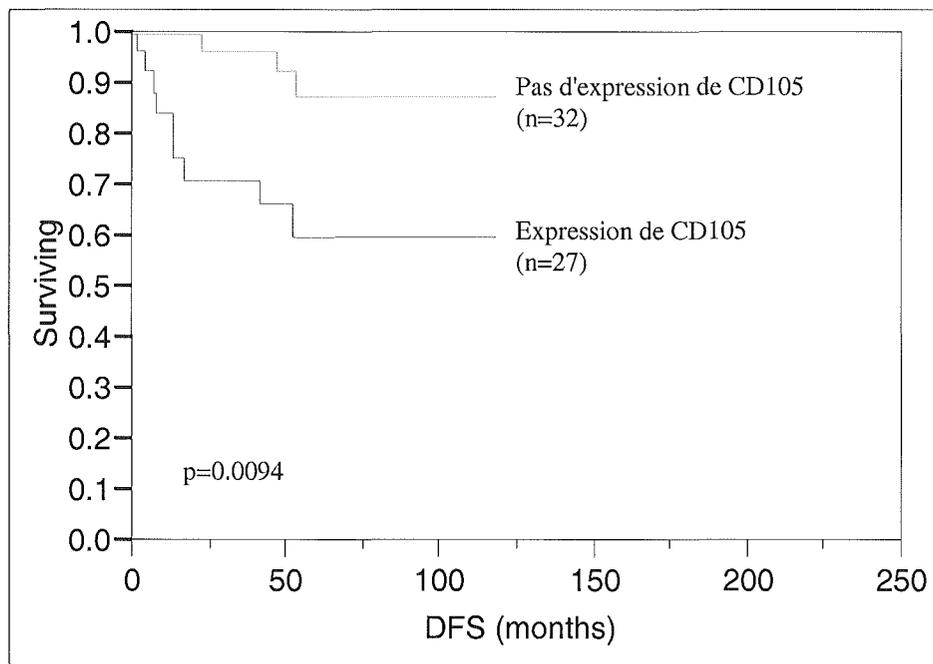
**Fig. 15. Survie globale (DSS) en fonction de l'expression de CD105 (patients non métastatiques au moment du diagnostic; n=60)**



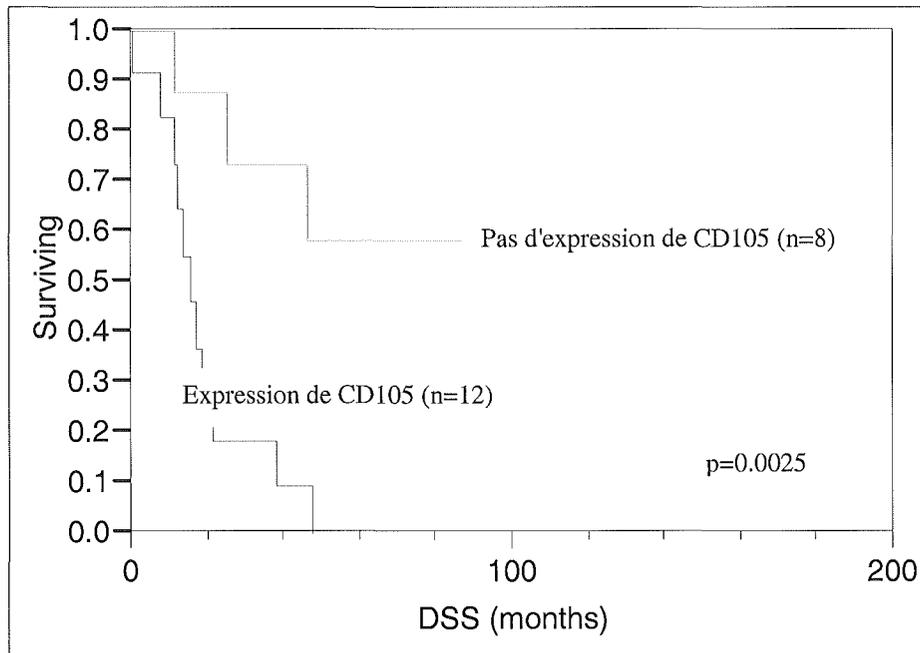
**Fig. 16. Survie globale (DSS) en fonction de l'expression de C-MET (patients non métastatiques au moment du diagnostic, avec données interprétables ; n=53)**



**Fig. 17. Survie sans récurrence de la maladie (disease-free survival; DFS) en fonction de l'expression de CD105 (patients avec maladie localisée au diagnostic; n=59)**



**Fig. 18. Survie globale (DSS) en fonction de l'expression de CD105 (patients métastatiques au moment du diagnostic; n=20)**



**Fig 19 . Résultats de l'analyse multivariée (modèle de Cox) en fonction de la survie globale (tous les patients ; n=80)**

Les variables suivantes étaient incluses dans le modèle: taille ( $\leq 5$ cm versus  $> 5$ cm), nécrose (présent vs absent), âge (variable continue), densité cellulaire (haute vs basse), nombre de mitoses/50hpf ( $\leq 5$  vs 6-10 vs  $> 10$  mitoses), métastase au diagnostic (présent vs absent), expression de CD105 (présent vs absent), expression de C-MET (présent vs absent)

Variabes	Catégorie	Risk Ratio	95%CI	<i>p</i>
Nb de mitoses/50hpf	6-10 mit/50hpf	30.3	3.3-271.5	0.0023
	$> 10$ mit/50hpf	21.2.	2.5-177.5	0.0048
Expression de CD105	présent	9.8	2.3-41.6	0.0020
Métastase au diagnostic	présent	5.1	1.7-14.6	0.0024
Nécrose tumorale	présent	3.9	1.06-14.9	0.0395

## References

- 1 Fletcher CDM, Berman JJ, Corless C, Gorstein F, Lasota J, Longley BJ, Miettinen M, O'Leary TJ, Remotti H, Rubin BP, Shmookler B, Sobin LH, Weiss SW. Diagnosis of gastrointestinal tumours : a consensus approach. *Hum Pathol* 2002 ; 33 : 459-465.
- 2 Miettinen M, Lasota J. Gastrointestinal stromal tumors--definition, clinical, histological, immunohistochemical, and molecular genetic features and differential diagnosis. *Virchows Arch* 2001; 438: 1-12.
- 3 Ray-Coquard I, Le Cesne A, Michallet V, Ranchère D, Thiesse P, Baty V, Blay JY. Tumeurs stromales du tractus digestif: actualités 2003. *Bull Cancer* 2003; 90: 69-76.
- 4 D'Amato G, Steinert DM, McAuliffe JC, Trent JC. Update on the biology and therapy of gastrointestinal stromal tumors. *Cancer Control* 2005 ;12: 44-56.
- 5 Corless CL, Fletcher JA, Heinrich MC. Biology of Gastrointestinal Stromal Tumors. *J Clin Oncol* 2004 ; 22 : 3813-3825.
- 6 Rubin BP. Gastrointestinal stromal tumours: an update. *Histopathology* 2006; 48: 83-96.
- 7 Antonescu CR, Sommer G, Sarran L, Tschernyavsky SJ, Riedel E, Woodruff JM, Robson M, Maki R, Brennan MF, Ladanyi M, DeMatteo RP, Besmer P. Association of

KIT exon 9 mutations with nongastric primary site and aggressive behavior: KIT mutation analysis and clinical correlates of 120 gastrointestinal stromal tumors. *Clin Cancer Res* 2003 ; 9 : 3329-3337.

8 Longley BJ, Reguera MJ, Ma Y. Classes of c-KIT activating mutations : proposed mechanisms of action and implications for disease classification and therapy. *Leuk Res* 2001 ; 25 : 571-576.

9 Rubin BP, Singer S, Tsao C, Duensing A, Lux ML, Ruiz R, Hibbard MK, Chen CJ, Xiao S, Tuveson DA, Demetri GD, Fletcher CD, Fletcher JA. KIT activation is a ubiquitous feature of gastrointestinal stromal tumors. *Cancer Res* 2001 ; 61: 8118-8121.

10 Heinrich MC, Corless CL, Demetri GD, Blanke CD, von Mehren M, Joensuu H, McGreevey LS, Chen CJ, Van den Abbeele AD, Druker BJ, Kiese B, Eisenberg B, Roberts PJ, Singer S, Fletcher CD, Silberman S, Dimitrijevic S, Fletcher JA. Kinase mutations and imatinib response in patients with metastatic gastrointestinal stromal tumor. *J Clin Oncol* 2003 ; 21 : 4342-4349.

11 Granitto SR, Kolachana P, Antonescu CR, Johnson RC, Dematteo RP, Jhanwar SC. Genomic alterations in gastrointestinal stromal tumors as revealed by conventional and array-based comparative genomic hybridization. *Cancer Genomics Proteomics* 2004 ; 1 : 105-116.

- 12 Pylkkanen L, Sarlomo-Rikala M, Wessman M, Hamalainen E, Sainio M, Husgafvel-Pursiainen K, Carpen O. Chromosome 22q alterations and expression of the NF2 gene product, merlin, in gastrointestinal stromal tumors. *Hum Pathol.* 2003; 34: 872-879.
- 13 Takazawa Y, Sakurai S, Sakuma Y, Ikeda T, Yamaguchi J, Hashizume Y, Yokoyama S, Motegi A, Fukayama M. Gastrointestinal Stromal Tumors of Neurofibromatosis Type I (von Recklinghausen's Disease). *Am J Surg Pathol.* 2005; 29: 755-763.
- 14 Yantiss RK, Rosenberg AE, Sarran L, Besmer P, Antonescu CR. Multiple gastrointestinal stromal tumors in type I neurofibromatosis: a pathologic and molecular study. *Mod Pathol.* 2005; 18: 475-484.
- 15 Kinoshita K, Hirota S, Isozaki K, Ohashi A, Nishida T, Kitamura Y, Shinomura Y, Matsuzawa Y. Absence of c-kit gene mutations in gastrointestinal stromal tumours from neurofibromatosis type 1 patients. *J Pathol.* 2004; 202: 80-85.
- 16 Demetri G, Benjamin R, Blanke C, Choi H, Corless C, DeMatteo R, Eisenberg B, Fletcher C, Maki R, Rubin B, Van den Abbeele A, Von Mehren M. NCCN task force report: optimal management of patients with gastrointestinal stromal tumors (GIST). Expansion and update of NCCN clinical practice guidelines JNCCN 2004 ; 2 [suppl 1] : S1-S26.

- 17 Blay JY, Bonvalot S, Casali P, Choi H, Debiec-Rychter M, Dei Tos AP, et al. Consensus meeting for the management of gastrointestinal stromal tumors. Report of the GIST Consensus Conference of 20-21 March 2004, under the auspices of ESMO. *Ann Oncol* 2005; 16: 566-78.
- 18 Heinrich MC, Corless CL, Duensing A, McGreevey L, Chen CJ, Joseph N, Singer S, Griffith DJ, Haley A, Town A, Demetri GD, Fletcher CD, Fletcher JA. PDGFRA activating mutations in gastrointestinal stromal tumors. *Science* 2003; 299: 708-710.
- 19 Hirota S., Ohashi A., Nishida T., Isozaki K., Kinoshita K., Shinomura Y., Kitamura Y. Gain-of-function mutations of platelet-derived growth factor receptor alpha gene in gastrointestinal stromal tumors. *Gastroenterology* 2003 ; 125 : 660-667.
- 20 Medeiros F, Corless CL, Duensing A, Hornick JL, Oliveira AM, Heinrich MC, Fletcher JA, Fletcher CD KIT-Negative Gastrointestinal Stromal Tumors. Proof of Concept and Therapeutic Implications. *Am J Surg Pathol* 2004 ; 28 : 889-894.
- 21 Diment J, Tamborini E, Casali P, Gronchi A, Carney JA, Colecchia M. Carney triad: case report and molecular analysis of gastric tumor. *Hum Pathol* 2005; 36: 112-116.
- 22 Cai YC, Jiang Z, Vittimberga F, Xu X, Savas L, Woda B, Callery M, Banner B. Expression of transforming growth factor-alpha and epidermal growth factor receptor in gastrointestinal stromal tumors. *Virchows Arch* 1999 ; 435: 112-115.

- 23 Takahashi R, Tanaka S, Kitadai Y, Sumii M, Yoshihara M, Haruma K, Chayama K. Expression of vascular endothelial growth factor and angiogenesis in gastrointestinal stromal tumor of the stomach. *Oncology* 2003, 64: 266-274.
- 24 Slominski A, Wortsman J, Carlson A, Mihm M, Nickoloff G, McClatchey K. Molecular pathology of soft tissue and bone tumors. A Review. *Arch Pathol Lab Med* 1999 ; 123: 1246-1259.
- 25 Litz J, Warshamana-Greene S, Sulanke G, Lipson D, Drystal G. The multi-targeted kinase inhibitor SU5416 inhibits small cell lung cancer growth and angiogenesis, in part by blocking Kit-mediated VEGF expression. *Lung Cancer* 2004; 46: 283-291.
- 26 Bennisroune A, Gardin A, Aunis D, Cremel G, Hubert P. Tyrosine kinase receptors as attractive targets of cancer therapy. *Crit Rev Oncol Hematol* 2004; 50: 23-38.
- 27 Demetri G, Desai J, Fletcher J, Morgan J, Fletcher C.D.M., Kazanovicz A, Van Den Abbeele A, Baum C, Maki R, Heinrich M.C. SU11248, a multi-targeted tyrosine kinase inhibitor, can overcome imatinib (IM) resistance caused by diverse genomic mechanisms in patients with metastatic gastrointestinal stromal tumor (GIST). *Proc AM Soc Clin Oncol* 2004 (abstract 3001).
- 28 Kishi K, Homma S, Tanimura S, Matsushita H, Nakata K. Hypoglycemia induced by secretion of high molecular weight insulin-like growth factor-2 from a malignant solitary fibrous tumor of the pleura. *Intern Med.* 2001; 40: 341-344.

- 29 Zafar H, Takimoto CH, Weiss G. Doege-Potter syndrome: hypoglycemia associated with malignant solitary fibrous tumor. *Med Oncol.* 2003; 20: 403-408.
- 30 Surmacz E. Growth factor receptors as therapeutic targets : strategies to inhibit the insulin-like growth factor I receptor. *Oncogene* 2003 ; 22 : 6589-6597.
- 31 Prieur A, Tirode F, Cohen P, Delattre O. EWS/FLI-1 silencing and gene profiling of Ewing cells reveal downstream oncogenic pathways and a crucial role for repression of insulin-like growth factor binding protein 3. *Mol Cell Biol.* 2004; 24: 7275-7283.
- 32 Fonsatti E, Del Vecchio L, Altomonte M, Sigalotti L, Nicotra MR, Coral S, Natali PG, Maio M Endoglin: An accessory component of the TGF-beta-binding receptor-complex with diagnostic, prognostic, and bioimmunotherapeutic potential in human malignancies. *J Cell Physiol.* 2001; 188: 1-7.
- 33 Fonsatti E, Maio M. Highlights on endoglin (CD 105) : from basic findings towards clinical applications in human cancer. *J Transl Med* 2004 ; 2 : 18.
- 34 Moustakas A, Pardali K, Gaal A, Heldin CH. Mechanisms of TGF-beta signalling in regulation of cell growth and differentiation. *Immunol Lett* 2002; 82: 85-91.
- 35 Jonson T, Albrechtsson E, Axelson J, Heidenblad M, Gorunova L, Johansson B, Hoglund M. Altered expression of TGFB receptors and mitogenic effects of TGFB in pancreatic carcinomas. *Int J Oncol* 2001; 19: 71-81.

- 36 Wallenius V, Hisaoka M, Helou K, Levan G, Mandahl N, Meis-Kindblom JM, Kindblom LG, Jansson JO. Overexpression of the hepatocyte growth factor (HGF) receptor (Met) and presence of a truncated and activated intracellular HGF receptor fragment in locally aggressive/malignant human musculoskeletal tumors. *Am J Pathol* 2000 ; 156 : 821-829.
- 37 Danilkovitch-Miagkova A., Zbar B. Dysregulation of Met receptor tyrosine kinase activity in invasive tumors. *J Clin Invest* 2002 ; 109 : 863-867.
- 38 Maulik G, Shrikhande A, Kijima T, Ma PC, Morrison PT, Salgia R. Role of the hepatocyte growth factor receptor, C-MET, in oncogenesis and potential for therapeutic inhibition. *Cytokine Growth Factor Rev* 2002; 13: 41-59.
- 39 Ferracini R, Di Renzo MF, Scotlandi K, Baldini N, Olivero M, Lollini P, Cremona O, Campanacci M, Comoglio PM. The Met/HGF receptor is over-expressed in human osteosarcomas and is activated by either a paracrine or an autocrine circuit. *Oncogene* 1995 ; 10 : 739-749.
- 40 Pollock RE. Molecular determinants of soft tissue proliferation. *Semin Surg Oncol* 1994 ; 10 : 315-322.
- 41 Kuhnen C, Muehlberger T, Honsel M, Tolnay E, Steinau H, Müller K. Impact of C-MET expression on angiogenesis in soft tissue sarcomas : correlation to microvessel density. *J Cancer Res Clin Oncol* 2003 ; 129 : 415-422.

- 42 Jeffers M, Rong S, Woude GF. Hepatocyte growth factor/scatter factor-Met signaling in tumorigenicity and invasion/metastasis. *J Mol Med* 1996 ; 74 : 505-513.
- 43 Tsukinoki K, Yasuda M, Mori Y, Asano S, Naito H, Ota Y, Osamura Watanabe Y. Hepatocyte growth factor and C-MET immunoreactivity are associated with metastasis in high grade salivary gland carcinoma. *Oncol Rep.* 2004; 12: 1017-1021.
- 44 Kawano R, Ohshima K, Karube K, Yamaguchi T, Kohno S, Suzumiy, Kisuchi M, Tamura K. Prognostic significance of hepatocyte growth factor and C-MET expression in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Br J Haematol* 2004; 127: 305-307.
- 45 Blume-Jensen P, Hunter T. Oncogenic kinase signalling. *Nature* 2001 ; 411 : 355-365.
- 46 Yamayoshi T, Nagayasu T, Matsumoto K, Abo T, Hishikawa Y, Koji. Expression of keratinocyte growth factor/fibroblast growth factor-7 and its receptor in human lung cancer: correlation with tumour proliferative activity and patient prognosis. *J Pathol.* 2004; 204: 110-118.
- 47 Tamiya S, Ueki T, Tsuneyoshi M. Expressions of basic fibroblast growth factor and fibroblast growth factor receptor mRNA in soft tissue tumors by in situ hybridisation. *Mod Pathol.* 1998; 11: 533-536.

- 48 Alberti L, Carniti C, Miranda C, Roccatto E, Pierotti M. RET and NTRK1 proto-oncogenes in human diseases. *J Cell Physiol* 2003 ; 195 : 168-186.
- 49 Kaplan DR, Miller FD. Neurotrophin signal transduction in the nervous system. *Curr Opin Neurobiol* 2000; 10: 381-391.
- 50 Dolle L, Adriaenssens E, El Yazidi-Belkoura I, Le Bourhis X, Nurcor V, Hondermarck H. Nerve growth factor receptors and signaling in breast cancer. *Curr Cancer Drug Targets* 2004; 4: 463-470.
- 51 Astolfi A, Nanni P, Landuzzi L, Ricci C, Nicoletti G, Rossi I, Lollini P, Giovanni C. An anti-apoptotic role for NGF receptors in human rhabdomyosarcoma. *Eur J Cancer* 2001 ; 37: 1719-1725.
- 52 Fanburg-Smith JC, Miettinen M. Low-affinity nerve growth factor receptor (p75) in dermatofibrosarcoma protuberans and other nonneural tumors: a study of 1,150 tumors and fetal and adult normal tissues. *Hum Pathol* 2001; 32: 976-983.
- 53 Perosio PM, Brooks JJ. Expression of nerve growth factor receptor in paraffin-embedded soft tissue tumors. *Am J Pathol* 1988; 132: 152-160.
- 54 Airaksinen MS, Titievsky A, Saarma M. GDNF family neurotrophic factor signalling: Four masters, one servant ? *Mol Cell Neurosci* 1999; 13: 313-325.

- 55 Hsu SM, Raine L, Fanger H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques : a comparison between ABC and unlabelled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem* 1981; 29 : 577-580.
- 56 Kaplan EL, Meier P. Nonparametric estimation from incomplete observations. *J Am Stat Assoc* 1958 ; 53: 457-481.
- 57 Cox DR. Regression models and life tables (with discussion). *J R Stat Soc* 1972; 34: 187-220.
- 58 Fletcher JA. Role of KIT and Platelet-Derived Growth Factor Receptors as oncoproteins. *Semin Oncol* 2004 ; 31 (Suppl 6): 4-11.
- 59 Reubi JC, Körner M, Waser B, Mazzucchelli L, Guillou L. High expression of peptide receptors as a novel target in gastrointestinal stromal tumours. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2004 ; 31 : 803-810.
- 60 Miettinen M, Kopczynski J, Makhlof HR, Sarlomo-Rikala M, Gyorffy H, Burke A, Sobin LH, Lasota J. Gastrointestinal stromal tumors, intramural leiomyomas, and leiomyosarcomas in the duodenum: A clinicopathologic, immunohistochemical, and molecular genetic study of 167 cases. *Am J Surg Pathol* 2003; 27: 625-641.

61 Miettinen M, Sobin LH, Sarlomo-Rikala M. Immunohistochemical spectrum of GISTs at different sites and their differential diagnosis with a reference to CD117 (KIT). *Mod Pathol* 2000; 13: 1134-1142.

62 Rudolph P, Gloeckner K, Parwaresch R, Harms D, Schmidt D. Immunophenotype, proliferation, DNA ploidy, and biological behavior of gastrointestinal stromal tumors: a multivariate clinicopathologic study. *Hum Pathol* 1998; 29: 791-800.

## Liste des abréviations utilisées dans le texte

ABC : avidine biotine complexe  
CD105 : endogline  
CD117 : anticorps anti-protéine KIT  
C-KIT : proto-oncogène C-KIT  
C-MET : proto-oncogène C-MET (hepatocyte growth factor/scatter factor receptor)  
DFS : disease-free survival  
DSS : disease-specific survival  
EDTA : acide éthylène diamine trétraacétique  
EGF : epidermal growth factor  
FGF : fibroblast growth factor  
FGFr : fibroblast growth factor receptor  
FLT3 : FMS-like tyrosine kinase 3  
GDNF : glial-cell line derived neurotrophic factor  
GIST : gastrointestinal stromal tumor  
HGF/SF : hepatocyte growth factor/scatter factor  
IGF-1r : insulin-like growth factor-1 receptor  
KIT : protéine KIT  
M-CSF1r : macrophage colony stimulating factor 1  
MEN2A : néoplasie endocrinienne multiple, type 2A  
MEN2B : néoplasie endocrinienne multiple, type 2B  
MET : protéine MET  
NF1 : neurofibromatose de type 1  
NF2 : neurofibromatose de type 2  
NGF : nerve growth factor  
NGFr (gp75)/P75NTR : neurotrophin receptor p75  
NSE : neurone specific enolase  
PDGFRA : platelet derived growth factor, alpha chain  
PGP-9-5 : protein gene product 9.5  
RET : gène RET  
RET : oncoprotéine RET  
SCF : stem cell factor  
TGF $\beta$  : transforming growth factor beta  
TGF $\beta$ r (type 1) : transforming growth factor beta receptor, type 1  
TNF : tumor necrosis factor