

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



Université Djillali Liabes Sidi Bel Abbès

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biologie

Thèse

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

Discipline : Biologie

Option : Biologie de la cellule normale et pathologique

THEME

**Impact du Dérèglement des Hormones Gastro-intestinales
Cholecystokinine et Gastrine et le Statut de leurs Récepteurs
Couplés aux Protéines G dans la Carcinogénèse du Cancer du
Pancréas Exocrine**

Présentée par : **SELLAM Ferièl**

Le: 24/05/2015

Devant le jury composé de :

Présidente : MOULESSEHOUL. S

Examineur : TOU. A

Examineur : SAHRAOUI.T

Examineur : EL KEBIR. FZ

Directeur de thèse : KHALED. M.B

Co-directeur de thèse : HARIR .N

Professeur UDL Sidi Bel Abbès

Professeur UDL Sidi Bel Abbès

Professeur Université d'Oran

Professeur Université d'Oran

Professeur UDL Sidi Bel Abbès

MCA UDL Sidi Bel Abbès

Année universitaire : 2015-2016

TABLE DES MATIERES

Remerciements	II
Résumé.....	III
Abstract (anglais)	IV
Table des Matières.....	V
Liste des Tableaux et Figures.....	VI
Liste des Abbreviations et Acronymes.....	08
Etude théorique	
Introduction.....	10
Chapitre 1: Pancréas Normal et Pathologique	
1.1 Anatomie et histologie du pancréas.....	10
1.1.1 Pancréas exocrine	11
1.1.1.1 Facteurs hormonaux stimulants	13
1.1.1.2 Facteurs hormonaux inhibiteurs.....	13
1.2 Cancer du pancréas.....	13
1.2.1 Différents Types du Cancer Pancréatique.....	14
1.2.1.1 Cancer du Pancréas Exocrine.....	14
a. Adénocarcinome Pancréatique.....	16
1.2.2 Manifestations cliniques.....	17
1.2.3 Incidence du cancer pancréatique dans le monde.....	18
1.2.3.1 Incidence du cancer pancréatique en Algérie.....	19
1.2.4 Diagnostique moléculaire et marqueurs tumoraux	20
1.2.5 Facteurs de risques et altérations génétique.....	20
1.2.5.1 Alcool et Tabac	23
1.2.5.2 Exposition au DDT.....	23
1.2.5.3 Cholecystectomie.....	
Chapitre 2: Hormones Gastro-intestinales	
2.1 Cholecystokinine	24
2.2 Gastrine.....	26
2.3 Les Récepteurs des Hormones Gastro-intestinales.....	28
2.3.1 Les Récepteurs de la Cholecystokinine	30
2.3.1.1 Le récepteur CCK2/gastrine	34
a. Localisation Génétique et structure proteique du CCK2R/gastrine R.....	34
b. Transduction du signal du CCK2R /Gastrine-R.....	34
-La voie de la phospholipase C.....	34
-La voie des MAPKinases	36
-La voie de la phosphatidylinositol 3-kinase.....	37
-La voie JAK/STAT.....	37
2.3.1.2 Expression du CCK2-R dans les cancers pancréatiques.....	39
Etude pratique	
Chapitre 3 : Etudes épidémiologique et expérimental	
3.1 Objectif du travail.....	40
3.2 Patients et méthodes	41
3.2.1 Etude épidémiologique.....	41
3.2.1.1 Analyse statistique.....	42
3.2.2 Etude Expérimentale.....	42
3.2.2.1 Protocole Immunohistochimique.....	43
3.2.2.2 Évaluation morphométrique.....	44
Chapitre 4 : Résultats	
4.1 Présentation de l'article 1	45
4.2 Présentation de l'article 2	54
4.3 Présentation de l'article 3	64
4.4 Présentation de l'article 4	84
Chapitre 5 : Discussion	
Discussion	97
Chapitre 6 : Conclusion	
Conclusion.....	109
References.....	112

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier le directeur de cette thèse, Mr Meghit Boumediene KHALED, et la co-directrice de thèse Mme Noria HRIR de m'avoir fait confiance et de m'avoir guidé, encouragé, et bien conseillé tout en me laissant une grande liberté et en me faisant l'honneur de me déléguer plusieurs responsabilités dont j'espère avoir été à la hauteur.

Mes remerciements vont également à monsieur le chef de service d'anatomo-pathologie du CHU de SBA Mr Abdelnacer TOU pour la gentillesse et la patience qu'il a manifestées à mon égard durant cette thèse, pour tous ses conseils, et aussi pour l'hospitalité dont il a fait preuve envers moi lors du stage que j'ai effectués dans son groupe, et aussi pour m'avoir fait l'honneur de participer au Jury de soutenance.

Je remercie aussi les équipes de service de pathologie de l'HMRUO et du service de chirurgie du CHU de Tlemcen pour leurs professionnalismes et leurs hospitalités.

Je remercie tous ceux sans qui cette thèse ne serait pas ce qu'elle est : aussi bien par les discussions que j'ai eu la chance d'avoir avec eux, leurs suggestions ou contributions. Je pense ici en particulier à Mme Soraya MOULESSEHOUL qui de plus m'a fait l'honneur de présider le Jury de cette thèse, Mr Tewfik SAHRAOUI et Mme Fatima Zohra EL KEBIR d'avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse et aussi pour leur participation au Jury. Ils ont également contribué par leurs nombreuses remarques et suggestions à améliorer la qualité de ce mémoire, et je leur en suis très reconnaissante.

Liste des acronymes

CCK : cholecystokinine
CCK-2 /CCKB: cholecystokinine 2
CCK-1 /CCKA: cholecystokinine 1
CCK-2R : recepteur cholecystokinine 2
CCK-2R/gastrine-R: recepteur cholecystokinine 2/gastrine
CCK-1R /CCK-AR: recepteur cholecystokinine 2
RCCK2i4sv : recpteur cholecystokinine 2 intron 4 containing splice variant
AMP : Adénosine monophosphate
PDAC : Pancreatic ductal adenocarcinoma
PanIN : néoplasie intraépithéliale pancréatique
Ca²⁺ : Calcium
CA : Carbohydrate Antigen
ACE : Antigène carcino-embryonnaire
DUPAN 2 : murine monoclonal antibody
ADN : Acide désoxyribonucléique
LOH : loss of heterozygosity
HAP : hydrocarbures aromatiques polycycliques
ROS : Reactive Oxygen Species
NF-Kb : facteur nucléaire kappa B
COX2 : cyclo-oxygénase-2
ADH : alcool déshydrogénases
DDT : dichlorodiphényltrichloroéthane
AA : acides aminés
PiP2 : biphosphates
PLC : phospholipase C
PLC β : phospholipase C β
PLC γ 1 : phospholipase C γ 1
IP3 : inositols triphosphates
DAG : diacylglycérol
PKC : protéines kinase C
PLA2 : phospholipase A2
EGF : epidermal growth factor
STAT: Signal Transducers and Activators of Transcription
RCPG: récepteurs couplé a la protéine G
OMS : Organisation mondiale de la Santé
CHU : Centre hospitalo-universitaire
TNM : Tumor Node Metastasis
IR : immuno-reactivité
SEM : Standard Error of the Mean
TSP : Les tumeurs pseudo papillaires solide
T1 : Tumor 1
T2 : Tumor 2
T3 : Tumor 3
T4 : Tumor 4
N1 : Node 1
N2 : Node 2
M1 : Metastasis 1
PCR : Polymerase chain reaction

RT-PCR : Real Time Polymerase chain reaction
 MTC : medullary thyroid carcinoma
 RES : réticuloendothélial system
 EEAG : Ethyl ester d'acide gras
 CYP2E1 : Cytochrome P450 Famille-2 Sous-famille-E polypeptide-1
 NF-Kb: nuclear factor-kappa B
 KRAS: Kirsten rat sarcoma
 P16: protein 16
 DPC4: Deleted in Pancreatic Cancer 4
 P53: Protein 53
 ECL: Enterochromaffin-like
 HB-EGFR: heparin-binding epidermal growth factor
 TGF- α : Transforming growth factor alpha
 Reg1 α : regenerating islet-derived 1 alpha
 ADNc: Acide désoxyribonucléique complémentaire
 AGS: atypical glandular cells
 ARNm: acide ribonucléique messenger
 ICL3: trichlorure d'iode
 IUPHAR : l'Union Internationale de Pharmacologie
 SH2 : sulfure d'hydrogène
 Y438 : amino acid residue Y438
 MAPK : Mitogen-activated protein kinases
 ERK : Extracellular signal-regulated kinases
 p38MAPK: Protein 38 Mitogen-activated protein kinases
 RAF: Rapidly Accelerated Fibrosarcoma
 RAS: Rat Sarcoma
 GRB2: Growth factor receptor-bound protein 2
 SOS: Son of Sevenless
 Src: Sarcoma
 Shc: Src Homology C-terminal
 TFF1: Trefoil Factor Family 1
 IRS-1 Anti-Insulin Receptor Substrate-1
 PKB: Protein kinase B
 PI3kinase : Phosphoinositide 3-kinase
 JAK: Janus kinase
 TYK2: Tyrosine kinase 2
 NPXXY: X represents any amino acid
 TM7: transmembran domain 7
 Elas: Elastase
 IKB: Inhibitor kappa beta
 GIST: Tumeurs stromales gastro-intestinales
 H&E: hématoxyline et éosine
 IHC : Immunohistochimie
 PBS : Phosphatase Buffer Saline
 HRP : Horseradish Peroxidase
 DAB : diaminobenzidine
 TSP : tumeur solide pseudopapillaires
 P125FAK: Protein 125 Focal adhesion kinase
 IRM: Imagerie par résonance magnétique
 RES : reticuloendothelial system

Liste des tableaux et figures

I. Liste des tableaux

Tableau 1.1 : Différents types de cancer pancréatique exocrine	15
--	----

II. Liste des figures

Figure 1.1 : Anatomie générale du Pancréas	12
Figure 1.2 : Développement de la Néoplasie Intra-épithélial du Pancréas	21
Figure 1.3 : Phases de la sécrétion pancréatique	25
Figure 2.1 : Mécanismes chargés de contrôler la libération de cholécystokinine a partir du duodénum	27
Figure 2.2: Glande gastrique à sécrétion acide.....	29
Figure 2.3 : Récepteurs de la cellule acineuse pancréatique et régulation de la sécrétion par les récepteurs	31
Figure 2.4: Représentation schématique du récepteur CCK2/gastrine humain avec sa séquence d'acide aminé....	33
Figure 2.5: Localisation génétique des récepteurs de la cholécystokinine ; le CCK1-R et le CCK2-R/gastrine-R.....	35
Figure 2.6: Représentation schématique de la voie de signalisation du récepteur CCK2/gastrine	38

Résumé

Contexte : De récentes études ont démontré que la cholécystectomie peut augmenter le risque de développer un cancer pancréatique ; vu que l'ablation de la vésicule biliaire pourrait dangereusement déréguler l'équilibre du cycle des deux hormones gastro-intestinales cholecystokinine et gastrine qui agissent comme un facteur de croissance sur les cellules cancéreuses pancréatiques. Nous avons rapporté récemment dans une étude épidémiologique régionale que les jeunes adultes en Algérie sont de plus en plus touchés par cette pathologie et sont souvent diagnostiqués à des stades très avancés.

Objectif : A cet effet nous nous sommes intéressés à étudier le profil épidémiologique et histo-pronostique du cancer pancréatique dans l'ouest algérien durant une période de 8 ans. De plus nous avons jugé utile d'analyser le rôle des hormones gastro-intestinales ; cholecystokinine et gastrine ainsi que le statut de leurs récepteurs CCK2-R/gastrine-R couplé aux protéines G, dans le cancer pancréatique en association avec d'autres facteurs de risques qui peuvent contribuer au développement de ce type de cancer. Pour cette fin, nous avons réalisé une étude comparative dans laquelle nous avons examiné des tissus humains provenant de pancréas exocrines cancéreux et d'autres provenant de pancréas exocrines sains et nous avons analysé l'expression et l'immuno-distribution des récepteurs CCK2/gastrine dans les cellules pancréatiques normales et pathologiques.

Résultats : 160 cas, de cancer pancréatique, ont été enregistrés dans les trois régions étudiées de l'ouest algérien avec un âge moyen de 62,2 ans et un sex-ratio de 1,65. Notre étude a démontré encore une fois que la tranche d'âge la plus touchée par le cancer pancréatique était (61-80 ans). Le tabagisme et l'alcoolisme chronique étaient parmi les facteurs de risque principaux rapportés par nos résultats. Dans 92% des cas, la tumeur était située à la tête du pancréas avec une prédominance du type histologique adénocarcinomes bien différenciés (43.1%). 35,63% était le taux non négligeable de patients ayant subi une cholécystectomie et ont été diagnostiqués avec un cancer pancréatique après une durée moyenne de 5,23 ans. L'analyse immunohistochimique a révélé que les récepteurs CCK-2/gastrine étaient exprimés au sein des cellules pancréatiques normales et malignes sauf que les niveaux d'immunoréactivité et l'intensité de l'immunocoloration étaient différents dans les deux types de cellules. Les récepteurs CCK-2/gastrine étaient fortement exprimés dans la zone cytoplasmique et/ou membranaire des cellules cancéreuses. 40% des échantillons avaient une immunoréactivité (IR) modérée (+++) et 60% avaient une forte IR (+++). L'immunocoloration était ainsi très faible dans les cellules normales mais très intense dans les cellules cancéreuses d'une coloration marron foncé. Toutefois, dans les tissus pancréatiques sains, l'immunoréactivité avec les CCK2/gastrine-R était plutôt faible ; 80% des échantillons avait une très faible IR (+) ; et 20% avaient une faible IR (++). L'immunocoloration était moins intense que celle des tissus cancéreux, car nous avons noté une coloration brune claire de quelques cellules pancréatiques normales. Concernant l'analyse statistique, nous avons fourni un graphique à barres et un SEM (Test de normalité) pour mieux illustrer la différence entre les tissus normaux et cancéreux. L'étude comparative des deux tissus par le Test *t* de Student, a révélé que nos variables suivaient une distribution normale avec une valeur de $p < 0,0001$ significative. Ainsi nous avons conclu que l'IR était significativement plus élevée dans les tissus cancéreux par rapport aux tissus sains. Concernant la rare tumeur pancréatique solide pseudopapillaire ; notre analyse immunohistochimique a révélé que les cellules tumorales étaient positives aux récepteurs CCK-2/gastrine qui étaient fortement exprimés au sein de la région cytoplasmique des cellules, et qui avaient une forte immunoréactivité (+++). L'immunocoloration était aussi très intense de coloration marron foncé des cellules malignes.

Conclusion : Ces résultats nous ont mené à conclure que dans le cancer pancréatique, la production endogène accrue et non contrôlée de la CCK et la gastrine, suite à une cholécystectomie, et les actions de ces hormones gastro-intestinales qui stimulent la synthèse de leurs récepteurs couplés aux protéines G tel que les CCK2-R/gastrine-R, peuvent probablement contribuer à une croissance des cellules pancréatiques malignes par un mécanisme autocrine. Concernant les tumeurs pancréatiques solides pseudo-papillaires chez les jeunes femmes, la synthèse de nos résultats, avec ceux d'autres auteurs, nous a permis à conclure que l'œstrogène représente un bon régulateur de l'expression de la CCK, car il diminue la liaison de la CCK avec ses récepteurs couplés à la protéine G. En d'autres termes, si l'œstrogène est faiblement régulé, la liaison de la CCK augmente, et les récepteurs CCK2/gastrine seront surexprimés. Cela permettra à la cholécystokinine de jouer le rôle d'un facteur de croissance pour les cellules tumorales pancréatiques solides pseudo-papillaires.

Mots clés : Cancer du pancréas ; cholecystokinine ; gastrine ; CCKB-R/gastrine-R ; RCPG

Abstract

Background: Recent studies have shown that cholecystectomy may increase the risk of developing pancreatic cancer because gallbladder removal may misregulate the balance of the two gastrointestinal hormones gastrin and cholecystokinin which may act as growth factors for pancreatic cancer cells. We have recently reported in a regional epidemiological study that pancreatic cancer became more common in Algerian young adults and is diagnosed at advanced stages.

Objective: The above hypothesis has sparked our curiosity; therefore we aimed to study the epidemiological and histo-prognostical profile of pancreatic cancer in Western Algerian along a period of 8 years, and to analyze the role of specific gastrointestinal hormones which are: cholecystokinin and gastrin as well as the status of their receptors CCK2-R / gastrin-R coupled to the G protein in pancreatic cancer in combination with other risk factors that may contribute to the development of this kind of cancer. To that end; we conducted an experimental comparative study in which we assessed human exocrine pancreatic cancerous tissues and other normal exocrine pancreatic samples. The expression and immune-distribution of CCK2/gastrin receptors in pancreatic cancer cells and normal cells was evaluated via an immunohistochemical protocol in order to assess the level of immunoreactivity and immuno-intensity of the preselected tissues.

Results: During our studied period (8 years), a total of 160 cases of pancreatic cancer were recorded in three regions of Western Algeria with an average age of 62.2 years and a sex ratio of 1.65. Our study demonstrated that the most affected age group was (61-80 years). Smoking and chronic alcoholism were found as major risk factors. In 92% of cases the tumor was located in the head of the pancreas with a predominance of well-differentiated adenocarcinoma as histological type (43.1%). 35.63% was the significant rate of patients who underwent a cholecystectomy and were diagnosed with pancreatic cancer after an average period of 5.23 years. Our immunohistochemical analysis revealed that CCK-2/gastrin receptors were expressed in both normal and malignant pancreatic cells but with different immunoreactivity levels and different immunostaining intensity i.e CCK-2/gastrin receptors were highly expressed within the cytoplasmic or/and the membrane area of cancerous cells and in islets as well; 40% of the samples had an IR of (+++) and 60% (++++); the immunostaining was as well very intense since we reported a dark brown staining of the malignant cells. However; in normal pancreatic tissues; CCK-2/gastrin receptors immunoreactivity levels were very low; 80% of the samples had an IR of (+); and 20% had (++) and the immunostaining was less intense; we noted a light brown staining of some normal pancreatic cells. Concerning the statistical analysis; we provided a bar graph and SEM to better illustrate the difference between normal and cancer. In the comparison chart between normal and cancerous tissues by Student's t-test, our variables follow a normal distribution (proven by the bell-shaped histogram); and p was <0.0001 which is a significant value; thus we concluded that IR is significantly higher in cancer tissues compared to normal.

Conclusion: According to our results we concluded that uncontrolled endogenous production of CCK and gastrin in pancreatic cancer could be due to cholecystectomy. The actions of these gastrointestinal hormones might stimulate the synthesis of their receptors coupled to the G protein such as CCK2-R / gastrin-R; which may probably contribute to the growth of malignant pancreatic cells by an autocrine mechanism. Concerning pseudo-papillary solid pancreatic tumors in young women ; the synthesis of our results with those of other authors helped us to conclude that estrogen could be a good regulator of the expression of CCK, since it decreases CCK binding with its receptors coupled to the G protein; in other words; if estrogen is weakly regulated; the binding of CCK is increases; and CCK2/gastrin receptors are overexpressed; which leads cholecystokinin to act as a growth factor for solid pancreatic tumor cells pseudo-papillary.

Keywords: Pancreatic cancer; cholecystokinin; gastrin; CCK2-R/gastrin-R; RCPG

Introduction

Le cancer pancréatique est l'un des cancers les plus redoutés dans le monde ; et pour cause ; sa progression asymptomatique ; la difficulté de son diagnostic ; et le peu de marqueurs tumoraux spécifiques à ce type de cancer; font de cette pathologie l'une des plus meurtrières de son époque.

Son pronostic est effroyable ; c'est le 14^{ème} cancer le plus répandu dans le monde avec plus de 216 000 nouveaux cas enregistrés chaque année ; chez l'homme, il vient au quatrième rang des cancers mortels les plus courants, après les cancers du poumon, du côlon et du rectum, et de la prostate. Chez la femme, il représente la cinquième cause de décès, après les cancers du sein, colorectales, poumon et de l'utérus ou des ovaires étant plus fréquents. Il cause environ 213 000 décès chaque année. L'incidence et la mortalité des cancers du pancréas augmentent avec l'âge de façon linéaire à partir de l'âge de 45 ans (OMS, 2014).

En Algérie le cancer pancréatique fait particulièrement peur à cause de son pronostic très sombre, même si selon le registre des tumeurs d'Alger son incidence, est estimée seulement à 2,45 /105 habitant. Le cancer du pancréas touche deux fois plus les hommes que les femmes, généralement après 50 ans. Toutes les tumeurs ne sont pas opérables, et les complications post-opératoires restent importantes. Opérer un cancer du pancréas permet néanmoins d'augmenter les chances de survie à cinq ans (Registre des tumeurs d'Alger, 2012).

Plusieurs études ont cité une multiplicité de facteurs de risques pour ce type de cancer tel que : l'alcool, le tabac, le diabète...etc ; mais ça reste encore insuffisant pour une bonne prévention ; vu que les cancers sont généralement connus pour être multifactoriel ; environ 10% des cancers du pancréas présentent un risque familial, cette fraction étant la plus élevée pour tout site d'organe humain (Lesur & Sauvanet, 1990).

Les gens qui souffrent de pancréatite héréditaire expriment des attaques de pancréatite aiguë dès le jeune âge et font face à un risque de 40% de cancer du pancréas vers l'âge de 70 ans. La plupart des familles possèdent une ou deux mutations de gène cationique trypsinogène (chromosome 7q 33) qui cause la production de protéine mutante. Par conséquent l'activité enzymatique associée est admise comme hypothèse de contribuer à l'auto digestion du pancréas et de la pancréatite. Le cancer du pancréas peut alors être une conséquence de micro environnement inflammatoire prolongé dans le pancréas (OMS, 2014).

De récentes études ont démontré aussi que la cholécystectomie pouvait augmenter le risque de développer un cancer pancréatique ; vu que l'ablation de la vésicule biliaire pourrait dangereusement déréguler l'équilibre du cycle de la cholecystokinine secrété par le duodénum la gastrine ; et leurs récepteurs couplé à la protéine G CCK-2 / gastrine et agir comme un facteur de croissance sur les cellules cancéreuse pancréatique (Zhang *et al.*, 2014).

Une meilleure connaissance de l'histopathologie des facteurs de risques et des voies de signalisation du cancer pancréatique contribuera probablement à un meilleur diagnostic, une meilleure mise au point de marqueurs biologiques et une élaboration d'une thérapie ciblée ; pour cette fin nous avons décidé d'étudier le profile épidémiologique et histopronostique du cancer pancréatique au niveau régional ; ses facteurs de risques ; ainsi que d'établir le rôle des hormones gastro-intestinales ; cholecystokinine et gastrine ainsi que le statut de leurs récepteurs CCK2-R/gastrine-R dans le cancer pancréatique en association avec d'autres facteurs qui peuvent contribuer au développement de la carcinogénèse ce type de cancer

Chapitre 1

Pancréas Normal et Pathologique

1.1 Anatomie et histologie du pancréas

Le pancréas est un organe abdominal profond situé en arrière de l'estomac. Chez l'homme il mesure environ 15cm de long pour une masse allant de 70 à 100g. Il est composé de trois parties distinctes : la tête qui s'insère dans le cadre du duodénum, le corps et la queue qui se prolongent jusqu'au bord de la rate.

Le pancréas est une glande amphicrine dont le tissu exocrine contribue à la fonction digestive libérant le suc pancréatique riche en pro-enzymes alors que le tissu endocrine sécrète dans la circulation systémique des hormones nécessaires aux métabolismes cellulaires et notamment celui des glucides. Les cellules de la portion exocrine sont regroupées en amas pour former des acini. Les enzymes digestives et les ions bicarbonates que ces cellules synthétisent sont sécrétés dans la lumière des acini. Les cellules de la portion endocrine du pancréas forment des îlots de Langerhans qui sécrètent les hormones indispensables au maintien de la glycémie (OMS, 2014).

1.1.1 Pancréas Exocrine

La sécrétion pancréatique exocrine dépend principalement de facteurs hormonaux stimulateurs ou inhibiteurs mais elle est également régulée par le système nerveux parasympathique. La stimulation de la branche vagale du pancréas augmente le taux de sécrétion du suc pancréatique alors que l'activation des fibres sympathiques l'inhibe (Lafitte, 2012).

1.1.1.1 Facteurs hormonaux stimulants

Deux hormones duodénales sont impliquées majoritairement dans cette stimulation: la sécrétine et la cholécystokinine (CCK) (Lafitte, 2012 ; Laverdet, 2013).

La sécrétine est produite par les cellules endocrines S du duodénum et agit en stimulant les cellules épithéliales des canaux excréteurs entraînant ainsi la production de la solution hydro-électrolytique. La libération de sécrétine par le duodénum est déclenchée par l'arrivée du chyme gastrique acide. Les récepteurs de cette hormone, situés sur la membrane basale des cellules épithéliales des canaux, sont des récepteurs couplés à une protéine G et la stimulation de ces récepteurs induit l'activation de l'adénylate cyclase intracellulaire. Ceci entraîne donc l'augmentation de l'AMP (Adénosine monophosphate) cyclique cytosolique permettant la sécrétion d'ions bicarbonates et d'eau dans la lumière pancréatique (Boullu *et al.*, 2009).

La cholécystokinine est, quant à elle, produite par les cellules I du duodénum et agit sur les cellules acineuses entraînant la libération d'enzymes pancréatiques. La libération de la CCK est induite par l'arrivée de lipides et d'acides-aminés dans le duodénum. Les récepteurs membranaires à la CCK situés sur les cellules acineuses sont couplés à un deuxième type de protéine G. La stimulation de ces récepteurs provoque l'augmentation de Ca^{2+} cytosolique permettant l'exocytose des granules contenant les enzymes du suc pancréatique. En plus, de ces deux hormones, la neurotensine est libérée par les cellules endocrines de l'iléon en réponse à l'arrivée de lipides non digérés et cette hormone renforce l'action de la sécrétine et de la cholécystokinine sur la sécrétion du suc pancréatique (Laverdet 2013 ; Boullu *et al.* 2009).

1.1.1.2 Facteurs hormonaux inhibiteurs

La somatostatine est une hormone produite en partie par les cellules endocrines δ du pancréas. Cette hormone inhibe la sécrétion du suc pancréatique de façon indirecte en inhibant la sécrétion de sécrétine et de cholécystokinine par le duodénum. La sécrétion de cette hormone est induite notamment en présence de glucagon, de sécrétine, de CCK ou par une déficience en insuline ce qui permet d'arrêter le processus de digestion (Boullu *et al.*, 2009).

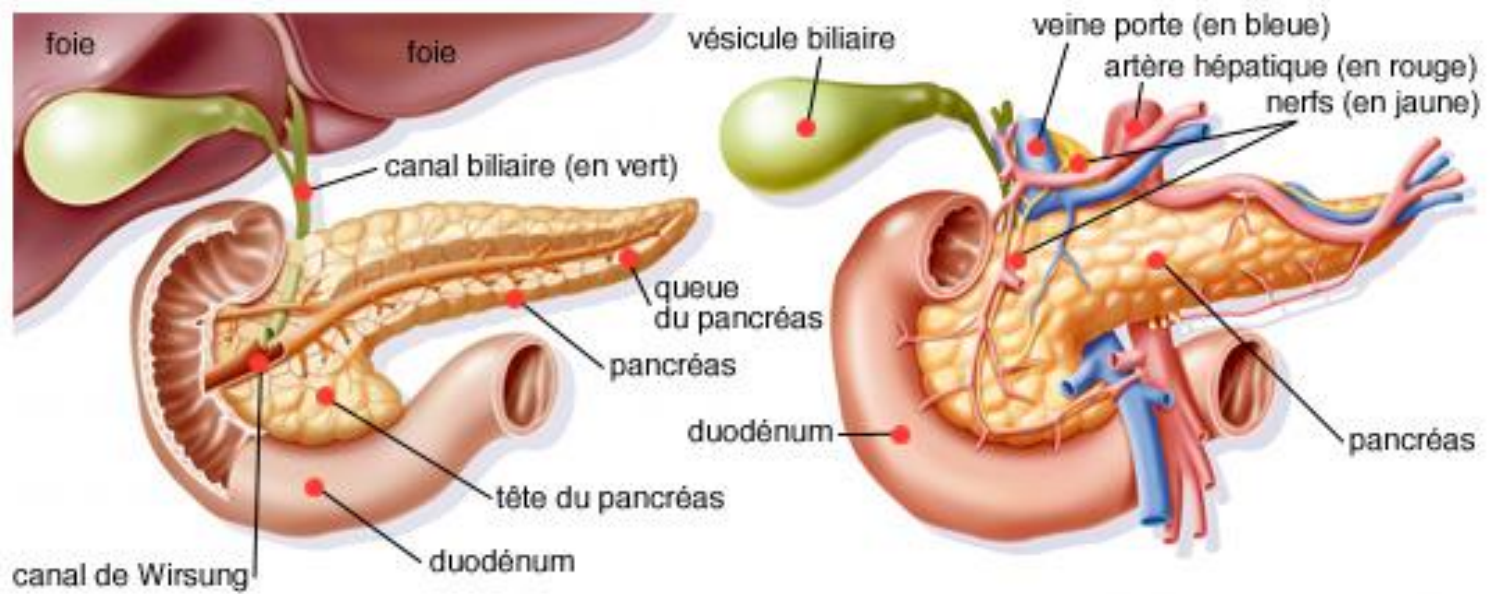


Figure 1.1 : Anatomie générale du Pancréas ([Arcagy-gineco, 2009](#))

1.2 Cancer du pancréas

1.2.1 Différents Types du Cancer Pancréatique

Il existe plusieurs types de cancer du pancréas, les tumeurs exocrines représentent environ 85% et les tumeurs endocrines environ 15% des cancers.

On distingue les tumeurs endocrines dites fonctionnelles avec des symptômes liés à la sécrétion hormonale tumorale comme les gastrinomes, les glucagonomes ou encore les insulinomes et les tumeurs non-fonctionnelles sans symptôme apparent. Ces tumeurs sont cependant sécrétrices mais sans manifestation clinique évidente et représentent environ 30% des tumeurs endocrines (Boullu *et al.*, 2009).

Le cancer du pancréas exocrine domine la pathologie tumorale du pancréas; c'est la plus fréquente et la plus grave des tumeurs pancréatiques, le cancer du pancréas exocrine est une prolifération maligne développée dans 90% des cas à partir des cellules canalaire (Boullu *et al.*, 2009).

1.2.1.1 Cancer du Pancréas Exocrine

Le premier stade de néoplasie est l'hyperplasie plate entraînant la colonisation de l'épithélium du conduit pancréatique. On estime que plus de la moitié de la population des personnes âgées peuvent présenter une hyperplasie plate. Ceci peut conduire à l'hyperplasie papillaire, la présence de fibroses kystiques du pancréas peuplé avec une structure repliée, qui peut avoir des degrés divers d'anomalies cellulaires et nucléaires (OMS, 2014).

Le vrai carcinome est caractérisé par l'invasion de la paroi du conduit pancréatique et une réaction dysplastique à savoir la réaction inflammatoire à collagène, tumeur qui peut

renfermer moins de 25% de cellules cancéreuses. Les principaux typent histologiques comprennent des adénomes sériques kystiques bénins, les tumeurs de comportement biologique incertain y compris la tumeur kystique mucineuse et la tumeur kystique solide aussi bien que les formes malignes telles que l'adénocarcinome, l'adénocarcinome sérique microkystique et l'adénocarcinome de mucine. Parmi les cancers du pancréas exocrine, la plupart ont un potentiel tumorigène variable à part les cystadénocarcinomes mucineux ou séreux et l'adénocarcinome canalaire pancréatique (PDAC) qui sont très souvent malins et agressifs. Le PDAC est le cancer exocrine le plus fréquent (OMS, 2014).

a. Adénocarcinome Pancréatique

L'adénocarcinome des cellules des canaux est responsable de 90 % des tumeurs pancréatiques. Environ 5 % des adénocarcinomes du pancréas se développent à partir des cellules insulaires et le reste consiste en des cystadénocarcinomes, des carcinomes épidermoïdes et des carcinomes à cellules géantes. Le plus souvent, les tumeurs se logent dans la tête du pancréas, soit dans 70 % des cas, alors que 20 % siègent dans le corps et 10%, dans la queue. L'adénocarcinome canalaire pancréatique évolue dans une cascade progressive des changements cellulaires, morphologiques et architecturaux de l'épithélium canalaire normale par des lésions précancéreuses appelées PanIN (néoplasie intraépithéliale pancréatique). Ces lésions PanIN sont à leur tour associées à des altérations somatiques dans des oncogènes canoniques et des gènes suppresseurs de tumeur (Paré *et al.*, 2005).

Tableau 1.1 : Différents types de cancer pancréatique exocrine (Lafitte, 2012)

	Types de cancer	Symptômes	Localisation des tumeurs	Potentiel tumorigène
E X O C R I N E	Adénocarcinome canalaire	Douleurs abdominales, ictère, anorexie, dépression, altération de l'état général	Ensemble du pancréas	Très souvent malignes et métastatiques
	Cystadénocarcinome mucineux ou séreux	Douleurs abdominales et dorsales, vomissements, diarrhées	Ensemble du pancréas	Très souvent malignes et métastatiques
	Tumeurs acinaires	Douleurs abdominales, jaunisse, perte de poids, anémie, diarrhées	Ensemble du pancréas	Variable
	Tumeurs pseudopapillaires et kystiques	Douleurs abdominales et dorsales, perte de poids	Ensemble du pancréas	Variable
	Tumeur intra-canalaire papillaire et mucineuse (TIPMP)	Douleurs abdominales, nausées, vomissements, perte de poids, jaunisse	Principalement dans la tête du pancréas	Variable
	Carcinome épidermoïde	Douleurs abdominales et dorsales, fatigue, douleurs abdominales, nausées, vomissements	Ensemble du pancréas	Variable
	Pancréatoblastome	Douleurs abdominales, nausées, vomissements	Principalement dans la tête du pancréas	Généralement bénignes

1.2.2 Manifestations cliniques

Le sombre pronostic du cancer pancréatique exocrine s'explique par l'apparition tardive des symptômes, quand la tumeur est déjà très avancée et les métastases ont souvent atteint les ganglions lymphatiques régionaux ainsi que les organes adjacents et éloignés.

Les principaux symptômes du cancer du pancréas sont la douleur, l'ictère et la perte de poids. La perte de poids rapide et progressive est probablement le symptôme le plus courant du cancer du pancréas et n'est pas liée au siège ni à l'étendue de la tumeur. La plupart des patients, jusqu'à 90 %, ressentent de la douleur durant l'évolution de la maladie. La douleur est souvent stable, sourde ou térébrante. Localisée dans l'épigastre, elle irradie dans le dos et s'intensifie le soir. Selon le siège de la tumeur, la douleur peut irradier vers le quadrant supérieur droit ou gauche. Une douleur implacable est due à une extension rétropéritonéale avec invasion du plexus nerveux autour du tronc coeliaque. Les autres symptômes non spécifiques sont le ballonnement, les nausées et les vomissements, le prurit, la faiblesse, la fatigue et la diarrhée (Paré *et al.*, 2005).

1.2.3 Incidence du cancer pancréatique dans le monde

Le cancer du pancréas est une affection grave. C'est la 4ème cause de décès, par cancer, aux Etats Unis. Le diagnostic est, souvent, tardif (80% des cas sont diagnostiqués à un stade, localement évolué ou métastatique). La chirurgie est le, seul, traitement à visée curative, mais n'est possible que pour les stades précoces (<20% des cas), avec une mortalité opératoire de 10%. Le traitement médical et la radiothérapie ont enregistré des progrès, considérables, dans les formes, localement, évoluées et métastatiques (Oukkal. & Bouzid., 2012).

En Europe, le cancer du pancréas présente un taux de survie égale à cinq ans ; le plus faible de tous les cancers : à environ 5 % (De Angelis *et al.* 2014). Le pronostic du cancer du pancréas est tout aussi mauvais dans les autres régions du monde (SEER, 2014 ; Matsuda *et al.*, 2011) et ne s'est pas amélioré au cours du temps.

Les tendances temporelles de l'incidence et donc de la mortalité varient selon les régions du monde. Dans les années 2000, les taux de mortalité observés ont été relativement stables dans de nombreux pays européens, comme aux USA et au Japon, chez les hommes et les femmes (Bosetti *et al.*, 2012). Au Japon cette stabilisation fait suite à une forte augmentation de la mortalité dans les années 1960-1990, une augmentation a été observée également en Espagne et à Singapour. En France, chez l'homme et de façon plus marquée chez la femme, l'incidence du cancer du pancréas est en forte augmentation depuis 1980 alors que l'évolution de la mortalité est quasiment stable chez l'homme et en légère augmentation chez la femme (Binder-Foucard *et al.*, 2012). La différence entre l'évolution de l'incidence et celle de la mortalité est due à l'amélioration des techniques de diagnostics au cours du temps et donc à l'amélioration de l'enregistrement de ce cancer par les registres Français (Ferlay, 2014). Néanmoins, cette différence entre données d'incidence (sous-estimée par les registres) et de mortalité rapportée (parfois surestimée) pour le cancer du pancréas n'est pas une spécificité Française : on la retrouve également dans de nombreux registres européens, parfois même de façon plus marquée, notamment dans les registres nationaux des Pays-Bas et de la Suède (Forman, 2013). En conséquence, l'interprétation des tendances et des différences observées entre les taux d'incidence et de mortalité au sein de populations diverses est particulièrement difficile (Ferlay, 2014).

L'incidence de cette pathologie, est en nette augmentation, est particulièrement élevée en Amérique du Nord et en Europe (11,8 à 12,5 cas pour 100 000 personnes) et plutôt faible en Asie méridionale et orientale et en Afrique (<3,5 cas par 100 000 personnes) (Schotten, 2006).

1.2.3.1 Incidence du cancer pancréatique en Algérie

En Algérie, selon le registre des tumeurs d'Alger, l'incidence est estimée à 3,2/105 habitants, pour les hommes et 1,7/105 habitants, pour les femmes. Ainsi, l'incidence de ce cancer est plus élevée, chez les hommes, que chez les femmes en Algérie avec un sex-ratio = 2 ; le pic d'incidence du cancer du pancréas est à la 7ème décade ; il représente 5% des cancers digestifs (6% chez les hommes et 4% chez les femmes). 2/3 des cas sont diagnostiqués, après 65 ans. Le pronostic du cancer du pancréas est très réservé, avec une très faible survie, à 5 ans, d'environ 3%. Cependant, des études, récentes, ont montré des progrès, en matière de mortalité et de morbidité opératoire et une augmentation, significative, de la survie à 5 ans, après résection à visée curative (21-25%) (Registre des tumeurs d'Alger, 2012 ; Oukkal & Bouzid, 2012 ; SEER, 2014).

Son mauvais pronostic réside dans l'incapacité de diagnostiquer le cancer à un stade précoce.

1.2.4 Diagnostic moléculaire et marqueurs tumoraux

Il est nécessaire de disposer d'outils diagnostiques plus sensibles et d'approfondir la recherche au niveau moléculaire afin d'identifier plus de marqueurs tumoraux et assurer un diagnostic beaucoup plus précoce. Les marqueurs tumoraux sont des substances, présentes chez le sujet sain mais à des taux très faibles, qui sont libérées dans le sang par les cellules tumorales et témoignent donc de leur présence dans l'organisme. Ces molécules sont détectables et dosables par des méthodes analytiques plus ou moins sophistiquées selon leur concentration. Il convient de préciser que cette définition des marqueurs tumoraux diffère de celle des anatomo-pathologistes pour lesquels ce type de marqueurs est détecté au niveau du tissu tumoral proprement dit par l'examen histologique ou cytologique (Wack, 2005).

L'intérêt d'un dosage des marqueurs tumoraux est double, à la fois sur le plan diagnostique dans le cadre d'un bilan initial de patients sans symptôme précis de cancer que sur le plan pronostic, la modification du taux sérique du marqueur permettant souvent de suivre l'évolution du cancer sous traitement. La disparition du marqueur conforte l'hypothèse d'une rémission complète, cependant une remontée ultérieure fait craindre une récurrence. Les marqueurs permettent ainsi de piloter le traitement et incitent à rechercher d'une lésion résiduelle, à la fin de la thérapie, leurs taux restent anormalement élevés, et là il faut chercher une récurrence s'ils s'élèvent à nouveau (Wack, 2005).

En ce qui concerne le cancer du pancréas les marqueurs recherchés sont les suivants:

- Carbohydre Antigen ou CA 19-9 : Il est élevé dans 80% des cas. C'est le marqueur le plus utilisé, surtout lors de la surveillance évolutive. Son élévation a une valeur pronostic.
- Antigène carcino-embryonnaire ou ACE : Cette protéine est présente chez le fœtus et son expression augmente en cas de dédifférenciation cellulaire (en particulier lors de certains cancers). L'ACE est élevé dans 60-70% des cas. Il n'a pas de valeur diagnostique car son dosage est en effet peu sensible et non spécifique, mais il présente un intérêt dans la surveillance.
- DUPAN 2 : élevé dans 94% des cas. Son intérêt est en cours d'évaluation.
- K-ras : oncogène muté dans 80-90% des cancers. Il présente un réel intérêt diagnostique. Cette mutation est recherchée dans le suc pancréatique ou dans le produit de brassage du canal pancréatique (Wack, 2005).

1.2.5 Facteurs de risques et altérations génétiques

La pathogénèse moléculaire de l'adénocarcinome canalaire pancréatique humaine implique l'accumulation temporelle et spatiale des altérations génétiques, influencé sans doute par des expositions environnementales. Les modifications qui se produisent dans les oncogènes canoniques, des gènes suppresseurs de tumeur et des gènes de réparation de l'ADN de discordance, sont en grande partie à cause du LOH (perte d'hétérozygotie), des mutations ponctuelles, la surexpression, et le déséquilibre en protéique (Deramaudt, 2005).

1.2.5.1 Alcool et Tabac

Les principaux facteurs qui déclenchent le cancer du pancréas et active sa pathogénie sont la consommation d'alcool et de tabac à long terme, les HAP (hydrocarbures aromatiques polycycliques) et les hétérocycliques aminés. La consommation d'alcool à long terme conduit à la pancréatite chronique, et la progression de la pancréatite peut conduire à des comorbidités, y compris le syndrome de malabsorption, le diabète et le cancer du pancréas (Go *et al.* 2005).

Au cours de la pancréatite, l'alcool et de ses métabolites provoquent des mécanismes moléculaires/cellulaires similaires qui sont communs à des processus inflammatoires, tels que la production de ROS (Reactive Oxygen Species), NF-kB (facteur nucléaire kappa B), COX2 (cyclo-oxygénase-2), et diverses cytokines, la perte de la fonction de suppression de tumeur et la stimulation de l'expression d'oncogène. L'alcool, en combinaison avec le tabagisme, représente un sérieux facteur de risque pour les cancers gastro-intestinaux, par conséquent ; la consommation d'alcool est classé comme cancérigène pour l'homme (Go *et al.* 2005).

Le pancréas métabolise l'éthanol par le biais de voies oxydative et non oxydatives pour générer des métabolites. Le grand système enzymatique d'oxydation utilise soit ADH (alcool

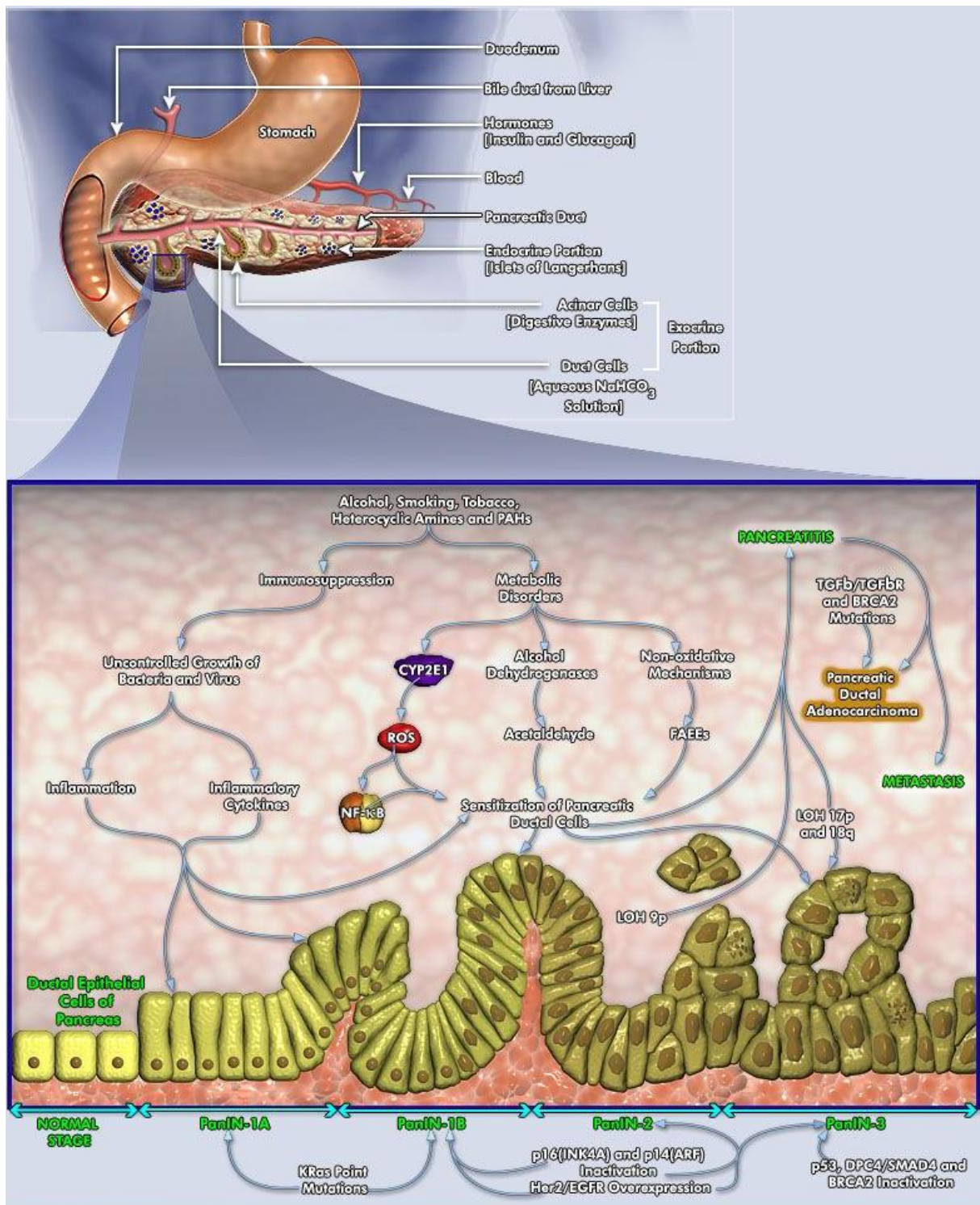


Figure 1.2 : Développement de la Néoplasie Intra-épithélial du Pancréas (Go *et al.*, 2005).

déshydrogénases) ou le système du cytochrome P450 (en particulier CYP2E1 (Cytochrome P450 Famille-2 Sous-famille-E polypeptide-1)), alors que la voie non-oxydative utilise la voie enzymatique EEAG synthase. Les métabolites produites par les deux mécanismes oxydatifs et non-oxydatifs sont nuisibles à la fois pour pancréas exocrine et endocrine. L'acétaldéhyde est connu pour abimer les tissus pancréatiques à travers sa génotoxicité. L'alcool métabolisé par le CYP2E1 résulte dans la production du ROS, qui initie des lésions tissulaire par l'activation du NF-kB et par la transcription accrue des cytokines pro-inflammatoires (Go *et al.* 2005).

1.2.5.2 Exposition au DDT

Une étude récente a montré une augmentation de la fréquence du cancer du pancréas chez les personnes exposées au DDT (dichlorodiphényltrichloroéthane). Des auteurs ont émis l'hypothèse que des anomalies génétiques causé par l'exposition au DDT telles que l'oncogène K-ras et les gènes suppresseurs de tumeurs p16, DPC4 et p53 intervenaient dans la pathogenèse du cancer du pancréas. Quelques chercheurs ont tenté de se servir de la présence de ce type de mutations dans ces gènes pour diagnostiquer le cancer pancréatique ; mais ces tentatives étaient mises en échec à cause de la fréquence élevée de faux marqueurs positifs (Paré, 2005).

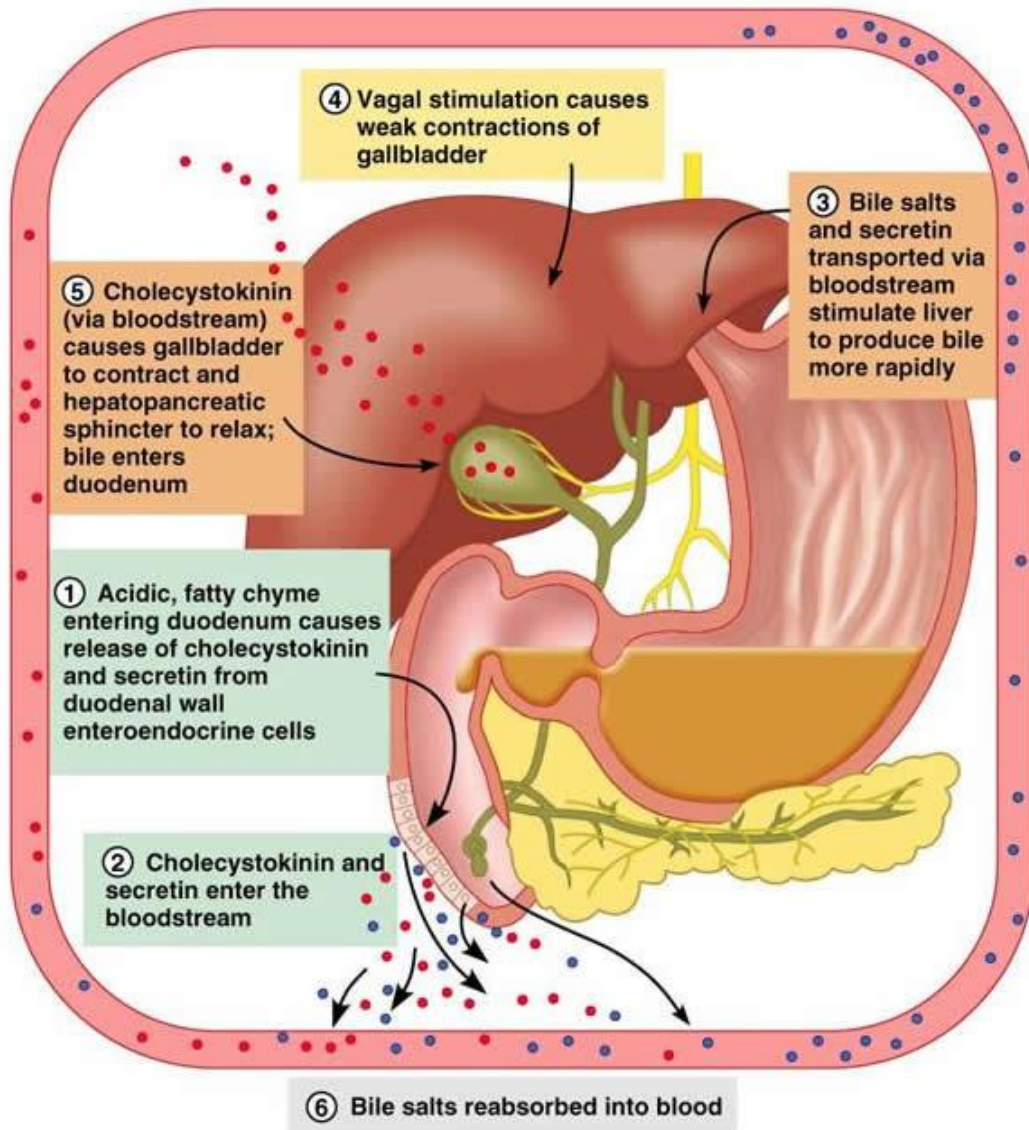


Figure 1.3 : Phases de la sécrétion pancréatique ([Austin community college, 2010](#)).

1.2.5.3 Cholecystectomy

Certaines études ont trouvés que la cholécystectomie pourrait augmenter la sécrétion de la cholécystokinine (CCK) (Haddock *et al.*, 1999) ; une hormone qui a tendance à stimuler la contraction de la vésicule biliaire ; la sécrétion d'enzymes pancréatiques (Rivard *et al.*, 1991) et à avoir un effet atrophique sur les cellules acineuses pancréatiques (Marx *et al.*, 1987). L'effet trophique sur le pancréas dû à l'augmentation de la libération de la CCK suite à une cholécystectomie et la perturbation neurohormonale de la régulation du pancréas, ont été suggérées comme facteurs possibles pour augmenter le risque de développer un cancer du pancréas (Hyvarinen *et al.*, 1987 ; Smith, 1990).

Cette hypothèse a suscité notre curiosité ; par conséquent nous nous sommes intéressés à étudier les facteurs de risques pour le cancer pancréatique, en particulier la cholecystectomy et sa relation avec la CCK dans le développement de ce type de cancer.

Chapitre 2

Hormones Gastro-intestinales

2.1 Cholecystokinine

La cholécystokinine-pancréozymine ; découverte en deux temps, d'abord pour son action sur la contraction de la vésicule biliaire et rattachée à la cholécystokinine par Ivy et Golberg en 1928, puis pour son action sur la sécrétion enzymatique pancréatique, attribuée à la pancréozymine par Harper en 1943, cette hormone n'a vu reconnaître son unité structurale qu'en 1971 par Mutt. La cholécystokinine-pancréozymine est sécrétée par les cellules I localisées dans le duodénum et les premières anses jéjunales. La CCK appartient à la famille de la gastrine car elle possède cinq acides aminés (AA) terminaux identiques ; elle existe sous deux formes moléculaires, l'une dite « régulière » à 33 AA et l'autre « variante » à 39 AA ; le dosage biologique a été complété par la mise au point d'un dosage radio-immunologique (Schlienger , 2015).

La CCK est sécrétée sous l'effet de l'arrivée de peptones, d'acides aminés, d'acides gras à chaîne longue et d'acide chlorhydrique dans la lumière intestinale. L'ingestion alimentaire entraîne une élévation du circulant de CCK chez l'homme. L'écoulement de la bile, la distension jéjunale et la stimulation vagale sont d'autres agents, sans doute physiologiques, susceptibles de stimuler la CCK. Les effets potentiels de la CCK sont multiples. L'action sécrétoire se traduit par une augmentation de la teneur enzymatique des sécrétions pancréatiques et s'exerce en synergie avec l'action de la sécrétine. L'action motrice principale est la stimulation de la contraction de la vésicule biliaire, mais la CCK stimule aussi la motilité gastrique et intestinale et relâche le sphincter du bas-œsophage et le sphincter d'Oddi.

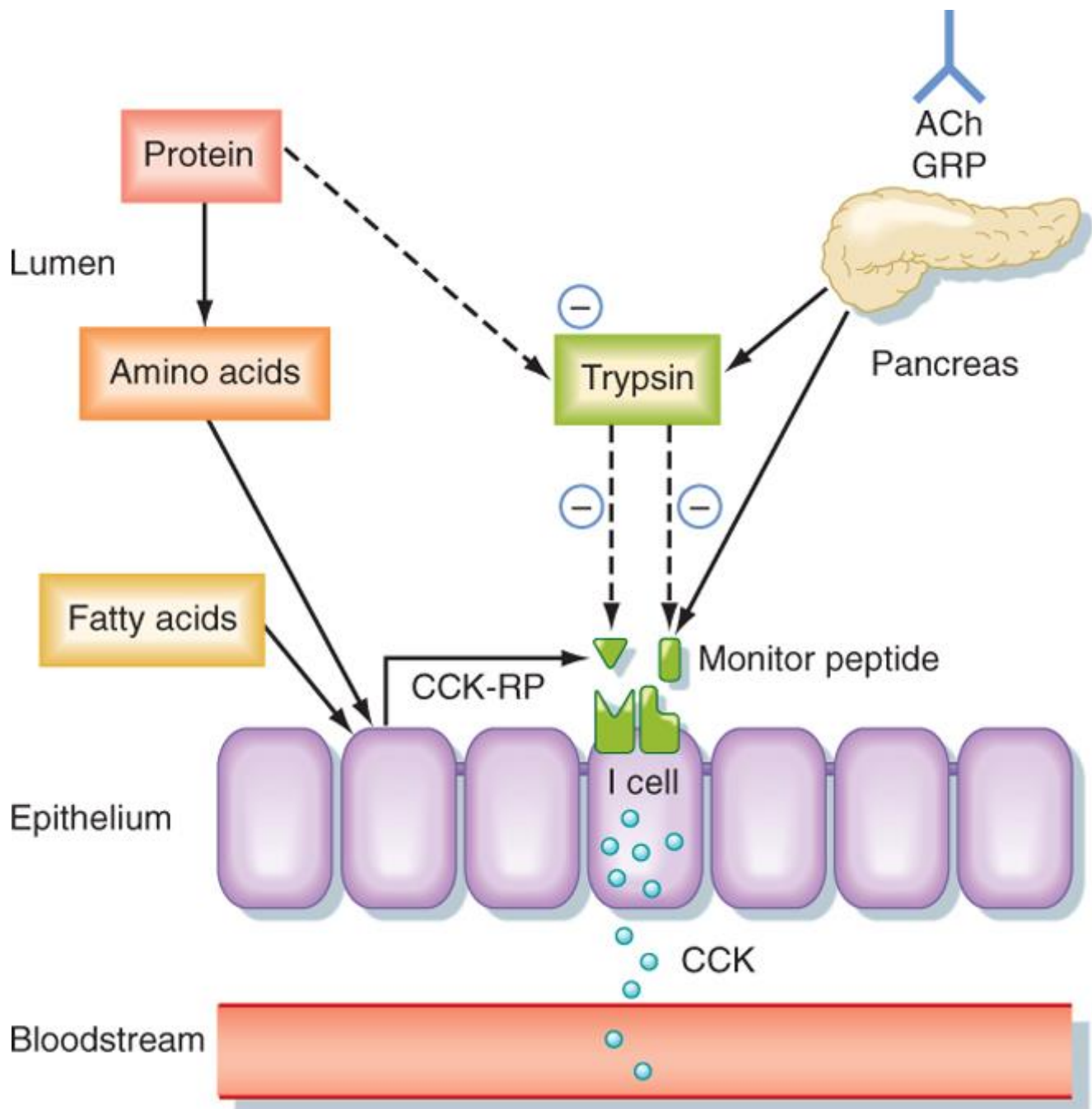


Figure 2.1 : Mécanismes chargés de contrôler la libération de cholécystokinine (CCK) à partir de cellules du duodénum. Ach, l'acétylcholine; CCK-RP, le peptide de libération de CCK-; GRP, le peptide libérant la gastrine. Les flèches pleines représentent les effets stimulants, alors que des flèches en pointillés indiquent l'inhibition (Redrawn, 2006).

Elle possède une action trophique et est considérée comme un régulateur physiologique de la croissance du pancréas. Elle stimule aussi la sécrétion d'insuline et de la calcitonine, et induirait une sensation de satiété (Paré, 2005 ; Schlienger, 2015).

Sa place en pathologie est encore mal précisée. Une hypersécrétion de CCK a été rapportée en cas d'insuffisance pancréatique et dans certains gastrinomes, alors qu'une hyposécrétion de CCK aurait été observée chez des patients présentant une pathologie de l'intestin grêle (Schlienger, 2015).

2.2 Gastrine

Hormone digestive la mieux connue, découverte en 1964 par R. A. Gregory, la gastrine est sécrétée par les cellules G. Authentifiées par leurs caractères ultra-structuraux, celles-ci prédominent dans l'antré gastrique, mais sont également présentes dans le duodénum, les premières anses intestinales et le pancréas (Schlienger, 2015).

La gastrine est un peptide composé de trente-quatre acides aminés (AA). Sa séquence est connue. Les cinq derniers AA comptés à partir du radical carboxyl terminal sont communs avec la cholécystokinine-pancréozymine, et ce fragment possède, quoique atténuées, toutes les actions des deux hormones. En fait, la gastrine présente une grande hétérogénéité moléculaire et plusieurs formes ont été décrites : big gastrine (34 AA), forme circulante principale, little gastrine (17 AA), prédominant dans la muqueuse antrale, mini (13 AA) et big big gastrine retrouvées dans les extraits de tumeurs sécrétant la gastrine (gastrinomes). La big gastrine apparaît comme l'hormone mère de la little gastrine qui possède l'activité biologique maximale. Son taux circulant, déterminé par une méthode radio-immunologique mise au point grâce à la synthèse de gastrine, est de 50 picogrammes par millilitre. Toute stimulation ou injection gastrinique entraîne une puissante sécrétion acide gastrique. Celle-ci inhibe secondairement la sécrétion de gastrine, qui se trouve ainsi autorégulée (Schlienger 2015).

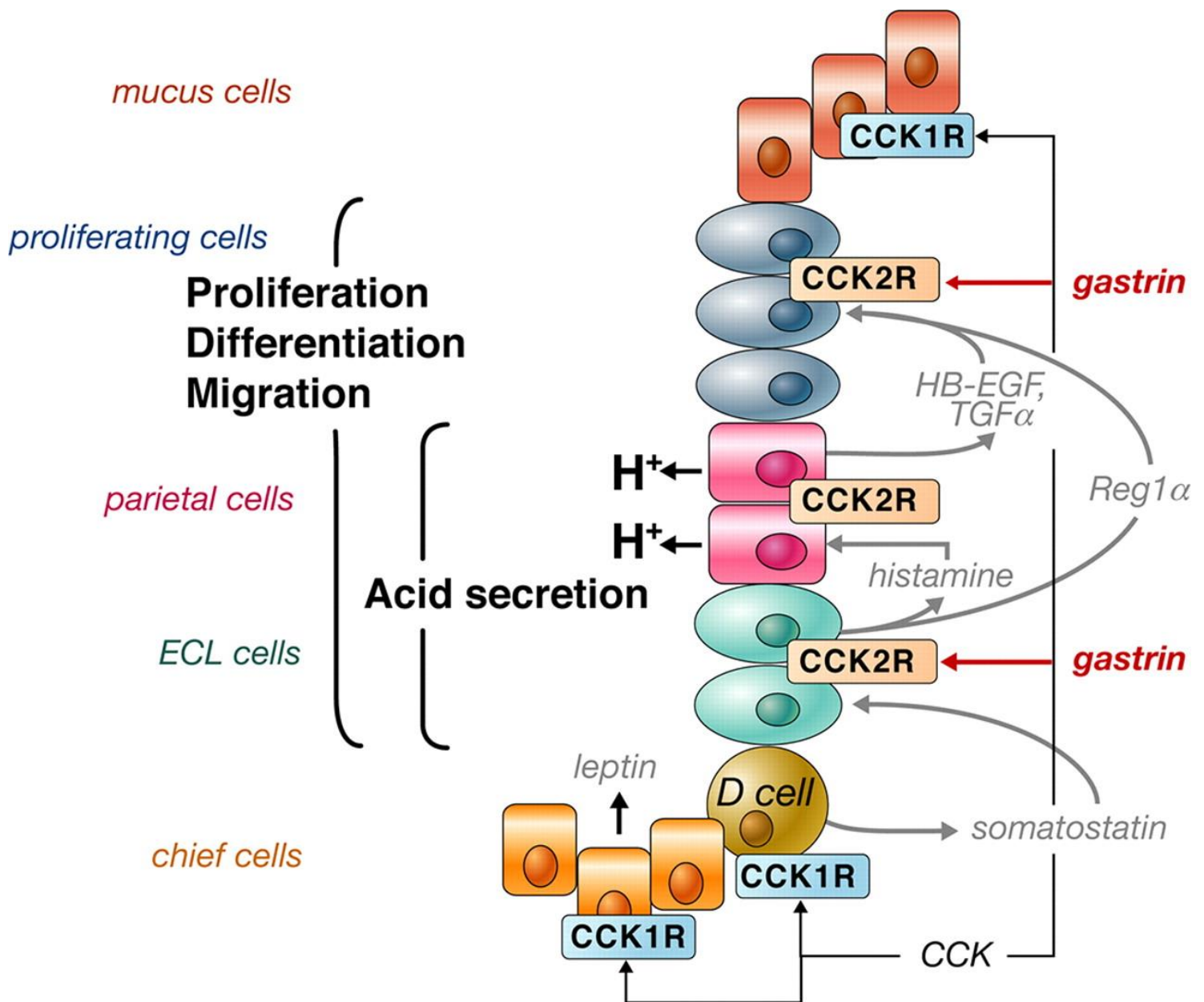


Figure 2.2: Glande gastrique à sécrétion acide ; illustrant les différents types et les sites d'action de la gastrine cellulaires (Dufresne *et al.*, 2006).

La libération physiologique de l'hormone est déclenchée par la prise alimentaire ; elle est soumise à un double contrôle nerveux et chimique. La vue et la prise d'aliments entraînent un réflexe vagal transmis aux cellules G par l'acétylcholine ; l'intensité de la sécrétion de gastrine est corrélée à la teneur en protéines de l'aliment. La distension antrale et la stimulation vagale sont d'autres stimuli de la sécrétion de la gastrine. Le contrôle chimique par simple contact des aliments avec la muqueuse antrale est prouvé par l'augmentation de la gastrinémie observée après introduction des aliments dans un estomac (Schlienger, 2015).

Certaines recherches ont démontré que la gastrine est capable d'induire des effets mitogènes sur des cellules gastrointestinales et pancréatiques normales ou tumorales, par l'intermédiaire d'un récepteur spécifique à sept segments transmembranaires, couplé aux protéines G, le récepteur CCK2 (Vila *et al.* 1999).

2.3 Récepteurs des Hormones Gastro-intestinales

2.3.1 Récepteurs de la Cholecystokinine

Il existe deux principaux types de récepteurs à la CCK (CCK1 ou CCK-A et CCK2 ou CCK-B aussi appelé gastrine), mais plusieurs peptides actifs correspondent à la partie terminale du précurseur préprocholécystokinine (125 a.a.) : CCK- 39, CCK-33, CCK-22, CCK-8 et CCK4. La gastrine est un analogue de la CCK-8, mais est issue d'un gène distinct ; le 17q21. Les récepteurs des cholécystokinines et de la gastrine, CCK1 et CCK2, sont couplés aux protéines G (Landry & Rival, 2014).

La gastrine est produite par les cellules endocrines G présentes dans la région antropyloric et stimule la sécrétion d'acide par l'intermédiaire de la libération d'histamine à

partir des cellules ECL. La gastrine stimule la prolifération et la différenciation des cellules ECL et des cellules pariétales ainsi que leurs migrations soit directement par l'intermédiaire

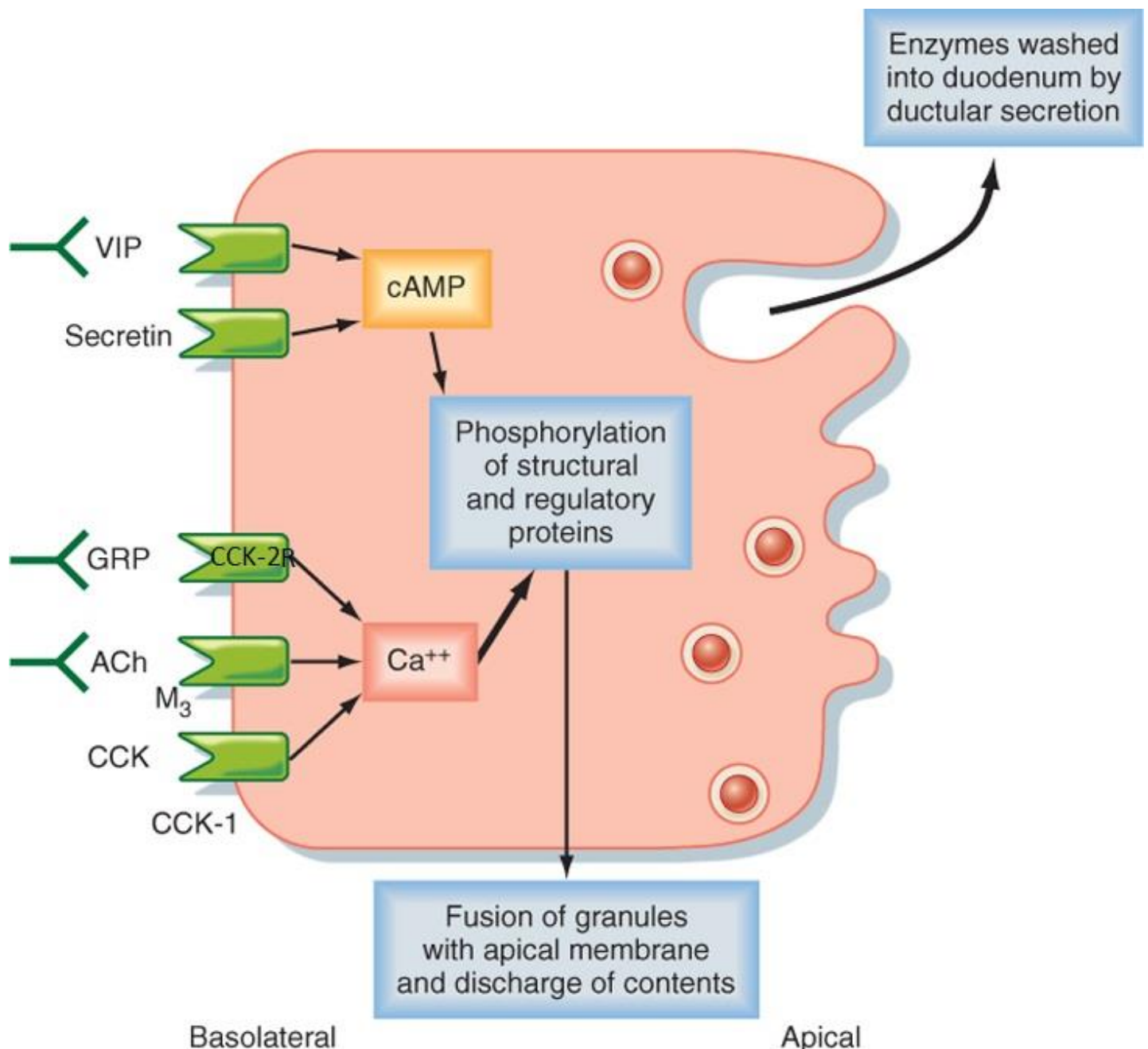


Figure 2.3 : Récepteurs de la cellule acineuse pancréatique et régulation de la sécrétion par le biais des récepteurs d'Ach (l'acétylcholine); de CCK (la cholécystokinine) CCK1-R. CCK2-R/Gastrine-R; de GRP, (peptide libérant de la gastrine; de VIP (polypeptide intestinal vasoactif) (Redrawn, 2006).

de cascades paracrines en aval de la CCK2R/gastrine-R (induction de HB-EGF, TGF- α , et Reg1 α). La CCK agissant sur les CCK1R par le biais des cellules D inhibe les cellules pariétales, les cellules ECL, et les fonctions des cellules produisant de la gastrine ; via la libération de la somatostatine à partir de cellules endocrines D. Les récepteurs de la CCK1 (CCK1R) exprimés sur les cellules principales jouent le rôle de médiateurs de la sécrétion de leptine gastrique (Dufresne *et al.*, 2006).

Le récepteur CCK1 couplé aux parties Gs et Gq est présent surtout en périphérie. La CCK2, majoritaire dans le système nerveux central, est couplé à la Gq et assure aussi la liaison de la gastrine dans l'estomac (-> gastrine). Des ligands, agonistes et antagonistes, sélectifs des deux récepteurs sont synthétisés. Les antagonistes sélectifs CCK1, comme le loxiglumide, ont plusieurs applications potentielles au niveau intestinal. Les antagonistes des récepteurs CCK2 ne passant pas la barrière hémato-encéphalique sont des antiulcéreux potentiels (Christophe *et al.*, 1978).

2.3.1.1 Récepteur CCK2/gastrine

Les récepteurs de la CCK ont été découverts pour la première fois en 1978, par des expériences de liaison d'un analogue de la CCK, la caeruleine radio-marquée sur des cellules acineuses pancréatiques de rat (Innis & Snyder, 1980). Un second type de récepteur avec un profil pharmacologique différent est ensuite découvert dans le cerveau de rat. Dans le cerveau, la gastrine et la pentagastrine se lient avec une affinité de l'ordre du nanomolaire mais dans le pancréas de rat celle-ci est 500 à 2000 fois plus faible (Noble *et al.*, 1993). De par leur localisation, le premier récepteur a été nommé RCCK-A pour Alimentary, et le second RCCK-B pour Brain mais selon les recommandations du comité de l'Union Internationale de Pharmacologie (IUPHAR), le RCCK-A a été renommé RCCK1, et le RCCK-B, RCCK2 (Silvente-Poirot *et al.* 1993).

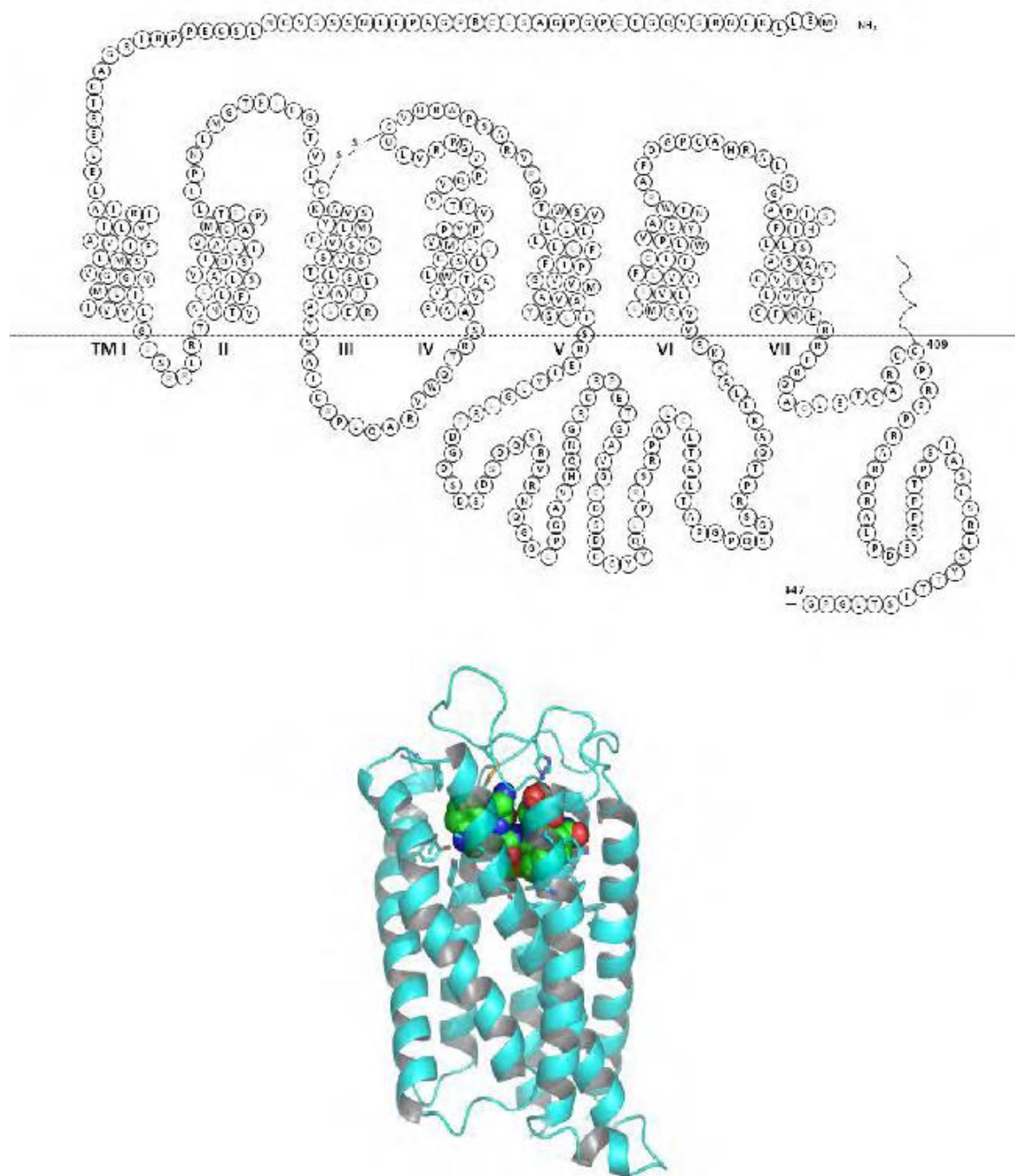


Figure 2.4: Représentation schématique du récepteur CCK2/gastrine humain avec sa séquence d'acide aminé (en haut) ; modèle moléculaire du CCK2-R/gastrine-R avec la CCK-4 dans la poche de liaison (en bas)
(Sanchez et al. 2012).

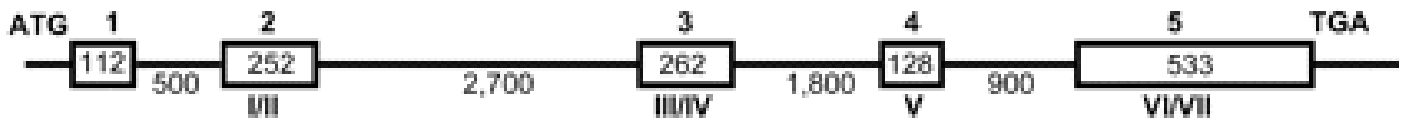
Le RCCK-1 et le RCCK-2 diffèrent par leurs affinités relatives pour les ligands naturels ainsi que par leurs distributions tissulaires. En effet, le RCCK-1 lie la CCK sulfatée avec une affinité 500 à 1 000 fois supérieure à celle de la gastrine, sulfatée ou non, et son expression est majoritairement localisée en périphérie. A l'inverse, le RCCK-2 lie la CCK ou la gastrine avec des affinités similaires et est préférentiellement exprimé au niveau du cerveau (Soll *et al.*, 1984).

Le récepteur de la gastrine fut identifié pour la première fois dans des cellules pariétales canines (Kopin *et al.*, 1992). A l'époque, le récepteur de la CCK localisé dans le cerveau est considéré comme différent de celui de la gastrine, et ce n'est qu'après leurs clonages que les chercheurs réalisent qu'il s'agit d'un même et unique récepteur, le RCCK2 (Wank *et al.*, 1992). La séquence code une protéine de 453 acides aminés, présentant une homologie de 48% avec le RCCK1. Par ailleurs, cet ADNc contient sept segments hydrophobes, correspondant aux caractéristiques des récepteurs à 7 domaines transmembranaires (Lee *et al.*, 1993). L'ADNc du RCCK2 humain est cloné l'année suivante par criblage d'une banque d'ADNc de cerveau, l'ADNc du RCCK2 canin servant de sonde. C'est une protéine de 447 acides aminés, d'une masse moléculaire de 48 kiloDalton (Miyake, 1995; Howatson & Carter, 1985).

a. Localisation Génétique et Structure Protéique du Récepteur CCK2/gastrine

Chez l'homme, le gène codant pour le CCK2R/gastrine-R est composé de cinq exons et quatre introns, et est localisé sur le chromosome 11, au niveau du locus p15,4. En 1995 un premier variant d'épissage est identifié et présente une extrémité N-terminale tronquée et débutant à la méthionine 67 du domaine transmembranaire I sans toutefois voir sa liaison à la CCK et gastrine affectée. Ce variant présente un exon, le 1b, localisé sur l'intron 1 qui se substitue à l'exon 1 présent sur le récepteur sauvage. Ce variant d'épissage est notamment

Chromosome 4, CCK1R



Chromosome 11, CCK2R

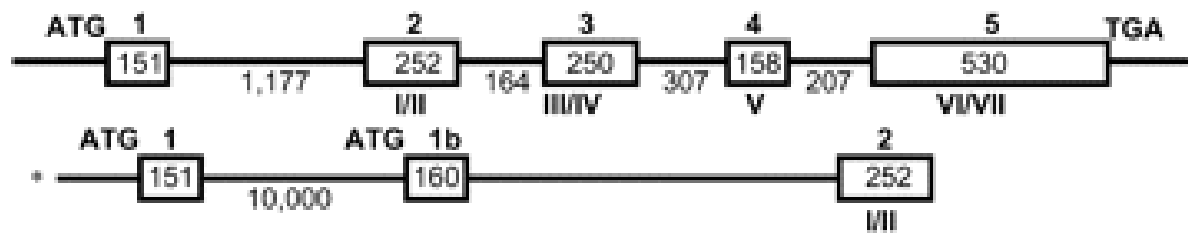


Figure 2.5: Localisation génétique des récepteurs de la cholecystokinine ; le CCK1-R et le CCK2-R/gastrine-R
(Dufresne *et al.*, 2006)

exprimé dans la lignée cellulaire d'adénocarcinome gastrique humain (AGS) (Song *et al.*, 1987).

Un second variant du RCCK2 est alternativement épissé dans la région de l'exon 4, et donne deux ARNm différant par exclusion ou non de cinq acides aminés au niveau de l'ICL3 (Ding *et al.*, 2002 ; Howatson & Carter, 1985).

b. Transduction du signal du CCK2R /Gastrine-R

Le récepteur CCK2 est un récepteur couplé aux protéines Gq qui est impliqué dans de nombreux processus physiologiques et physiopathologiques du fait de son action sur beaucoup de voies de transduction du signal (Arnould *et al.*, 2004) :

- **Voie de la phospholipase C**

Le RCCK2 est couplé à la protéine Gq/11, et l'activation du récepteur active la voie de la phospholipase C. L'activation du RCCK2 conduit à l'hydrolyse rapide des phosphatidyl inositol 4,5-biphosphates (PIP₂) par la phospholipase C (PLC), générant ainsi des inositols triphosphates (IP₃) et du diacylglycérol (DAG). Les isoformes de la PLC activées par le RCCK2 sont principalement la PLC β et la PLC γ 1. Le RCCK2 s'associe avec les domaines SH2 de la PLC γ 1 via Y438 de l'extrémité C-terminale (Arnould *et al.*, 2004).

Les IP₃ sont des messagers secondaires qui stimulent la libération de calcium dans le cytosol, en agissant sur des récepteurs aux IP₃ de la membrane du réticulum endoplasmique. Le DAG active différentes protéines kinase C (PKC) et en particulier les sous-types α -, δ -, ϵ -, et η - de la PKC dans le cas du RCCK2 (Dufresne *et al.*, 2006). Les PKC sont elles mêmes impliqués dans la signalisation des MAPKinase via Raf. Enfin, le RCCK2 pourrait être associé à l'activation de la phospholipase A₂ (PLA₂) (Pommier *et al.*, 2003).

- **Voie des MAPKinases**

Les MAPK sont des sérines/thréonines kinases qui regroupent les ERK1/2, c-jun NH₂-terminal kinases (JNKs), ERK5, et p38MAPK. La cascade de phosphorylation Ras/Raf/ERK

kinases/ERK1/2 conduit à la régulation de la prolifération, la différenciation, la survie ou l'apoptose cellulaire, que ces kinases modulent en activant par phosphorylation des facteurs de transcription. Le complexe Grb2/Sos ou Shc/Grb2/Sos stimule cette cascade aboutissant à la phosphorylation des ERK1/2 après l'activation de Src et Shc par la gastrine via le RCCK2 (Daulhac *et al.*, 1999). Dans le cas du RCCK2 stimulé par la gastrine, l'activation des ERK1/2 conduit à la transcription d'un gène codant pour une protéine, TFF1, impliquée dans la réparation de l'épithélium (Khan *et al.*, 2003).

Dans les cellules épithéliales gastrointestinales, la transactivation du récepteur EGF via le RCCK2 peut être à l'origine de l'activation des ERK1/2. En effet, l'expression et la maturation du proHB-EGF dans ces cellules en réponse à la gastrine, entraîne la libération de HB-EGF. Ce peptide libéré par voie auto- et paracrine induit la phosphorylation de son récepteur (EGFR) et donc l'activation des voies en aval, dont celles des ERK1/2. Par ailleurs, le RCCK2 peut transactiver le récepteur à l'EGF via une voie de signalisation impliquant la famille des Src kinases (Guo *et al.*, 2002 ; Sinclair, 2004). Une autre MAPK, la p38MAPK, est activée par le RCCK2 via un mécanisme impliquant la PKC, le calcium intracellulaire et Src, et joue un rôle central dans la prolifération induite par le RCCK2 (Dehez *et al.*, 2001). A ce jour, la contribution des arrestines dans l'activation des MAPKinases par le récepteur CCK2 n'a pas été étudiée.

- **Voie de la phosphatidylinositol 3-kinase**

L'activation du RCCK2 conduit à la phosphorylation par Src d'une protéine adaptatrice IRS1. Cette protéine IRS-1 via ses acides aminés tyrosines phosphorylés recrute et active la PI3kinase. La PI3kinase est constituée de deux sous-unités, la sous-unité catalytique p110 et la sous-unité régulatrice p85, et son activation aboutit à la synthèse de seconds messagers lipidiques, les D3-phosphoinositides. Ces seconds messagers se lient aux domaines PH de protéines cytosoliques comme Akt et permettent ainsi leur ancrage membranaire (Daulhac *et*

al., 1999). La voie Pi3-kinase/Akt est impliquée dans l'action proliférative, et antiapoptotique ainsi que dans la régulation de l'adhésion et la migration cellulaire (Dufresne *et al.*, 2006).

- **Voie JAK/STAT**

Les protéines JAK (pour Janus Kinase) sont une famille de tyrosines kinases comportant quatre membres : JAK1, JAK2, JAK3 et TYK2. Les principaux substrats de ces protéines sont des facteurs de transcription formant la famille STAT (Signal Transducers and Activators of Transcription). Les protéines JAK sont recrutées aux RCPG et s'activent par autophosphorylation. Les STAT sont phosphorylées par JAK, puis se dimérisent avant d'être transloquées dans le noyau où elles jouent leur rôle de facteur de transcription.

Des travaux récents ont mis en évidence l'implication du RCCK2 dans l'activation du tandem JAK2/STAT3. L'activation de STAT2 par le RCCK2 requiert le motif NPXXY dans le TM7 du récepteur (Ferrand *et al.*, 2005 ; Gales *et al.*, 2000). Lorsque le RCCK2 est stimulé par la Gastrine, l'activation de JAK2 et STAT3 conduit à la prolifération cellulaire dans les acini des souris *Elas-CCK2*. La stimulation du RCCK2 active et module d'autres effecteurs qui ne seront pas détaillés ici mais parmi lesquels on peut citer, l'intégrine $\beta 1$, ou encore le facteur NF κ B/I κ B. (Dufresne *et al.*, 2006).

c. Expression du CCK2-R dans les cancers pancréatiques et digestifs

En 2000, un troisième variant contenant 69 acides aminés supplémentaires dans l'ICL3, a été découvert dans des tumeurs colorectales humaines. Ce récepteur, nommé RCCK2i4sv (intron 4 containing splice variant), est identifié dans les tumeurs colorectales

mais pas dans les tissus normaux adjacents, et dans les tumeurs pancréatiques humaines (Hellmich *et al.*, 2000). Il est aussi exprimé dans la métaplasie de Barrett, une situation connue pour être précurseur du cancer de l'œsophage. Le RCCK2i4sv induit des oscillations de calcium intracellulaire et augmente la prolifération cellulaire indépendamment de la présence de son ligand (Korner *et al.*, 2010).

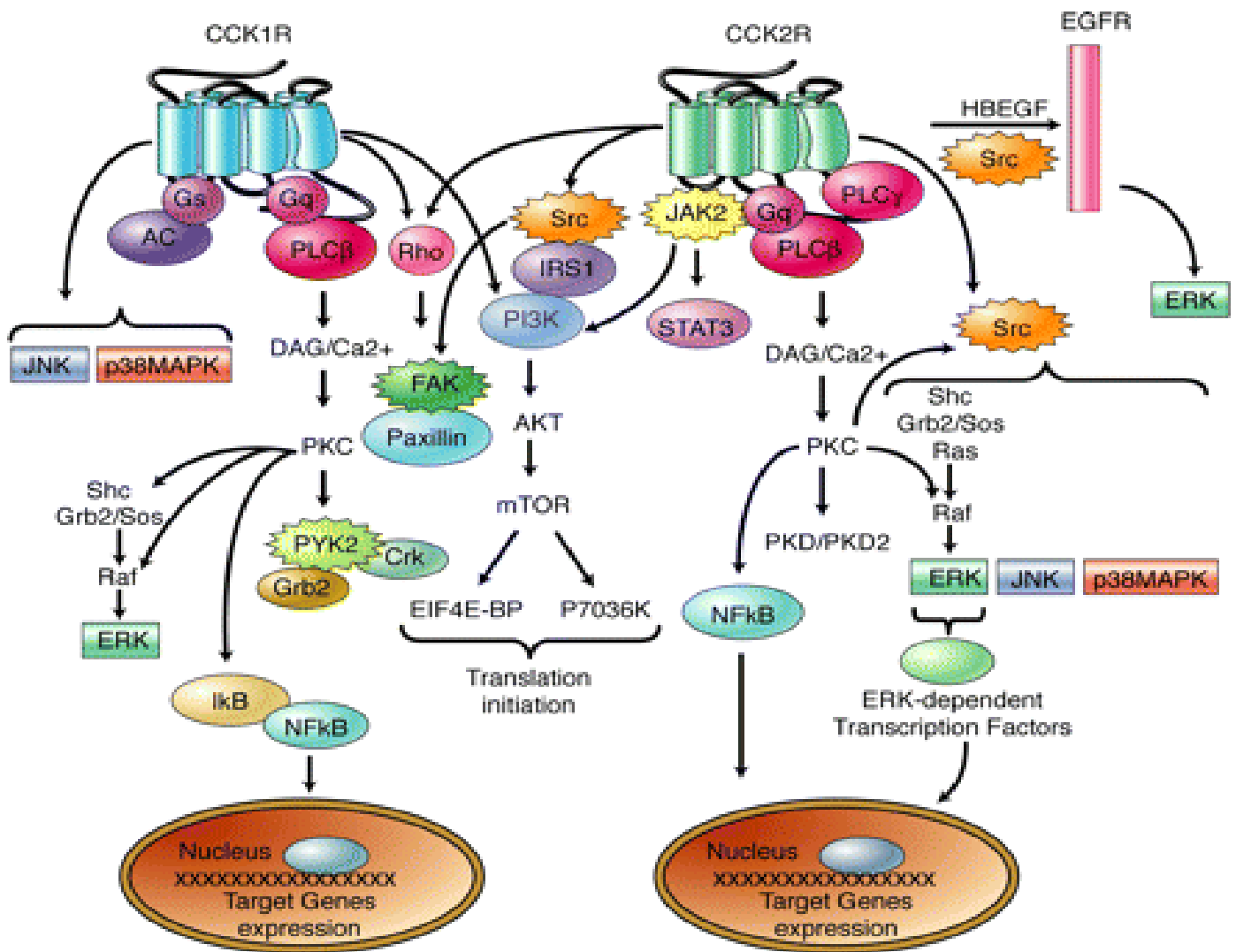


Figure 2.6: Représentation schématique de la voie de signalisation du récepteur CCK2/gastrine (Dufresne *et al.*, 2006).

Ce récepteur est décrit comme étant constitutivement actif ; des résultats divergents par rapport aux conclusions du groupe d'Hellmich. Encore plus récemment, une étude a remis en cause l'expression de ce variant. En effet, les auteurs rapportent que son expression est uniquement détectée dans les tumeurs gastrointestinales (GIST) et dans les cancers des poumons à petites cellules (Magnan, 2011; Howatson & Carter, 1985).

Chapitre 3

Etudes épidémiologique et expérimentale

3.1 Objectif du travail

Le peptide gastro-intestinal de la cholécystokinine (CCK) provoque la libération d'enzymes digestives pancréatiques et de la croissance des cellules du pancréas normal. L'administration exogène de la CCK a été utilisée dans des modèles murins pour étudier la pancréatite et également en tant que promoteur du cancer du pancréas ou le gène Kras est inducteur de la carcinogène. La caractérisation des récepteurs CCK dans le pancréas humain normal a été problématique en raison de son emplacement rétropéritonéale et des concentrations élevées de protéases pancréatiques. La plupart des études indiquent que le CCK-BR est le récepteur humain prédominant dans le pancréas, contrairement au récepteur CCK-A qui est prédominant dans le pancréas des rongeurs (Smith & Solomon, 2014).

Dans les cellules et les tumeurs pancréatiques, le rôle de la CCK est mieux ; mais pas suffisamment bien déterminé en raison des récepteurs souvent surexprimés par les cellules cancéreuses. Initialement, on pensait que le mécanisme par lequel la CCK a permis de potentialiser la cancérogenèse était en interaction avec l'inflammation dans le microenvironnement pancréatique. Mais avec les récentes conclusions des récepteurs CCK sur les PanIN (néoplasie intraépithéliale pancréatique) et les lésions sur les cellules étoilées, une hypothèse a été soulevée sur la possibilité que les actions de la CCK ne soient pas le résultat d'un cancer, mais que la CCK soit un promoteur déclenchant un cancer pancréatique (Smith & Solomon, 2014).

Cet avis résume ce qui est connu au sujet de la CCK, ses récepteurs, le pancréas sain et le cancer du pancréas, et aussi ce qui est inconnu sur ces derniers et qui nécessite une enquête plus approfondie pour déterminer qui vient en premier, l'œuf ou la poule "la CCK ou le cancer du pancréas" et quels sont les facteurs favorisant cette prolifération tumoral ?

Afin de répondre a ces questions ; nous avons choisi d'étudier et d'analyser le rôle des hormones gastro-intestinales ; cholecystokinine et gastrine ainsi que le statu de leurs récepteurs CCK2-R/gastrine-R dans le cancer pancréatique en association avec d'autres facteurs de risques qui peuvent contribuer au développement de ce type de cancer.

Pour cette fin ; nous avons effectué une étude comparative dans la quelle nous avons évalué des tissus humain provenant de pancréas exocrines cancéreux et d'autres provenant de pancréas exocrines normales et d'analyser l'expression et la distribution des récepteur CCK2/gastrine dans les cellules pancréatique normales et cancéreuses par le biais d'un protocole immunohistochimique de sorte a détecté ces récepteurs ; et d'évaluer le niveau de l'immunoréactivité et le l'immuno-intesinté dans les tissus présélectionnés.

3.2 Patients et méthodes

3.2.1 Etude épidémiologique

Il s'agit d'une étude rétrospective et descriptive portant sur 160 cas de cancer pancréatique diagnostiqués entre janvier 2006 et décembre 2013 au niveau des services de chirurgie et d'anatomopathologie des hôpitaux des trois grandes régions de l'Ouest Algérien : Les CHU de Sidi bel Abbes et de Tlemcen ainsi que l'hôpital militaire régional d'Oran.

Ces cas ont été colligés à partir des registres des services de chirurgie et d'anatomopathologie. Les dossiers retenus ont été complétés à partir des registres des services

référents. Les variables étudiées étaient l'âge, le sexe, les antécédents médicaux, les antécédents chirurgicaux, la consommation de tabac et d'alcool ; les symptômes, la localisation de la tumeur; le type histologique selon la classification de l'OMS.

3.2.1.1 Analyse statistique

Concernant l'étude analytique statistique, les données brutes ont été traitées en utilisant des tableaux croisés des graphiques en barres et SEM (Standard Error of the Mean). Les associations entre les paramètres catégoriques ont été testées en utilisant le test (χ^2) le test de Pearson et aussi le test de *t*-Student. Les résultats ont été présentés en utilisant la valeur de *p*; le niveau de sa signification a été limité par le taux de 5%. Toutes les données ont été traitées et analysées par SPSS 20.0 (Statistical Package pour les sciences sociales, IBM Corporation, Chicago, IL Août de 2011.).

3.2.2 Etude Expérimentale

L'étude expérimentale a été effectuée au niveau du service d'anatomopathologie du CHU de Sidi-Bel-Abbès sous l'égide du chef de service.

Vingt (20) blocs de tissus pancréatiques ont été recueillies à partir des services de pathologie, du CHU de Sidi-Bel-Abbès Hassani Abdelkader pour la période de 2004-2013; 10 d'entre eux étaient des tissus pancréatiques sains qui ont été prélevés sur des patients atteints de pancréatite; et 10 était des sections de tissus pancréatiques cancéreux ; parmi eux 9 adénocarcinomes pancréatiques et une tumeur pseudopapillaire solide. Ces spécimens ont été conservés dans de la paraffine au sein du même service. Ces sections ont été colorées avec de l'hémaroxyline et l'éosine (H&E) pour l'examen histologique. Une confidentialité absolue des informations des patients était maintenue.

3.2.2.1 Protocole Immunohistochimique

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

Les sections étaient couvertes par une protéine bloque puis incubées durant 10 minutes à une température ambiante pour bloquer la coloration de fond. Les coupes étaient lavées une fois avec une solution tampon. Puis un anticorps anti-CCK-2R/gastrine-R (1:100 rabbit polyclonal; Abcam, Cambridge, UK) était appliqué.

Les coupes étaient incubées durant deux heures puis lavés trois fois ; et par la suite un complément était appliqué pendant 10 minutes à une température ambiante. Les sections étaient lavées encore deux fois ensuite recouvertes l'HRP (Horseradish Peroxidase) conjugué ; incubée pendant 15 minutes à une température ambiante; et rincées 4 fois avec la solution tampon, ensuite 30 μ l (1 goutte) de DAB (diaminobenzidine) chromogène était ajoutés à 1,5 ml (50 gouttes) de substrat DAB ; puis appliqués sur les tissus préalablement incubés durant 10 minutes. Les tissus étaient rincées 4 fois ; puis une contre coloration était appliquée sur les échantillons avant qu'ils soient déshydratés.

3.2.2.2 Évaluation morphométrique

Toutes les lames colorées ont été examinées en microscopie optique et seuls les échantillons qui étaient immunoréactives avec les récepteurs CCK2/gastrine (RI) ont été

identifiés comme positifs. L'évaluation du niveau de l'immunoréactivité était fait en se basant sur le nombre de cellules tumorales positives dans des champs indépendants de haute puissance avec une distribution abondante des CCK-2R/gastrine-R ; ces dernières ont été comptées et notées comme suit: (-), pas de cellules immunoréactives; (+) une à cinq cellules : très faible immunoréactivité; (++) Cinq à dix cellules : faible réactivité immunologique; (+++), moins de dix cellules mais <1% : immunoréactivité modérée; plus de dix de la masse totale de la cellule; (++++), > 1% : immunoréactivité élevée.

Chapitre 4

Résultats

4.1 Présentation de l'article 1

Delayed diagnosis of pancreatic cancer reported as more common in a population of North African young adults

Contexte:

Malgré tous les efforts de la recherche médicale; le cancer pancréatique se classe comme le quatrième cancer le plus meurtrier aux Etats-Unis après les cancers du poumon, du côlon et du sein. En 2013, 45 220 patients étaient diagnostiqués avec un cancer du pancréas et 38 460 décès étaient enregistrés aux Etats-Unis.

La raison principale de sa fatalité réside dans difficulté de son diagnostic car aucun test de dépistage ne peut révéler de manière fiable le cancer pancréatique à un stade précoce ; surtout chez les personnes qui ne présentent aucun symptôme ; vu que cette pathologie progresse d'une manière silencieuse et asymptomatique. Cela signifie que ce cancer est souvent diagnostiqué à des stades avancés lorsqu'il est plus respectable après le stade métastatique.

Les tumeurs pancréatiques chez le sujet jeune de moins de 35 ans sont rares, et ont une histopathologie et un pronostic très différents de celles des adultes plus âgés.

Elles entraînent rarement une compression des voies biliaires, sont plus souvent expansives qu'infiltrantes ; et sont souvent volumineuses au diagnostic, avec une nécrose

centrale. Leurs caractéristiques permettent souvent d'évoquer le diagnostic histologique dès l'étape de l'imagerie ; à condition que le patient se présente à un stade précoce.

Afin d'actualiser les données sur l'incidence et l'évolution du cancer pancréatique dans l'Ouest Algérien, nous avons effectué une étude épidémiologique rétrospective analytique portant sur 160 cas au niveau de trois villes de l'ouest algérien: Sidi-Bel-Abbès, Oran et Tlemcen au long des huit dernières années (2006 - 2013).

Résumé des résultats

- Au cours de notre période d'étude, 160 cas de cancer pancréatique ont été colligés avec un âge moyen de 66,2 ans (des extrêmes de 16 à 96 ans) et un sex-ratio de 1,65.
- Le tabagisme (32,5%) et l'alcoolisme chronique (20,6%) étaient les facteurs de risques principaux notés chez nos patients ;
- Dans 90% des cas, la tumeur était située à la tête du pancréas avec une prédominance du type histologique adénocarcinomes bien différenciés (45%) suivies des adénocarcinomes moyennement différenciés (20%) et des adénocarcinomes peu à moyennement différenciés (18%) ;
- 26,2% des cas étaient diagnostiqués au stade M1 ; suivie respectivement par les stades T4 (21,8%) et T3 (21,2%) ;
- Nos analyses statistiques ont indiqué une corrélation très significative ($p = 0,02$) entre les patients âgés de 21-40 ans et le stade avancé de diagnostic (qui était basé sur la classification TNM) ;

- Les tumeurs pancréatiques sont rares chez les jeunes adultes, mais elles sont de plus en plus diagnostiquées chez les moins de 40ans à des stades tardifs ou la pathologie est quasi incurable dans les régions de l'ouest Algériens.

Article 01

Delayed Diagnosis of Pancreatic Cancer Reported as more common in a Population of North African Young Adults

Authors: Feriel SELLAM¹; Noria HARIR¹, Méguit.B.KHALED¹, MeriemNesrine MRABENT¹, Rachida SALAH¹, Arslane BENCHOUK², Mustapha DIAF¹

¹: Department of Biology, DjillaliLiabes University of Sidi bel Abbès, Algeria

²: Military Hospital of Oran (HMRUO)

Abstract

Background: Pancreatic cancer is one of the most challenging tumor entities worldwide, characterized as a highly aggressive disease with dismal overall prognosis and an incidence rate equaling mortality rate.

Objective: In order to have an update about pancreatic cancer incidence and evolution in North Africa, we conducted an epidemiological analytical retrospective study at the level of three Algerian regions: Sidi-bel-Abbès, Oran and Tlemcen along the last eight years (2006 - 2013)

Methods: We performed a retrospective hospital-based study in which we analyzed the records of 160 pancreatic cancer patients registered, evaluated and treated in a Northern African region; at the level of hospital centers of the three western Algerian regions from 2006 to 2013.

Results: Along the period of study, 160 patients were diagnosed with pancreatic cancer; with a mean age of 66.2 years, and a sex ratio of 1.65; other parameters such as a medical history smoking and alcoholism history, tumor site; histological type as well as the stage of diagnosis were also enrolled in the study. Our statistical analyses reported a very significant correlation between patients who belonged to the age group of 21-40 years and the advanced stage of diagnosis (based on TNM classification) with $p=0.02$.

Conclusion: Pancreatic cancer is increasingly diagnosed in young adults at an advanced stage in North African regions.

Keywords: pancreatic cancer, young adults, delayed diagnosis; North Africa

Introduction

Pancreatic cancer is one of the most challenging tumor entities worldwide, characterized as a highly aggressive disease with dismal overall prognosis and an incidence rate equaling

mortality rate (1,2). Less developed regions have low rates of pancreatic cancer (2.4), it is relatively rare in Africa and Asia (4, 5). However and despite all medical research efforts; it ranks as the fourth deadliest cancer in the United States after cancers of the lung, colon, and breast. In 2013, an estimated 45,220 newly diagnosed of pancreatic cancer and 38,460 deaths were expected in the U.S (3).

The main reason could be the difficulty of its diagnosis since no specific cost-effective screening tests can easily and reliably find early-stage pancreatic cancer in people who have no symptoms of the disease. This means it is often not found until later stages when the cancer can no longer be removed with surgery and has spread from the pancreas to other parts of the body (6). In fact, the SEER database (Surveillance, Epidemiology, and End Results database) also shows that for every 12.2 patients diagnosed per 100,000, 10.9 will die from pancreatic cancer, despite the best efforts of researchers and clinicians to improve survival outcomes in patients (7).

In order to have an update about pancreatic incidence and evolution in western Algeria, we conducted an epidemiological analytical retrospective study at the level of three western Algerian regions: Sidi-bel-Abbes, Oran and Tlemcen along the the last eight years (2006 - 2013).

Patients and Method

The Population

This hospital based study was carried out respectively at the level of Surgery departments of the University Hospitals of Sidi-bel-Abbes and Tlemcen as well as the Pathology Department of the Military Hospital of Oran (HMRUO) where patients' data were collected routinely. In the current epidemiological retrospective study we analyzed patients' records basing on different parameters such as: age, gender, medical history, smoking history, as well as TNM histo-pathological classification. A total sample of 160 patients aged between 16-96 years was diagnosed with pancreatic cancer between 2006 and 2013.

The Statistical Analysis

Concerning the statistical analytical study, the raw data were summarized using rates and cross-tabulations. Associations between categorical parameters were tested using Pearson's chi-squared test (χ^2) test. Results were presented using p value; the level of its significance was limited by the rate of 5%. All data were processed and analyzed via SPSS 20.0 (Statistical Package for the Social Sciences, IBM Corporation; Chicago, IL. August 2011).

Results

160 patient records were included in our survey, 105 (65.6%) were male and 55 (34.8%) were female. There was an overall male predominance with the male to female ratio of 1.65 (Table 1). The median age at the diagnosis was 62.2 with a minimum age of 16 years and maximum of 96 years.

More than the half of our patients were aged between 61- 80 years old (57.5%) followed respectively by the age groups of 41-60 (21.2%), the more than 80 (13.7%); 21-40 (6.87%) and finally patients aged less than 20 (0.62%)(Table 01).

The site of the tumor was in the head of the pancreas in 90% of cases, in the body of the pancreas in 5.62% of cases, and in the tail of the pancreas in 4.3% of cases (Table 01).

The proportion of patients with a history of cigarette smoking was 32.5%; all the smokers were male patients; similar results were also reported for history of alcohol; where only males were alcoholics (20.6%) (Table 01).

Table 01 illustrates as well the following histological types: 20% moderately differentiated adenocarcinomas; 45% well differentiated adenocarcinomas; 6% infiltrant adenocarcinomas; 3% non-differentiated carcinomas; 4% poorly differentiated carcinomas and 18% poorly to moderately differentiated adenocarcinomas.

The majority of our patients complained from the following symptoms: Abdominal pain (95%); jaundice (92%); right hypocondrium pain (90%); vomiting and nausea (86%); weight loss (87%); dark Urine (63%); pruritus (65%); acholic stools (57%)(Table 01).

Table 02 demonstrates the most common diseases recorded in medical history of our studied population which were respectively: high blood pressure (20.6%); type 2 diabetes (15%) and type 1 diabetes (13%).

Table 03 illustrates the different proportions of diagnosis stages of our patients. 26.2% were diagnosed at M1 stage; followed respectively by T4 stage (21.8%); T3 (21.2%); T2 (13.2%); N1 (10.6%); T1 (4.3%) and Tis (1.8%).

In order to deepen our investigation, we performed a statistical analytical study by which we studied possible association between patient's age group and the stage of diagnosis (TNM classification) via Pearson's chi-squared test. Our statistical analyses reported a significant association between patients aged between 21- 40 years and the stage of diagnosis with $P=0.02$ i.e ($P > 0.05$); however any significant association was reported between the other age groups and the stage of diagnosis.(Table 03)

Discussion

The present survey is one of the very few surveys who studied the profile of pancreatic cancer in North Africa in general and Algeria in particular.

With a sex-ratio of 1.65 our investigation confirmed once more that men are more likely to develop pancreatic cancer than women. These results matched with many other previous investigations as those of *Schiffman et al*(21).

Our results showed that 32% of our patients were cigarette smokers, and 20% were alcoholics; which could represent a risk factor for developing a pancreatic cancer since several published reports showed that smokers had about a 2-fold increased risk, compared to nonsmokers (22, 24).

We noticed also that most of our patients complained from Jaundice; right hypochondrium pain and abdominal pain; which proves that pancreatic cancer is a silent disease, as reported in many other findings stated that pancreatic cancer symptoms do not manifest early and initial symptoms are often nonspecific (25). Concerning tumors' location, most of them were located in the head of the pancreas (90%), followed respectively by cancer of the neck and the tail of the pancreas which represented a tiny minority. The study of *Kalser et al.* demonstrated as well that more than two thirds of pancreatic cancers occur in the head of the pancreas (26).

Diabetes mellitus was associated and pointed in several investigations as possible risk factor for pancreatic cancer (24); which concord to our findings since 30% of our studied population presented type 1 and type 2 of diabetes (Table 02).

Our survey demonstrated an increasing frequency of pancreatic cancer with the advanced age of patients since most of them were aged between 61 and 80 years old, these results agree with those of *Shibata's et al* who concluded that this could be due to the dietary habits of the patients (23).

In the other hand; the current investigation confirmed indeed the rarity of pancreatic cancer in young adults; since only 7% of our population suffered from it, which agrees with the results of *Perez et al* who found that the incidence of identified pancreatic carcinomas in patients under the age of 30 was only about 0.46/million (8). Same conclusion for *JuttaLuttges et al* who evaluated the incidence of pancreatic ductal adenocarcinomas in patients aged of 40 years old and was approximately equal to 0.3%, and the incidence in patients aged of 20 years was only about 0.1% (9).

However, despite the low rate of our patients (7%) belonging to that young age group; 36.36% of them were diagnosed at M1 stage which represented the majority. Concordant with our results those of [Randall E. Brand et al](#) who found that pancreatic cancer is increasingly diagnosed in the younger at an advanced stage (10). *Lisa Berry et al* stated that nearly 50% of patients aged between 16 and 54 with pancreatic cancer are more likely than those who are older to be diagnosed at a stage when the disease is incurable, because of poor awareness, misdiagnosis and care delays (11).

Some authors confirm that pancreatic cancer is frequently diagnosed at an advanced stage, possibly because of the tumor biology showing an aggressive behavior and symptoms often being non-specific mainly in the young (12); *Martin Gulliford et al* reported as well that patients with some less common cancers such as pancreatic cancer were more likely to require three visits or more to their primary care physician before they were referred to a specialist (13). What we have to emphasize as well is the status of Algeria as a third world country, thus it's undeniable that lack of healthcare centers, high prices of drugs, cancer therapies, medical checkups as well as the low socioeconomic level of Algerian citizen are all major factors which may have a direct impact on that fatal disease survival chances.

Since most of our patients had pancreatic adenocarcinomas (Table 01) presented in late stage at the time of diagnosis; their prognosis was pretty poor; with a 1-year survival rate of 20% and a 5-year survival rate of less than 5%; as explained the survey of *Kuvshinoff et al* (14). The only hope of long-term survival is if curative resection can be undertaken; however,

since pancreatic cancer patients seldom exhibit disease-specific symptoms until late in the course of the disease, very few patients (<15–20%) have resectable disease by the time the diagnosis is made(15, 16).While complete surgical resection may lead to long-term survival in approximately 25% of patients, only 15% are actually resectable (14).

It is therefore essential to distinguish all kinds of tumor from other pancreatic neoplasms particularly adenocarcinoma for which the prognosis is extremely poor as stated above (17).Surgery for pancreatic cancer is probably the most demanding and risky operative procedure in abdominal surgery (18). Nevertheless the huge lack of pathology laboratories and cancer research centers in Algeria and third world countries have a main negative impact on the precision and quality of the diagnosis.

Seeling et al. reported that in a young patient with advanced disease, resection may give a weak but valuable increase of survival. In fact, metastatic pancreatic cancer could become overt when the point of no return has already been passed as it could be the case in the presence of positive interaortocavallymphnodes, or metastatic cancer will be detected during operation despite negative imaging results preoperatively (19).*Picozzi et al* affirmed that despite R0 resection, long-term survival does not exceed 25% even in the most experienced pancreatic centers may prove that carcinoma of the pancreas is a systemic disease. Further improvement of survival can only be achieved by adjuvant treatment (20).

Our survey showed clearly that young adults who suffered from pancreatic cancer in general; and cancer of the head of pancreas in particular; are unfortunately diagnosed at a very late stage in Western Algeria; when the likelihood of recovery is poor and patients have no other choice than to accept their ongoing symptoms.

Conclusion

Young adults are often seen to be healthier than older ones. Lack of awareness, socio-cultural habits and carelessness could be fatal for patients who suffer from pancreatic cancer; awareness should be increased among healthcare professionals and mainly among third world countries' citizen. The earlier the diagnosis is made, the better are chances for the patient's survival.

Acknowledgments

The authors would like to thank the members of surgery departments of Sidi bel Abbes and Tlemcen as well as the members of anatomic pathology of Oran Military hospital for their invaluable support, guidance, and educational insight.

Conflict of interest: Any

References

1. Malvezzi M, Bertuccio P, Levi F, La Vecchia C, Negri E. European cancer mortality predictions for the year 2013. *Ann Oncol* 2013. **24**(3):792–800.
2. World Health Organization. *World Health Organization Statistical Information System*. WHO Mortality Database (2012). Available from: <http://www3.who.int/whosis/menu.cfm>
3. American Cancer Society. *American Cancer Society, National Cancer Institute, and Texas Cancer Registry*. Texas Oncology (2013). Available from:

http://www.texasoncology.com/uploadedFiles/About_TXO/Media_Center/Fact_Sheets/Pancreatic_Cancer/Pancreatic-Cancer-Fact-Sheet.pdf

4. Curado M. P., Edwards B., Shin H.R., Storm H., Ferlay J., Heanue M. and Boyle P., eds (2007) Cancer Incidence in Five Continents, Vol. IX. IARC Scientific Publications No. 160, Lyon, IARC.

5. Forman D, Bray F, Brewster DH, GombeMbalawa C, Kohler B, Piñeros M, Steliarova-Foucher E, Swaminathan R and Ferlay J eds (2013) Cancer Incidence in Five Continents, Vol. X (electronic version) Lyon, IARC. Available from: <http://ci5.iarc.fr>

6. American Cancer Society. *American Cancer Society's publication, Cancer Facts & Figures* (2014). Available from: <http://www.cancer.net/cancer-types/pancreatic-cancer/statistics>

7. SEER Stat Fact Sheets. Cancer of the pancreas. <http://seer.cancer.gov/statfacts>. Accessed August 6, 2014

8. Perez EA, Gutierrez JC, Koniaris LG, Neville HL, Thompson WR, Sola JE. Malignant pancreatic tumors: incidence and outcome in 58 pediatric patients . J Pediatr Surg 2009 ; 44 : 197 – 203

9. Lüttges J., Stigge C., Pacena M. and Klöppel G. Rare ductal adenocarcinoma of the pancreas in patients younger than age 40 years. Cancer, 2004 ,100:173–182.

10. Brand RE ; Greer JB, Zolotarevsky E. Brand R, DuH, Simeone D et al.; Pancreatic Cancer Patients Who Smoke and Drink Are Diagnosed at Younger Ages. Clinical Gastroenterology and Hepatology 2009;7(9):1007–1012

11. Cancer Nursing Practice; Pancreatic cancer diagnosis delayed in people under 55, Electronic, Individual 13(5):pp. 7

12. Bien E , Godzinski J , Dalligna P , Defachelles AS, Stachowicz-Stencel T, Orbach D et al. Pancreatoblastoma: A report from the European cooperative study group for paediatric rare tumours (EXPeRT) .Eur J Cancer. 2011 Oct;47(15):2347-52

13. [Gulliford M](#). Primary care and diagnosis of cancer. Lancet Oncol. 2012;13(4): 321 – 323.

14. Kuvshinov BW1, Bryer MP. Treatment of Resectable and Locally Advanced Pancreatic Cancer. Cancer Control. 2000, 7(5): 428-436

15. Jemal AMT, Ward E, Samuels A, Tiwari RC, Ghafoor A, et al. Cancer Statistics, 2005. CA Cancer J Clin. 2005;55:10–30.

16. Conlon KC, Klimstra DS, Brennan MF. Long-term survival after curative resection for pancreatic ductal adenocarcinoma. Clinicopathologic analysis of 5-year survivors. Ann Surg. 1996, 223:273–9.

17. Levin D, Connelly R, Devesa S. Demographic characteristics of cancer of the pancreas: Mortality, incidence and survival. *Cancer*. 1990, 65: 283–91
18. Buchler MW, Kleeff J, Friess H. Surgical treatment of pancreatic cancer. *J Am Coll Surg*. 2007;205:S81–S86.
19. Seelig SK, Burkert B, Chromik AM, Tannapfel A, Uhl W, Seelig MH. Pancreatic resections for advanced M1-pancreatic carcinoma: the value of synchronous metastasectomy. *HPB Surg*. 2010;2010:579672
20. Picozzi VJ, Kozarek RA, Traverso LW. Interferon-based adjuvant chemoradiation therapy after pancreaticoduodenectomy for pancreatic adenocarcinoma. *Am J Surg* 2003;185(5):476–480
21. Schiffman SC, Chu KC, Park J et al., Is prior cholecystectomy associated with decreased survival in patients with resectable pancreatic adenocarcinoma following pancreaticoduodenectomy, *The American Journal of Surgery*, (2011), 201, 519-524
22. Raimondi S, Maisonneuve P, Lowenfels AB. Epidemiology of pancreatic cancer: an overview. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2009;6:699–708.
23. Shibata, A., Mack, T. M., Paganini-Hill, A., Ross, R. K. and Henderson, B. E. , A prospective study of pancreatic cancer in the elderly. *Int. J. Cancer*, (1994), 58, 46–49. doi: 10.1002/ijc.2910580109
24. Bonelli L, Aste H, Bovo P, Cavallini G, et al. Exocrine pancreatic cancer, cigarette smoking and diabetes mellitus: a case-control study. *Pancreas* 2003;27:143–9
25. Lin H, Li SD, Hu XG, LI ZS. Primary pancreatic lymphoma: report of six cases. *World J Gastroenterol* 2006;12(31):5064–7.
26. Kalser MH, Barkin J, MacIntyre JM. Pancreatic cancer. Assessment of prognosis by clinical presentation. *Cancer*. 1985;56:397–402

Table 01: Patients medical features

Characteristics	Number of cases	Percentage(%)
Sex (n= 160)		
Male	105	65.62
Female	55	34.38
Sex ratio	-	1.65
Age		
(< 20)	1	0.62
(21-40)	11	6.87
(41-60)	34	21.25
(61-80)	92	57.5
(80<)	22	13.75
Smoking History		
Male smoker	52	32.5
Female smoker	0	0
Not mentioned	29	18.12
Alcohol History		
Alcoholism (only males)	33	20.6
Not mentioned	52	32.5
Symptoms and signs		
Jaundice	148	92.5
Abdominal pain	152	95
Right hypocondrium pain	145	90.6
Vomiting and nausea	138	86.3
Weight loss	140	87.5
Dark Urine	102	63.75
Pruritus	105	65.6
Tumour site		
Head of the pancreas	144	90
Body of the pancreas	9	5.63
Tail of the pancreas	7	4.37
Histo-pathology		
Well differentiated adenocarcinoma	72	45
Moderately differentiated adenocarcinoma	33	20.62
Poorly to moderately differentiated adenocarcinoma	30	18.75
Infiltrant adenocarcinoma	10	6.25
Poorly differentiated carcinoma	7	4.37
Non differentiated carcinoma	5	3.12
Not mentioned	3	1.89

Table 02: Patients' Medical History

Characteristics	Number of cases	Percentage
Medical history		
<i>High blood pressure</i>	33	20.6
Males	20	12.5
Females	13	8.1
<i>Type 1 diabetes</i>	22	13.7
Males	16	10
Females	6	3.7
<i>Type 2 Diabetes</i>	25	15.6
Males	16	10
Females	9	5.6
<i>Nothing to report</i>	80	50
Males	53	33.1
Females	27	16.8

Table 03: Association between age and TNM histopathological Classification

Charactristics	Tis	T1	T2	T3	T4	N1	M1	<i>P value</i>
Age								
(< 20)	-	0	0	0	0	0	(0.6%) 1	-
(21-40)	-	0	(0.6%) 1	(1.9%) 3	(1.25%) 2	(0.6%) 1	(2.5%) 4	<i>P=0.027</i>
(41-60)	(0.6%) 1	(0.6%) 1	(3.7%) 6	(4.3%) 7	(3.1%) 5	(3.7%) 6	(5%) 8	<i>P=0.928</i>
(61-80)	(0.6%) 1	(1.9%) 3	(7.5%) 12	(13.1%) 21	(13.1%) 21	(5.6%) 9	(15.6%) 25	<i>P=0.733</i>
(80<)	(0.6%) 1	(1.9%) 3	(1.9%) 3	(1.9%) 3	(4.3%) 7	(0.6%) 1	(2.5%) 4	<i>P=0.521</i>
Total	(1.8%)3	(4.3%)7	(13.7%)22	(21.2%)34	(21.8%)35	(10.6%)17	(26.2%)42	

p: statistical significance

4.2 Présentation de l'article 2

Epidemiology and Risk Factors for Exocrine Pancreatic Cancer in a Northern African Population

Contexte:

Bien que différentes études épidémiologiques aient indiqué que de nombreux facteurs environnementaux peuvent contribuer au développement du cancer du pancréas, son étiologie reste largement inconnue, seul l'âge et la consommation de tabac ont été reconnus comme facteurs de risque pour cette pathologie.

Certains auteurs ont suggéré que la cholécystectomie avait tendance à déréguler les niveaux de la cholécystokinine (CCK) dans le sang et à avoir un effet atrophique sur les cellules acineuses pancréatiques. L'effet trophique sur le pancréas par l'augmentation de la libération présumée de cholécystokinine après une cholécystectomie et une perturbation neurohormonale de la régulation du pancréas.

L'objectif de notre enquête était d'étudier les caractéristiques cliniques, biologiques et histo-pathologiques des patients atteints d'un cancer du pancréas en vue d'évaluer les facteurs de risque possibles pour cette pathologie. Pour cela nous avons effectué une étude épidémiologique rétrospective descriptive portant sur 87 cas de cancer pancréatique diagnostiqués entre 2007 et 2013 au niveau des services de chirurgie du CHU de Sidi bel Abbes.

Résumé des résultats :

- Au cours de notre période d'étude, 87 cas de cancer pancréatique ont été collectés (55 hommes et 32 femmes) avec un âge moyen de 63,1 ans (des extrêmes de 16 à 96 ans)

et un sex-ratio de 1,71; 24,3% de nos patients était des consommateurs de tabac et 13,5% était des consommateurs d'alcool.

- Dans 92% des cas, la tumeur était située à la tête du pancréas avec une prédominance du type histologique adénocarcinomes bien différenciés (43.1%)
- La maladie la plus enregistrée dans les antécédents médicaux de nos patients était le diabète sucré (25,28%) ;
- 35,63% était le taux non négligeable de patients ayant subi une cholécystectomie et ont été diagnostiqués avec un cancer pancréatique après une durée moyenne de 5,23 ans ;
- La grande majorité des patients étaient avec ce type de cancer aux stades M1 et T3 ;
- Selon nos résultats, la cholécystectomie pourrait être un facteur de risque pour le cancer du pancréas chez les patients Algériens.

Article 02

Epidemiology and Risk Factors for Exocrine Pancreatic Cancer in a Northern African population

Authors: Feriel SELLAM¹; Noria HARIR^{1,2}, Méghit.B.KHALED¹, Nesrine.M. MRABENT¹, Rachida SALAH¹, Mustapha DIAF¹

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

²: Laboratoire de Microbiologie Moléculaire, Proteomics et Santé

Abstract

Background: The etiology of pancreatic cancer remains largely unknown. Although epidemiological studies have reported that many environmental factors may contribute to the development of pancreatic cancer, only age and cigarette smoking have been established as consistent risk factors for the disease.

Objective: Studying the biological clinical and histological features of patients with pancreatic cancer in order to assess the possible risk factors for pancreatic cancer in a north African population.

Methods: An epidemiological retrospective descriptive study has been performed at the level of surgery department of the university hospital of Sidi bel Abbes region, western Algeria, from 2007 to 2013.

Results: A total of 87 patients were diagnosed with cancer of the pancreas (55 males and 32 females) with a mean age of 63.1 years, ranging from 16 to 96 years old, and a sex ratio of 1.71. In 92% of cases pancreatic tumours were located at the head of the pancreas; the most predominant histological type was the adenocarcinoma; cigarette smokers represented the rate of 24.3% and alcoholics 13.5%. The most recorded disease among patients medical history was diabetes mellitus (25.28%). 35.63% was the prominent rate of patients who underwent cholecystectomy and were diagnosed with pancreatic cancer after an average duration of 5.23 years. Our patients were mostly diagnosed with cancer at M1 and T3 stages.

Conclusion: According to our results, cholecystectomy could possibly be a risk factor for pancreatic cancer in Algerian population

Keywords: pancreatic cancer; epidemiology; risk factors; northern African population.

Introduction

Pancreatic cancer is one of the deadliest cancers with a 5 year survival rate of less than 5% and is the 4th largest cause of cancer-related deaths in the United States (1)

While overall cancer incidence and death rates are declining, the incidence and death rates for pancreatic cancer have been increasing. The number of new pancreatic cancer cases in the United States has been projected to increase by 55 percent between 2010 and 2030 (2)

The etiology of pancreatic cancer remains largely unknown. Although epidemiological studies have reported that many environmental factors may contribute to the development of pancreatic cancer, only age and cigarette smoking have been established as consistent risk factors for the disease (4)

Cholecystectomy has been found to increase serum levels of cholecystokinin (CCK) (5). CCK has been shown to stimulate both gallbladder contraction and pancreatic enzyme secretion (6) and to have atrophic effect on pancreatic acinar cells. (7) The trophic effect on the pancreas by the presumed increased release of cholecystokinin following cholecystectomy and a perturbation of the neurohormonal pancreatic regulation, have been suggested as possible contributing factors for pancreatic cancer (9,16)

Our purpose through the current scientific investigation is to study the biological clinical and histological features of patients with pancreatic cancer in order to assess the possible risk factors for pancreatic cancer in a north African population. To that end we performed an epidemiological retrospective study the analyses the records of patients with pancreatic cancer at the region of Sidi bel Abbes, western Algeria from 2007 to 2013.

Patients and Methods

Our retrospective study was performed using a database with 87 patients with pancreatic cancer who had been diagnosed at the pathology and surgery departments of the University Hospital Center of Sidi bel Abbes , from 2007 to 2013. The clinical records of the patients were reviewed for medical history, surgical history, smoking and alcohol history, symptoms and signs, histopathology, as well as the clinical staging of pancreatic cancer. Only patients with a confirmed pathological cell type and adequate medical records were included for the analysis.

Statistical Analyses

Concerning the statistical analytical study, the data were summarized using rates and cross-tabulations. Associations between categorical parameters were tested using Pearson's chi-squared test (χ^2) and Cramér's phi (ϕ_c) test. Results were presented using *p* value, the level of its significance was limited by the rate of 5%. All data were processed and analyzed via SPSS 20.0 (Statistical Package for the Social Sciences, IBM Corporation; Chicago, IL. August 2011).

Results

Our survey have been done over 87 patients (63% males and 37% females). We reported an overall male predominance with the male to female ratio of 1.71, the mean age was about 63.1 years, ranging from 16 to 96 years old. The most affected age group by pancreatic cancer was the 61-80 years old with a rate of 57,4%, followed respectively by the ranges of 41-60 years old (25.2%), 81-100 years (11.5%), 21-40 years (4.6%), and the least affected age range was the 01-20 years (1.14%) (Table 01)

While no female smokers were reported in our investigation, 24.3% male patients were cigarette smokers at and, 13.5% were alcoholics. (Table 01)

A big majority of the studied population complained from: Jaundice (96 %); right hypochondrium pain (93.2 %), abdominal pain (91.8 %), dark urine (85.1 %), weight loss (85.1 %), acholic stools, (79.7 %) nausea and vomiting (68.9 %), and pruritus (64.8 %) . (Table 01)

Concerning the tumours location 92% of them were located at the level the head of the pancreas, while 5.74% were located at the body of the pancreas and only 2.3% the tail of the pancreas. (Table 01). The latter table demonstrates as well the following histological types of our patients: 22% moderately differentiated adenocarcinomas; 43% well differentiated adenocarcinomas; 4% infiltrant adenocarcinomas ; 2% non differentiated carcinomas; 3% poorly differentiated carcinomas and 25% poorly to moderately differentiated adenocarcinomas;

Table 02 illustrates the most common diseases recorded in the medical history of patients which were respectively: High blood pressure (24.13%), type2 diabetes (17.24%) and type1diabetes (8.04%). 35.63% was not a predominant but a prominent rate of patients who underwent cholecystectomy and presented a pancreatic cancer after an average duration of 5.23 year; of those patients 21.8 % were males and 13.8 % were females (Table 02). What our results reported as well is that the majority of patients were diagnosed with pancreatic cancer respectively at the following stages: M1 (24.1%) , T3 (26.4%) and T4 (18.4%). (Table 02)

Discussion

According to the results obtained with a sex ratio of 1.71; we confirmed that most patients diagnosed with pancreatic cancer were males. These results matched with many other previous investigations as those of *Schiffman et al.* (15)

In our retrospective study the mean age at which the diseases was diagnosed was 63.1 years, this advanced age of diagnosis could be explained by the dietary habits of the patients and the increased risk of pancreatic cancer which might be associated with a history of diabetes and cholecystectomy as explained in the investigation of *Shibata et al.* (17)

The chart of the anatomic site of pancreatic tumour was highly headed by pancreatic head cancer with a rate of 92% followed respectively by pancreatic body and tail cancers, the latter results agree with those of *Lau et al.* who made a survey using SEER registry data base which indicated that the incidence rate for pancreatic head cancer was 5.6 per 100,000, whereas the rate for pancreatic body/tail cancers was 1.6 per 100,000 between 1973 and 2002 in the United States of America. (25) What we have reported as well is that our patients were diagnosed after an average duration of 5.23 years since cholecystectomy was undergone. Concordant to our results those of *Ghadimi et al* who demonstrated that 9 per cent of patients with pancreatic cancer had undergone cholecystectomy within 2 years before the diagnosis of pancreatic cancer; additionally, prior cholecystectomy was associated with a decreased rate of curative resection. (8)

We also noticed that the major symptoms which were common in our patients were:

Jaundice (95.945%) right hypochondrium pain (93.243%), and abdominal pain (91.891%); there we confirmed once more that pancreatic cancer is a silent disease, it's diagnosed mostly at an advanced stage and that's what staging distribution showed since it was widely headed

by the three latest stages of TNM classification, it was respectively M1, T3 and T4 stages. Thus, while analyzing the results of surgical histories rates we noticed that cholecystectomy dominated the chart with a rate of 35.63%, even if it's not predominant it's a pretty prominent rate. According to *Gray et al.* the lack of tactile sensation, limited visualization of the lesser sac, and patient body habits can make the diagnosis of malignancy during laparoscopy difficult. This emphasizes the necessity of recognizing symptoms suspicious for pancreatic cancer prior to cholecystectomy, including weight loss, jaundice, and steatorrhea. Although benign biliary pathology is much more frequent than pancreatic cancer, these warning signs warrant more extensive evaluation. (14)

Our study has found an evidence for an association between cholecystectomy and pancreatic cancer development in Algerian population. When all patients presenting pancreatic cancer were involved, an important increase of risk for developing pancreatic cancer after cholecystectomy was seen, our results agree with those of many other authors who found a significant association between cholecystectomy and pancreatic cancer. (14,18,19,20)

Gray et al. attempted to explain this association by controlling pancreatic tumor stages as well as symptoms, and found that survival at 1 year was significantly lower in patients undergoing cholecystectomy (OR, 0.75; 95% CI, 0.58-0.97) that recent cholecystectomy was associated with decreased 1-year survival among patients with pancreatic cancer.(14)

Gallbladder removal may occur as a result of gallstones (precipitation of concentrated bile constituents) or gallbladder disease. The secretion of bile, which is produced in the liver and stored and concentrated in the gallbladder, is under the influence of CCK. CCK is released into the blood by duodenal enteroendocrine "I" cells in response to fat entering the small intestine. When CCK binds to its receptors (CCK-A receptors) on the gallbladder, the smooth muscle cells contract and bile is released. Emulsification allows pancreatic lipase, an enzyme secreted in response to CCK, to work more efficiently in digesting or breaking down triglycerides (27). Exogenous or endogenous CCK causes a coordinated action contracting the gallbladder and relaxing the sphincter of Oddi and adjacent segment of the duodenum, resulting in an effective discharge of bile into the duodenum. This observation opposes the view that active sphincter of Oddi contractile activity is necessary for bile flow. Moreover reflux of air and duodenal contents into the common bile duct is observed only after the sphincter of Oddi is severed; (26) thus; *Haddock et al* found that cholecystectomy may increase serum levels of cholecystokinin (CCK) (5) and *Hyvarinen et al.* added that the presumed increased release of CCK following cholecystectomy might contribute to an increased risk for pancreatic cancer risk following gallbladder removal (9).

Some authors hypothesized that the symptoms leading to cholecystectomy were likely the result of pancreatic cancer in the setting of incidental cholelithiasis. Factors most associated with survival are stage of disease at presentation and the margin of resection at operation. (10, 11, 12). *Luman et al.* concluded that cholecystectomy may suppress the normal inhibitory effect of CCK on the Sphincter of Oddi and became a risk factor for pancreatic cancer. (13)

Other investigators, however, have reported that there is no evidence for an association between cholecystectomy and pancreatic cancer as *Hyvarinen* and *Partanen* who noted an increased risk

that disappeared after exclusion of patients with recent surgery. Their suggestion that the symptoms of pancreatic cancer may be falsely interpreted as those of gallbladder disease and that some gallbladders were operated on for the symptoms of cancer. (9).

CCK has been found to be a member of a group of regulatory peptide hormones having a wide range of physiological actions in the gastrointestinal tract, mediated by their receptors distributed throughout the tract. In addition to promoting normal cell proliferation, they have also been shown to stimulate the growth of several neoplasms and their receptors have been found to be expressed in a variety of human neoplastic tissues (21) For this reason, these growth factors and changes in their receptors have become important in oncology. Further, CCK is a potent modulator of gallbladder motility by activating CCK type-A receptor (CCKAR) distributed on gallbladder smooth muscle cells and abnormal processing of the CCKAR gene is associated with gallbladder disease (22). Lowered expression of CCKAR contributes to the hypomotility of the gallbladder in some patients, (23)

Although there is some evidence that early diagnosis and resection can result in improved long-term survival, there is a paucity of specific molecular markers to detect pancreatic cancer or to identify patients at higher risk for cancer development. Further studies of the differential expression of CCK receptors may reveal CCK-A receptors as a useful biomarker for pancreatic cancer diagnosis and management (24)

Conclusion

Pancreatic cancer is still representing a scary malignancy to the public eye, mainly in third world countries where all the limitations and setback are gathered such as unequipped health centers, patients' unawareness, delayed diagnosis, lack of appropriate medical treatments, and insufficient funds for research. The more knowledgeable we are about pancreatic cancer risk factors the better we prevent it.

Acknowledgments

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

Conflict of interest: The authors declare that they have no conflict of interest.

References

1. A. Jemal, R. Siegel, E. Ward, Y.P. Hao, J.Q. Xu, T. Murray and M.J. (2008), Thun, Cancer statistics, *Ca-a Cancer Journal for Clinicians* , 58, 71–96
2. American Cancer Society. Cancer Facts & Figures 2014. Atlanta: American Cancer Society; 2014.
3. Smith BD, Smith GL, Hurria A, Hortobagyi GN, (2009), Buchholz TA. Future of Cancer Incidence in the United States: Burdens Upon an Aging, Changing Nation. *J Clin Oncol.* 27, 58-65.
4. Michaud DS. (2004);Epidemiology of pancreatic cancer. *Minerva Chir* 59; 99–111.

5. Haddock G, Carter DC, (1990), Aetiology of pancreatic cancer. *Br J Surg*, 77, 1159–1166.
6. Rivard N, Guan D, Maouyo D, Grondin G, Berube FL, Morisset J, (1991), Endogenous cholecystokinin release responsible for pancreatic growth observed following pancreatic juice diversion. *Endocrinology*, 129, 2867 –2874
7. Marx M, Gomez G, Lonovics J, Thompson JC, (1987) , Cholecystokinin. In *Gastrointestinal Endocrinology* Thompson JC, Greeley Jr GH, Rayford PL, Townsend Jr CM (eds) pp 213 – 222 New York: McGraw-Hill
8. Ghadimi BM, Horstmann O, Jacobsen K, et al. (2002), Delay of diagnosis in pancreatic cancer due to suspected symptomatic cholelithiasis. *Scand J Gastroenterol* ;37, 1437-9.
9. Hyvarinen H, Partanen S; (1987), Association of cholecystectomy with abdominal cancers. *Hepatogastroenterology*; 34, 280 – 284
10. Wagner M, Redaelli C, Lietz M, et al. (2004), Curative resection is the single most important factor determining outcome in patients with pancreatic adenocarcinoma. *Br J Surg*, 91, 586-94.
11. Sohn TA, Yeo CJ, Cameron JL, et al. (2000), Resected adenocarcinoma of the pancreas-616 patients: Results, outcomes, and prognostic indicators. *J Gastrointest Surg* ,4, 567-79.
12. Ferrone CR, Brennan MF, Gonen M, et al. (2008), Pancreatic adenocarcinoma: The actual 5-year survivors. *J Gastrointest Surg* 12, 701-6.
13. Luman W, Williams AJ, Pryde A, Smith GD, Nixon SJ, Heading RC, Palmer KR (1997), Influence of cholecystectomy on sphincter of Oddi motility. *Gut*, 41, 371 – 374
14. Gray, Stephen H.; Hawn, Mary T.; Kilgore, Meredith L.; Yun, Huifeng; Christein, John D. (2008) Does Cholecystectomy Prior to the Diagnosis of Pancreatic Cancer Affect Outcome?. [The American Surgeon](#), July 2008 Volume 74, Number 7, pp. 602-606 (5)
15. Schiffman SC, Chu KC, Park J et al., (2011), Is prior cholecystectomy associated with decreased survival in patients with resectable pancreatic adenocarcinoma following pancreaticoduodenectomy, *The American Journal of Surgery*, 201, 519-524
16. Smith JP, Salomon TE, Bagheri S, Kramer S. (1990) Cholecystokinin stimulates growth of human pancreatic adenocarcinoma SW-1990. *Dig Dis Sci* 35; 1377-84
17. Shibata, A., Mack, T. M., Paganini-Hill, A., Ross, R. K. and Henderson, B. E. (1994) , A prospective study of pancreatic cancer in the elderly. *Int. J. Cancer*, 58, 46–49. doi: 10.1002/ijc.2910580109
18. Manousos O, Papadimitriou C, Trichopoulos D, (1981) Polychronopoulou A, Koutselinis A, Zavitsanos X. Epidemiologic characteristics and trace elements in pancreatic cancer in Greece. *Cancer Detect Prev* 4, 439-42
19. GuIlo L, Pezzilli R, Morselli-Labate AM. (1996) Risk of pancreatic cancer associated with cholelithiasis, cholecystectomy, or gastrectomy. *Dig Dis Sci*; 41, 1065-8
20. Kalapothaki V, Tzonou A, Hsieh C, Toupadaki N, Karakatsani A, Trichopoulos D. (1993), Tobacco, ethanol, coffee, pancreatitis, diabetes mellitus, and cholelithiasis as a risk factors for pancreatic carcinoma. *Cancer Causes Control*, 4, 375-82.
21. Baldwin GS, Shulkes A. (2007), CCK receptors and cancer. *Curr Top Med Chem*, 7, 1232-1238

22. Miller LJ, Holicky EL, Ulrich CD, Wieben ED. (1995) Abnormal processing of the human cholecystokinin receptor gene in association with gallstones and obesity. *Gastroenterology* 109:1375-1380
23. Ding X, Lu CY, Mei Y, Liu CA, Shi YJ. (2005), Correlation between gene expression of CCK-A receptor and emptying dysfunction of the gallbladder in patients with gallstones and diabetes mellitus. *HepatobiliaryPancreat Dis Int* 4, 295-298
24. David S. Weinberg, Bruce Ruggeri, I Michael T. Barber, Sanjoy Biswas, Sheila Miknyocki, I and Scott A. (1997) Cholecystokinin A and B Receptors Are Differentially Expressed in Normal Pancreas and Pancreatic Adenocarcinoma. *The American Society for Clinical Investigation*, ; vol 100, Number 3, 597–603
25. Lau MK, Davila JA, Shaib YH. (2010) Incidence and survival of pancreatic head and body and tail cancers: a population-based study in the United States. *Pancreas* 39, 458–462. doi: 10.1097/mpa.0b013e3181bd6489
26. T. L. Peeters, G. Vantrappen, and J. Janssens, (1980); “Bile acid output and the interdigestive migrating motor complex in normals and in cholecystectomy patients,” *Gastroenterology*, vol. 79, no. 4, pp. 678–681.
27. Marieb, Elaine N. 1998. *Human Anatomy and Physiology*: 4th ed. Menlo Park, CA

Table 01 : Patients' medical features

Characteristics	Number of cases	Percentage(%)
Sex (n= 87)		
Male	55	63
Female	32	37
Sex ratio	-	1.71
Age		
(> 20)	1	1.14
(21-40)	4	4.6
(41-60)	22	25.2
(61-80)	50	57.4
(< 80)	10	11.5
Smoking History		
Male smoker	21	24.3
Female smoker	0	0
Not mentioned	27	31
Alcohol History		
Alcoholism (only males)	12	13.5
Not mentioned	52	32.5
Tumour site		
Head of the pancreas	80	92
Body of the pancreas	5	5.7
Tail of the pancreas	2	2.3
Histo-pathology		
Moderately differentiated adenocarcinoma	19	22.6
Well differentiated adenocarcinoma	37	43.1
Infiltrant adenocarcinoma	4	4.3
Non differentiated carcinoma	2	2.3
Poorly differentiated carcinoma	3	3.5
Poorly to moderately differentiated adenocarcinoma	22	25.2
Symptoms and signs		
Jaundice	83	96
Abdominal pain	80	91.8
Right hypocondrium pain	81	93.2
Vomiting and nausea	60	68.9
Weight loss	74	85.1
Dark Urine	74	85.1
Pruritus	56	64.8
Acholic stools	69	79.7

Table 02 : Patients' clinical features

Characteristics	Number of cases	Percentage
Medical history		
<i>High blood pressure</i>	21	24.13
Males	12	13.7
Females	9	10.3
<i>Type 1 diabetes</i>	7	8.04
Males	5	5.7
Females	2	2.2
<i>Type 2 Diabetes</i>	15	17.24
Males	8	9.1
Females	9	10.3
<i>Nothing to report</i>	44	50.5
Males	24	27.5
Females	20	23
Surgical history		
<i>Patient who underwent cholecystectomy</i>	31	35.6
Males	19	21.8
Females	12	13.8
Stage of diagnosis (TNM classification)		
Tis	3	3.4
T1	5	5.7
T2	14	16
T3	23	26.4
T4	16	18.4

N1	5	5.7
M1	21	24.1

4.3 Présentation de l'article 3

Immunohistochemical Examination of Cholecystokinin and Gastrin Receptors (CCK-2/gastrin) Expression in Normal and Cancerous Human Exocrine Pancreatic Tissues

Contexte

Dans le tractus gastro-intestinal, la CCK et de la gastrine agissent comme des régulateurs des sécrétions gastriques acides, la vidange gastrique et la motilité de la vésicule biliaire.

Les effets biologiques de la CCK sont médiées par deux récepteurs distincts couplés à la protéine G, la CCK1 (ou CCK-A) et la CCK2 (ou CCK-B), qui peuvent être distingués sur le plan pharmacologique par leur différent degré d'affinité pour la gastrine ; une faible affinité pour la CCK1 et une forte affinité pour la CCK2.

Cependant, chez l'homme ; à la différence de rongeurs, il existe de nombreuses données contradictoires sur l'expression de la CCK2 dans le pancréas humain normal et pathologique.

Plusieurs études soutiennent le rôle de la gastrine, l'hormone digestive et son récepteur couplé à la protéine G (le CCK2R) dans le développement du cancer du pancréas. En revanche, Ohlsson et ces collègues ont indiqué que la gastrine / CCK2 avait aucun effet favorisant sur la croissance des cellules cancéreuses du pancréas humain.

Dans une enquête récente; nous avons soulevé l'hypothèse de la cholécystectomie comme étant un facteur de risque pour le cancer du pancréas en raison de la présence importante de la cholécystectomie dans les antécédents chirurgicaux des patients diagnostiqués avec un cancer pancréatique.

Le but de notre étude était d'évaluer des tissus de pancréas exocrine humain normal et cancéreux et d'étudier l'expression des récepteur CCK2/gastrine. Pour cela ; nous avons effectué un protocole immunohistochimique afin de détecter ces récepteurs ; et d'évaluer le

niveau de l'immunoréactivité des CCK-2/gastrine-R dans les spécimens présélectionnés et faire une étude comparative entre l'expression de ces récepteurs dans les tissus pancréatiques sains et cancéreux.

Résumé des résultats

- L'analyse immunohistochimique a révélé que les récepteurs CCK-2 étaient exprimés au sein des cellules pancréatiques normales et malignes sauf que les niveaux d'immunoréactivité et l'intensité de l'immunocoloration étaient différents dans les deux types de cellules.
- Les récepteurs CCK-2 étaient fortement exprimés dans la zone cytoplasmique et/ou membranaire des cellules cancéreuses.
- 40% des échantillons avaient une immunoréactivité (IR) modérée (+++) et 60% avait une forte IR (++++);
- l'immunocoloration était ainsi très faible dans les cellules normales mais très intense dans les cellules cancéreuses puisque nous avons enregistré une coloration marron foncée de ces dernières.
- Toutefois dans les tissus pancréatiques sains ; l'immunoréactivité avec les CCK2/gastrine-R était plutôt faible; 80% des échantillons avaient une très faible IR (+); et 20% avaient une faible IR (++)
- l'immunocoloration était moins intense que celle des tissus cancéreux; car nous avons noté une coloration brune claire de quelques cellules pancréatiques normales.
- 40% de nos patients avaient subi une cholecystectomie.

- Concernant l'analyse statistique; nous avons fourni un graphique à barres et un SEM pour mieux illustrer la différence entre les tissus normaux et cancéreux.
- L'étude comparative des deux tissus par le Test de t-Student, a révélé que nos variables suivent une distribution normale (prouvé par l'histogramme en forme de cloche) et que le $p < 0,0001$ ce qui représente est une valeur significative; ainsi nous avons conclu que la IR est significativement plus élevé dans les tissus cancéreux par rapport aux tissus sains.

Article 03

Immunohistochemical Examination of Cholecystokinin and gastrin Receptors (CCK-2/gastrin-R) Expression in Normal and Exocrine Cancerous Human Pancreatic Tissues

Authors: Feriel SELLAM¹; Noria HARIR^{1,2}, Méguit.B.KHALED¹, Nesrine.M. MRABENT¹, Houria BELKRALLADI³; Abdelnacer TOU^{3,4}; Mustapha DIAF¹; Rachida SALAH¹; Soraya Moulessehoul¹

¹: Department of Biology, Djillali Liabes University of Sidi bel Abbès, Algeria

²: Laboratory of Molecular Microbiology, Proteomics and Health

³: Department of Pathology; Hassani Abdelkader University Hospital ; Sidi bel Abbès, Algeria

⁴: Laboratory of Environnement and Cancer

Abstract

Objective: Evaluating tissue samples of normal and exocrine cancerous human pancreas on the expression of CCK2/gastrin receptor. We performed an immunohistochemical protocol that allows efficient detection of this receptor in formalin-fixed, paraffin-embedded human tissues.

Methods: Twenty (20) paraffin blocks of pancreatic tissue sections were collected from the Departments of pathology, Central University Hospital of Sidi-bel-Abbès City (Western Algeria) for the period 2004-2013; ten (10) of them were normal pancreatic samples; and ten (10) cancerous pancreatic sections. The samples were studied using an immunohistochemical protocol for CCK-2/gastrin receptors.

Results: Our immunohistochemical analysis revealed that CCK-2/gastrin receptors were expressed in both normal and malignant pancreatic cells but with different immunoreactivity levels and different immunostaining intensity i.e CCK-2/gastrin receptors were highly expressed within the cytoplasmic area of cancerous cells; 40% of the samples had an immunoreactivity (IR) of (+++) and 60% (++++); the immunostaining was as well very intense since we reported a dark brown staining of the malignant cells. However; in normal pancreatic tissues; CCK-2/gastrin receptors IR levels were very low; 80% of the samples had an IR of (+); and 20% had (++) and the immunostaining was less intense; we noted a light brown staining of few normal pancreatic cells.

Conclusion: The gastrointestinal peptides CCK could be very interesting targets for exocrine pancreatic cancer therapies; thus further surveys such as western blotting and RTPCR could indentify CCK-2/gastrin receptors as a helpful biomarker for exocrine pancreatic cancer diagnosis and treatment.

Keywords: Pancreatic cancer; CCK-2/gastrin-R, expression; immunohistochemistry.

Introduction

A role for cholecystokinin (CCK) and gastrin in the normal and diseased pancreas, particularly in pancreatic cancer, has been claimed for many years (1). In the gastrointestinal tract, CCK and gastrin act as regulators of gastric acid secretion, gastric emptying and gall bladder motility (2).

The biological effects of CCK are mediated by two distinct G protein-coupled receptors, CCK1 (formerly CCK-A) and CCK2 (formerly CCK-B), which can be distinguished pharmacologically by their low affinity (CCK1) versus high affinity (CCK2) for gastrin (3; 4).

In humans, however, in contrast to rodents, there are numerous conflicting data on CCK2 expression in normal and diseased human pancreas (5; 6).

Several lines of evidence support the role of gastrin, the digestive peptide hormone and its G protein-coupled receptor (CCK2/gastrin-R) in pancreatic cancer development. In contrast, Ohlsson and co-workers reported that gastrin/cck2 had no growth promoting effect on human pancreatic cancer cell-lines derived from pancreatic cancer biopsy specimens obtained at surgery (1; 7).

In a recent survey; we suspected that cholecystectomy could be a risk factor for pancreatic cancer due to the increase serum levels of CCK and the suppression of the normal inhibitory effect of cholecystokinin (26. 27. 28)

The aim of our study was to evaluate tissue samples of normal and exocrine cancerous human pancreas on the expression of CCK2/gastrin receptor. We performed an immunohistochemical protocol that allows efficient detection of this receptor in formalin-fixed, paraffin-embedded human tissues.

Materials and Methods

Twenty (20) paraffin blocks of pancreatic tissue sections were collected from the Departments of pathology, Central University Hospital of Sidi Bel Abbes City (Western Algeria) for the period 2004-2013; 10 of them were normal pancreatic tissues that were taken from patients with pancreatitis ; and 10 cancerous pancreatic sections among them 9 pancreatic adenocarcinomas and 1 solid pseudopapillary pancreatic tumour. These specimens were paraffin embedded in the same center. The cases were stained with hemotoxyline and eosin (H&E) for routine histological examination. An absolute confidentiality of the patients' vital information was maintained for ethical purposes and an ethical approval was obtained from institutions in which the study was carried out.

Immunohistochemistry protocol

We used the following Abcam protocol of immunohistochemistry: formalin-fixed paraffin-embedded tissue sections were deparaffinized and rehydrated then enough drops of Hydrogen Peroxide Block were added to cover the sections, they were incubated for 10 minutes then washed twice in buffer Phosphate Buffered Saline (PBS). 10X PBS (0.1M PBS, pH 7.4) a pretreatment was performed then the sections were washed 3 times in buffer.

Protein Block was applied and the sections were incubated for 10 minutes at room temperature to block nonspecific background staining then washed once in buffer. Anti-CCK-2R antibody was applied (1:100 dilution Rabbit polyclonal; Abcam, Cambridge, UK) then incubated for two hours. Tissues were washed 3 times in buffer then complement was applied and incubated for 10 minutes at room temperature. Sections were washed twice in buffer then HRP conjugate was applied and incubated for 15 minutes at room temperature; they were rinsed 4 times in buffer, then 30 µl (1 drop) DAB Chromogen were added to 1.5 ml (50 drops) of DAB Substrate and were applied to tissue and were incubated for 1-10 minutes then rinsed 4 times in buffer. Counterstain was applied then the tissues were dehydrated.

Morphometric Evaluation

All the stained slides were examined under light microscopy and only the slides with CCK2/gastrin receptor immunoreactivities (IRs) in tumor cell were identified as positive. The numbers of positive tumor cells in five independent high-power fields with abundant distribution were counted and scored as follows: (–), no immunoreactive cells; (+), one to five cells very low immunoreactivity ; (++) , five to ten cells, low immunoreactivity ; (+++) , less than ten cells but <1% moderate immunoreactivity ; over ten of total cell mass; (++++), >1% high immunoreactivity (8).

Statistical Analysis

Concerning the statistical analytical study, the raw data were summarized using rates and cross-tabulations; bar graphs and SEM. Associations between categorical parameters were tested using Student's t-test. Results were presented using Student's t-distribution as well “*p*” value calculation which level's of significance was limited by the rate of 5%. Data were processed and analyzed via SPSS 20.0 (Statistical Package for the Social Sciences, IBM Corporation; Chicago, IL. August 2011).

Results

Ten patients with pancreatic cancer; and ten samples of normal pancreatic tissue were included in the current study. Median age of the patients with pancreatic cancer was 49 years (range, 28-70). There were 6 (60 %) males and 4 (40%) females; male to female ratio was about 1.5 (Table 01). The most common site of the tumor was the head of the pancreas which was involved in 9 cases (90%), followed by the body and the tail of the pancreas involved in 1 case (10%).

As shown in table 01 the most common histological type was well differentiated adenocarcinoma 4 cases (40%); moderately differentiated adenocarcinoma 2 cases (20%); poorly differentiated adenocarcinoma 2 cases (20%); infiltrative ductal adenocarcinoma 1 case (10%) and solid pseudopapillary tumor 01 case (10%). (Figure 01. 02)

Concerning the normal samples; the median age of the patients was of 45 years (range, 25-65); there were 5 males (50%) and 5 females (50%) male to female ratio of 1.

Our immunohistochemical analysis revealed that CCK-2/gastrin receptors were expressed in both normal (Figure 03) and malignant pancreatic cells (Figure 01) but with different

immunoreactivity levels (Figure 04.05.06) and different immunostaining intensity (Table 03) i.e CCK-2/gastrin receptors were highly expressed within the cytoplasmic or/and the membrane area of cancerous cells and in islets as well; 40% of the samples had an IR of (+++) and 60% (++++). (Figure 06); the immunostaining was as well very intense since we reported a dark brown staining of the malignant cells (Table 02; Figure 01.02) However; in normal pancreatic tissues; CCK-2/gastrin receptors immunoreactivity levels were very low; 80% of the samples had an IR of (+); and 20% had (++) and the immunostaining was less intense; we noted a light brown staining of some normal pancreatic cells (Figure 03).

Concerning the statistical analysis; we provided a bar graph and SEM to better illustrate the difference between normal and cancer. In the comparison chart between normal and cancerous tissues by Student's t-test, our variables follow a normal distribution (proven by the bell-shaped histogram) (Figure 04. 05. 06); and p was <0.0001 which is a significant value; thus we concluded that IR is significantly higher in cancer tissues compared to normal. (Table 03).

Discussion

Several inquiries were performed in order to study the distribution of cholecystokinin receptors throughout the gastrointestinal tract and diseased pancreas; nevertheless; very few were made to compare immunohistochemical expression of cholecystokinin-2 receptors in normal pancreatic human cells and malignant ones.

The data presented evaluate the expression of CCK-2/gastrin receptors by immunohistochemistry in samples from normal and exocrine cancerous human pancreatic tissue specimens. They demonstrate that the human CCK-2/gastrin receptors are distributed unequivocally in the two kinds of the studied tissues; they are over-expressed in pancreatic cancerous cells and lowly expressed in normal pancreatic tissues.

Some previous surveys reported by means of Northern blotting and RT-PCR that CCK-2/gastrin receptors are expressed in normal human pancreas; (1; 9; 10) which concord to ours results; however those studies didn't bring accurate results about the immunohistochemical levels of expression in normal and exocrine cancerous pancreatic tissues.

Similar to our findings as well those of Goetze et al. who detected low levels of gastrin mRNA (CCK2 homologue) in normal human pancreas, but gastrin peptides were not present. In contrast, pancreatic cancer cells and cell lines expressed high levels of CCK2 and gastrin mRNA as well as gastrin peptides. (1; 10; 17; 18)

Gastrin has been shown to stimulate the growth of human pancreatic adenocarcinoma and pancreatic cancer cell-lines. Based on these findings, it was suggested that human pancreatic adenocarcinomas might be stimulated by an autocrine loop involving co-expression of CCK2/gastrin-R and gastrin. Initially it was thought that the mechanism by which CCK served to potentiate carcinogenesis was by interplay with inflammation in the pancreatic microenvironment. But with the recent findings of CCK receptors on early PanIN (pancreatic intraepithelial neoplasia) lesions and on stellate cells, the question has been raised that perhaps CCK actions are not the result of cancer but an early driving promoter of cancer (1; 10; 19; 20; 48; 49).

Furthermore; other authors found that gastrin and CCK-2/gastrin receptors are up-regulated in human pancreatic adenocarcinoma and also in preneoplastic lesions (11; 12; 47). It was reported as well in Elas-CCK2 transgenic mice, expressing functional human CCK2/gastrin-R in pancreatic exocrine cells, an increased pancreatic growth, an acinar to ductal transdifferentiation, postulated to be a preneoplastic step in pancreatic carcinogenesis and the development of tumours (13; 14).

CCK2/gastrin overexpression may lead it to play the role of endogenous growth factor pancreatic cancerous cells (24) due to the several signaling pathways activated by the CCK2/gastrin-R that have been implicated in the proliferative effects or cell migration induced by gastrin. They include: MAP-kinases; (21; 22) the phosphatidylinositol 3-kinase and the JAK2/STAT3 pathway (15, 23). In addition, Src family tyrosine kinases and p125FAK have also been shown to play a crucial role in these biological effects of gastrin (16).

What could be interesting about a comparative study like ours between normal and cancerous pancreatic tissues is first, the presence of CCK2/gastrin R in nonneoplastic tissue raises the possibility that locally mediated growth by gastrin/CCK2 may not be of relevance only in the tumor tissue, but also could promote growth of the surrounding parenchyma. Furthermore, CCK2 gene expression is increased not only in the neoplastic pancreas but also in the morphologically normal resection tissue. The regulation of expression therefore could be mediated from the neoplastic cells to the nearby normal cells by some factor, or increased gastrin expression in pancreatic exocrine cells may be a general response to any form of damage (1; 25).

To date, at least 14 epidemiologic studies have investigated the associations of cholecystectomy and/or gallstones with pancreatic cancer risk (29. 30. 31. 32. 33. 34. 35. 36. 37. 38. 39. 40. 41. 42). As we discussed it in a previous study; (26) exogenous or endogenous CCK causes a coordinated action contracting the gallbladder and relaxing the sphincter of Oddi and adjacent segment of the duodenum, resulting in an effective discharge of bile into the duodenum. This observation opposes the view that active sphincter of Oddi contractile activity is necessary for bile flow. Moreover, reflux of air and duodenal contents into the common bile duct is observed only after the sphincter of Oddi is severed [43]; thus, Haddock et al. found that cholecystectomy may increase serum levels of CCK [27] and Hyvarinen et al. added that the presumed increased release of CCK following cholecystectomy might contribute to an increased risk for pancreatic cancer risk following gallbladder removal [28]. Some authors hypothesized that the symptoms leading to cholecystectomy were likely the result of pancreatic cancer in the setting of incidental cholelithiasis [44–45]. Luman et al. concluded that cholecystectomy may suppress the normal inhibitory effect of CCK on the Sphincter of Oddi and became a risk factor for pancreatic cancer (46).

Conclusion

The gastrointestinal peptide CCK could be very interesting target for exocrine pancreatic cancer therapies; thus further surveys about immunohistochemical expression of cholecystokinin receptors as well as western blotting and RTPCR could indentify CCK-2/gastrin receptors as a helpful biomarker for exocrine pancreatic cancer diagnosis and treatment.

Acknowledgments

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

Conflict of interest: The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- 1- Goetze JP, Nielsen FC, Burcharth F, Rehfeld JF. Closing the gastrin loop in pancreatic carcinoma: coexpression of gastrin and its receptor in solid human pancreatic adenocarcinoma. *Cancer* 2000;88:2487–2494.
- 2- Noble F, Wank SA, Crawley JN, Bradwejn J, Seroogy KB, Hamon M, Roques BP; international Union of Pharmacology. XXI. Structure, distribution, and functions of cholecystokinin receptors. *Pharmacol Rev*; 1999; 51:745-81
- 3- Kopin AS, Lee YM, McBride EW, Miller LJ, Lu M, Lin HY, Kolakowski LF, Jr., Beinborn M; Expression cloning and characterization of the canine parietal cell gastrin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*1992; 89:3605-9
- 4- . Wank SA, Pisegna JR, de Weerth A; Brain and gastrointestinal cholecystokinin receptor family: structure and functional expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992 ; 89:8691-5
- 5- Zhou W, Povoski SP, Tsuei BJ, Bell RH. Gene expression of the cholecystokinin-A receptor and the cholecystokinin-B (gastrin) receptor in human pancreatic carcinomas. *Gastroenterology* 1994; 106:A331 (abstr).
- 6- Reubi JC, Waser B, Gugger M, Friess H, Kleeff J, Kaye H, et al. Distribution of CCK1 and CCK2 Receptors in Normal and Diseased Human Pancreatic Tissue; *GASTROENTEROLOGY* 2003;125:98–106
- 7- Ohlsson B, Fredang N, Axelson J: The effect of bombesin, cholecystokinin, gastrin, and their antagonists on proliferation of pancreatic cancer celllines. *Scand J Gastroenterol* 1999, 34:1224-1229.
- 8- Tezel E, Nagasaka T, Tezel G, Nakao A. ; Characterization of scattered neuroendocrine cells in ductal carcinoma of the pancreas. *Pancreas*; 2002; 25:136–141
- 9- Monstein HJ, Nylander AG, Salehi A, Chen D, Lundquist I, Hakanson R: Cholecystokinin-A and cholecystokinin-B/gastrin receptor mRNA expression in the gastrointestinal tract and pancreas of the rat and man. A polymerase chain reaction study. *Scand J Gastroenterol* 1996, 31:383-390.

- 10- Anna Ryberg, Kurt Borch and Hans-Jürg Monstein.: Expression of multiple forms of 3'-end variant CCK2 receptor mRNAs in human pancreatic adenocarcinomas. *BMC Research Notes* 2011; 4:131.
- 11- Caplin M, Savage K, Khan K, Brett B, Rode J, Varro A, Dhillon A. Expression and processing of gastrin in pancreatic adenocarcinoma. *Br J Surg* 2000; 87: 1035-1040
- 12- Smith JP, Verderame MF, McLaughlin P, Martenis M, Ballard E and Zagon IS: Characterization of the CCK-C (cancer) receptor in human pancreatic cancer. *Int J Mol Med* 10: 689-694, 2002
- 13- Clerc P, Saillan-Barreau C, Desbois C, Pradayrol L, Fourmy D, Dufresne M. Transgenic mice expressing cholecystokinin 2 receptors in the pancreas. *Pharmacol Toxicol* 2002; 91: 321-326
- 14- Clerc P, Leung-Theung-Long S, Wang TC, Dockray GJ, Bouisson M, Delisle MB, Vaysse N, Pradayrol L, Fourmy D, Dufresne M. Expression of CCK2 receptors in the murine pancreas: proliferation, transdifferentiation of acinar cells, and neoplasia. *Gastroenterology* 2002; 122: 428-437
- 15- Ferrand A, Kowalski-Chauvel A, Bertrand C, Escrieut C, Mathieu A, Portolan G, Pradayrol L, Fourmy D, Dufresne M, Seva C. A novel mechanism for JAK2 activation by a G protein-coupled receptor, the CCK2R: implication of this signaling pathway in pancreatic tumor models. *J Biol Chem* 2005; **280**: 10710-10715
- 16- Daulhac L, Kowalski-Chauvel A, Pradayrol L, Vaysse N, Seva C. Gastrin stimulates the formation of a p60Src/p125FAK complex upstream of the phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathway. *FEBS Lett* 1999; **445**: 251-255
- 17- Smith JP, Hamory MW, Verderame MF, Zagon IS: Quantitative analysis of gastrin mRNA and peptide in normal and cancerous human pancreas. *Int J Mol Med* 1998, 2:309-315
- 18- Smith JP, Shih A, Wu Y, McLaughlin PJ, Zagon IS: Gastrin regulates growth of human pancreatic cancer in a tonic and autocrine fashion. *Am J Physiol* 1996, 270:R1078-1084.
- 19- Yassin RR: Signaling pathways mediating gastrin's growth-promoting effects. *Peptides* 1999, 20:885-898
- 20- Smith JP, Fantaskey AP, Liu G, Zagon IS: Identification of gastrin as a growth peptide in human pancreatic cancer. *Am J Physiol* 1995, 268:R135-141.
- 21- Daulhac L, Kowalski-Chauvel A, Pradayrol L, Vaysse N, Seva C. Src-family tyrosine kinases in activation of ERK-1 and p85/p110-phosphatidylinositol 3-kinase by G/CCKB receptors. *J Biol Chem* 1999; 274: 20657-20663
- 22- Todisco A, Takeuchi Y, Urumov A, Yamada J, Stepan VM, Yamada T. Molecular mechanisms for the growth factor action of gastrin. *Am J Physiol* 1997; **273**: G891-G898
- 23- Cayrol C, Bertrand C, Kowalski-Chauvel A, Daulhac L, Cohen-Jonathan-Moyal E, Ferrand A, Seva C; α V integrin: A new gastrin target in human pancreatic cancer cells; *World J Gastroenterol* 2011 October 28; 17(40): 4488-4495

- 24- Matters GL, McGovern C, Harms JF, Markovic K, Anson K, Jayakumar C et al; Role of endogenous cholecystokinin on growth of human pancreatic cancer; INTERNATIONAL JOURNAL OF ONCOLOGY 38: 593-601, 2011
- 25- Bardram L. Gastrin in non-neoplastic pancreatic tissue from patients with and without gastrinomas. *Scand J Gastroenterol* 1990;25:935–43.
- 26- Sellam F; Harir N; Khaled M B; Mrabent N M; Salah R; Diaf M ; Epidemiology and Risk Factors for Exocrine Pancreatic Cancer in a Northern African Population; J Gastrointest Canc; 2015. 42: 126-130
- 27- Haddock G, Carter DC. Aetiology of pancreatic cancer. *Br J Surg.* 1990;77:1159–66.
- 28- LumanW, Williams AJ, Pryde A, Smith GD, Nixon SJ, Heading RC, et al. Influence of cholecystectomy on sphincter of Oddi motility. *Gut.* 1997;41:371–4.
- 29- Lin RS, Kessler II; A multifactorial model for pancreatic cancer in man. Epidemiologic evidence. *JAMA* 1981; 245: 147–152.
- 30- Ekblom A, Yuen J, Karlsson BM, McLaughlin JK, Adami HO Risk of pancreatic and periampullar cancer following cholecystectomy: a population-based cohort study. *Dig Dis Sci* 1996; 41: 387–391.
- 31- Gullo L, Pezzilli R, Morselli-Labate AM. Italian Pancreatic Cancer Study G ; Risk of pancreatic cancer associated with cholelithiasis, cholecystectomy, or gastrectomy. *Dig Dis Sci*; 1996; 41: 1065–1068.
- 32- Chow WH, Johansen C, Gridley G, Møller M, Olsen JH, Fraumeni JF Jr. Gallstones, cholecystectomy and risk of cancers of the liver, biliary tract and pancreas. *Br J Cancer* 1999; 79: 640–644.
- 33- Coughlin SS, Calle EE, Patel AV, Thun MJ. Predictors of pancreatic cancer mortality among a large cohort of United States adults. *Cancer Causes Control* 2000. 11: 915–923.
- 34- Silverman DT, Schiffman M, Everhart J, Goldstein A, Lillemoe KD, Swanson GM, et al; Diabetes mellitus, other medical conditions and familial history of cancer as risk factors for pancreatic cancer. *Br J Cancer*; 1999; 80: 1830–1837.
- 35- Talamini G, Falconi M, Bassi C, Casetti L, Fantin A, Salvia R, Pederzoli P: Previous cholecystectomy, gastrectomy, and diabetes mellitus are not crucial risk factors for pancreatic cancer in patients with chronic pancreatitis. *Pancreas* 2001; 23: 364–367.
- 36- Ye W, Lagergren J, Nyren O, Ekblom A Risk of pancreatic cancer after cholecystectomy: a cohort study in Sweden. *Gut* 2001; 49: 678–681.
- 37- Lin Y, Tamakoshi A, Kawamura T, Inaba Y, Kikuchi S, Motohashi Y, Kurosawa M, Ohno Y Risk of pancreatic cancer in relation to alcohol drinking, coffee consumption and medical history: findings from the Japan collaborative cohort study for evaluation of cancer risk. *Int J Cancer* 2002; 99: 742–746.
- 38- Schernhammer ES, Michaud DS, Leitzmann MF, Giovannucci E, Colditz GA, Fuchs CS Gallstones, cholecystectomy, and the risk for developing pancreatic cancer. *Br J Cancer* 2002; 86: 1081–1084.
- 39- Stolzenberg-Solomon RZ, Pietinen P, Taylor PR, Virtamo J, Albanes D A prospective study of medical conditions, anthropometry, physical activity, and pancreatic cancer in male smokers (Finland). *Cancer Causes Control* 2002; 13: 417–426.

- 40- Hassan MM, Bondy ML, Wolff RA, Abbruzzese JL, Vauthey JN, Pisters PW, Evans DB, Khan R, Chou TH, Lenzi R, Jiao L, Li D Risk factors for pancreatic cancer: case-control study. *Am J Gastroenterol* 2007; 102: 2696–2707.
- 41- Lipworth L, Zucchetto A, Bosetti C, Franceschi S, Talamini R, Serraino D, McLaughlin JK, La Vecchia C, Negri E (2011) Diabetes mellitus, other medical conditions and pancreatic cancer: a case-control study. *Diabetes Metab Res Rev* 27: 255–261.
- 42- J Zhang, A E Prizment, I B Dhakal and K E Anderson, Cholecystectomy, gallstones, tonsillectomy, and pancreatic cancer risk: a population-based case-control study in Minnesota; *BJC*; (2014) 110, 2348–2353; doi: 10.1038/bjc.2014.154
- 43- Peeters TL, Vantrappen G, Janssens J. Bile acid output and the interdigestive migrating motor complex in normals and in cholecystectomy patients. *Gastroenterology*. 1980;79(4):678–81.
- 44- Wagner M, Redaelli C, Lietz M, Seiler CA, Friess H, Büchler MW. Curative resection is the single most important factor determining outcome in patients with pancreatic adenocarcinoma. *Br J Surg*. 2004;91:586–94.
- 45- Ferrone CR, Brennan MF, Gonen M, Coit DG, Fong Y, Chung S, et al. Pancreatic adenocarcinoma: the actual 5-year survivors. *J Gastrointest Surg*. 2008;12:701–6.
- 46- Luman W, Williams AJ, Pryde A, Smith GD, Nixon SJ, Heading RC, et al. Influence of cholecystectomy on sphincter of Oddi motility. *Gut*. 1997;41:371–4
- 47- Smith JP, Cooper TK, McGovern CO, Gilius EL, Zhong Q, Liao J, et al. Cholecystokinin receptor antagonist halts progression of pancreatic cancer precursor lesions and fibrosis in mice. *Pancreas*. 2014 Oct;43(7): 1050-1059. PMID: 25058882.
- 48- Smith JP, Solomon TE. Cholecystokinin and pancreatic cancer: the chicken or the egg? *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2014 Jan;306(2):G91-G101. PMID: 24177032
- 49- Phillips AP, Yang L, Shulkes A, Vonlaufen A, Poljak A, Bustamante S, et al. Pancreatic stellate cells produce acetylcholine and may play a role in pancreatic exocrine secretion; *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Oct 5; 107(40): 17397–17402.

Table 01: Patients' clinical and histological characteristics

Characteristics	Normal samples		Cancerous samples	
	Number 10	Percentage 50	Number 10	Percentage 50
Sex (n= 20)				
Male	5	50	6	60
Female	5	50	4	40
Sex ratio	-	1.7	-	1.5
Median Age	45	-	49	-
Histo-pathology				
Well differentiated adenocarcinoma	-	-	4	40
Moderately differentiated adenocarcinoma	-	-	2	20
Poorly differentiated adenocarcinoma	-	-	2	20
Infiltrative ductal adenocarcinoma	-	-	1	10
Solid pseudopapillary tumor	-	-	1	10

Table 02: IHC intensity staining

	Light staining	Dark staining
Normal cells	100%	0%
Cancerous cells	10%	90%

Table 03: Comparison of immunoreactivity rates using Student-t test

	Tissue	Min.	Max.	Mean	Standard Deviation	t-value	p-value	df	Confidence interval
Immunoreactivity rate (%)	Normal cells	0.20	0.60	0.430	0.141	-7.430	<0.0001	18	95%
	Cancerous cells	0.80	1.50	1.180	0.285				

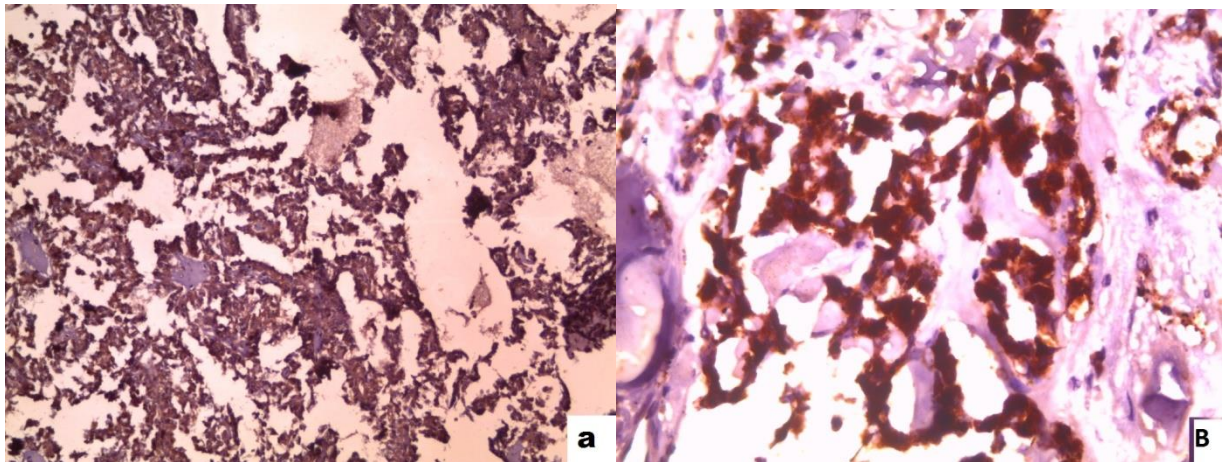


Figure 01 : Histological examination demonstrating a solid pattern with non infiltrant pseudopapillary cores; and the immunohistochemical analysis is revealing that the tumor cells are positive for CCK-B receptors which were highly expressed within the cytoplasmic area of the cells (**a** magnification X100) (**b** magnification X 200)

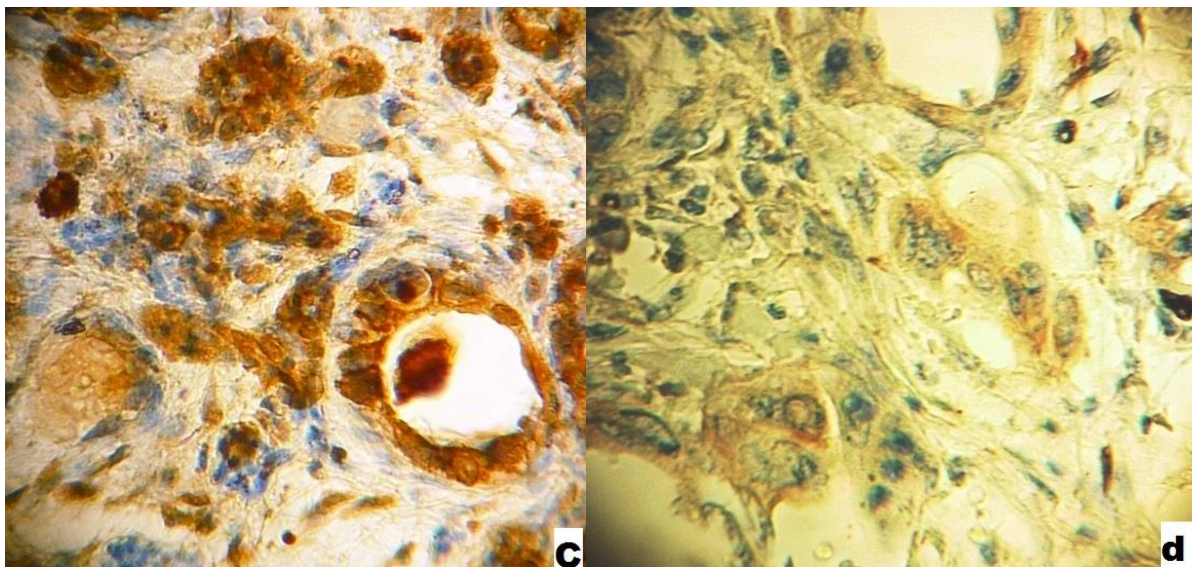


Figure 02 : Histological examination demonstrating: **c)** a well differentiated adenocarcinoma and **d):** a moderately differentiated adenocarcinoma; the immunohistochemical analysis is revealing that the tumor cells are positive for CCK-B receptors which were highly expressed within the membrane/cytoplasmic area of the cells (magnification X200)

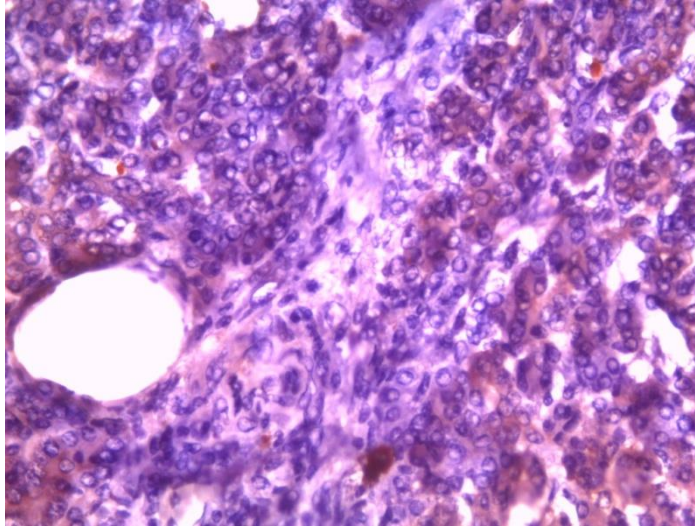


Figure 03: Histological examination demonstrating normal pancreatic human cells with a low expression of CCK-B receptors within the cytoplasmic area (magnification X 200)

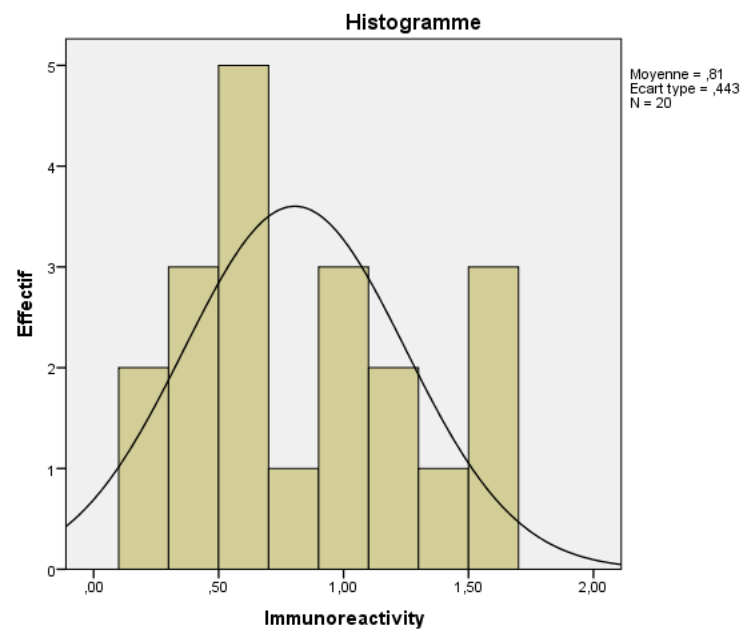


Figure 04: Normality Test for Immunoreactivity between Normal and Cancerous Tissues

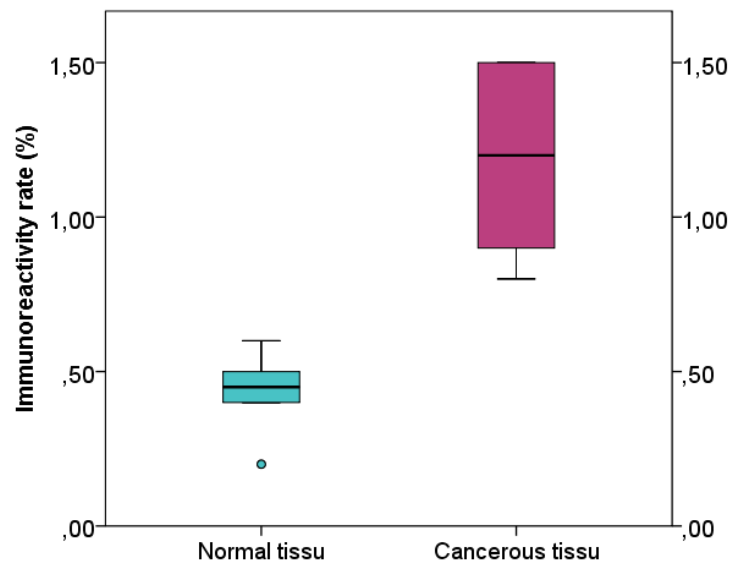


Figure 05: Bar graph for immunoreactivity rates between normal and cancerous tissues

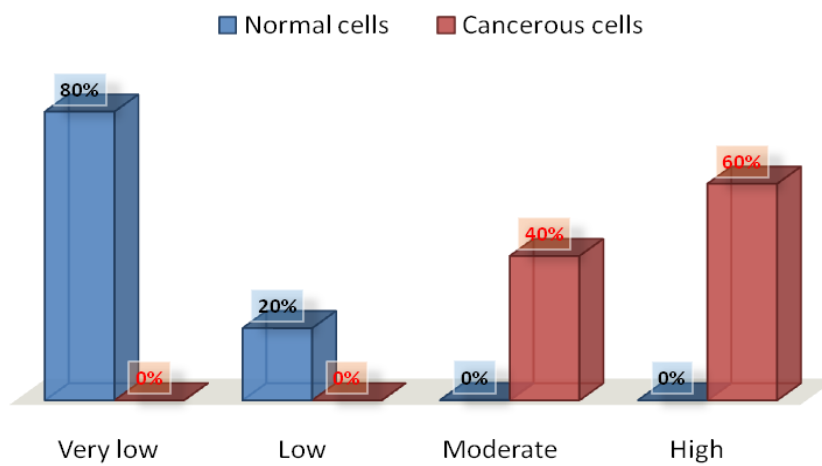


Figure 06: Immunoreactivity distribution between normal and cancerous tissues (SEM)

4.4 Présentation de l'article 4

Solid Pseudopapillary Pancreatic Tumor and CCK-2R/gastrin-R Immunodistribution in a 28-years-old North African woman

Soumis à publication

Contexte:

Les tumeurs pseudopapillaires solides (TSP) du pancréas sont très rare avec une incidence déclarée de 0,13% à 2,7% de toutes les tumeurs pancréatiques. Cette tumeur est connue sous d'autres termes, tels que la tumeur de Frantz, la tumeur kystique solide, la tumeur kystique papillaire, ou encore la tumeur épithéliale solide et papillaire.

Elle est très souvent diagnostiquée chez les jeunes femmes vingtenaire et trentenaire; ce qui suggère que cette tumeur est associée à des hormones féminines et leurs récepteurs tels que les œstrogènes, la progestérone et les opioïdes. Plusieurs études soutiennent le rôle des récepteurs de la cholécystokinine 2/gastrine (CCK-2R/gastrine-R) couplé à la protéine G et la gastrine dans le développement du cancer du pancréas.

Un variant d'épissage de la CCK-2R/gastrine-R a été identifiée, ce dernier a une activité constitutive ; et il est exclusivement exprimé dans certains cancers humains comme le cancer du côlon et du pancréas. En outre; certaines études ont indiqué que l'administration exogène de la CCK à des cellules cancéreuses pancréatiques stimule la croissance de la tumeur maligne.

Nous rapportons un cas d'une jeune femme Algérienne de 28ans sans aucun antécédent médical ou chirurgical diagnostiquée avec une tumeur pancréatique pseudopapillaire solide. Notre étude immunohistochimique a montré que les cellules tumorales étaient positives aux récepteurs CCK-2/gastrine et qui étaient fortement exprimés au sein de la région cytoplasmique

des cellules. Par conséquent, nous avons tenté de soulever une hypothèse et d'établir un lien entre certaines hormones femelles qui représente de puissants régulateurs de l'expression de la CCK et leur possible impact sur le développement de tumeurs pancréatiques pseudopapillaires solides chez les jeunes femmes.

Résumé des résultats

- L'examen histologique a démontré une tumeur solide non infiltrante pseudopapillaires; la tumeur a été limitée au pancréas.
- L'analyse immunohistochimique a révélé que les cellules tumorales étaient positives aux les récepteurs CCK-2/gastrine qui étaient fortement exprimés au sein de la région cytoplasmique des cellules, et qui avait une forte immunoréactivité (IR) (++++).
- L'immunocoloration était aussi très intense puisque nous avons observé une coloration marron foncé des cellules malignes.

Solid Pseudopapillary Pancreatic Tumor and CCK-2/gastrin-R immuno-distribution in a 28-years-old North African woman

Authors: Feriel SELLAM¹, Méghit.B.KHALED¹, Noria HARIR^{1,2}; Nesrine.M. MRABENT¹; Abdenacer TOU³; Houria BELKRALLADI³ Rachida SALAH¹

¹: Department of Biology, Djillali Liabes University of Sidi bel Abbès, Algeria

²: Laboratory of Molecular Microbiology, Proteomics and Health

³: Department of Pathology; Hassani Abdelkader University Hospital ; Sidi bel Abbès, Algeria

Abstract

The presence of a large bulky pancreatic tumour in a young female should raise suspicions of the diagnosis of solid-pseudopapillary tumour of the pancreas.

Solid pseudopapillary neoplasms of the pancreas are uncommon, accounting for only 1-2% of all pancreatic neoplasms. These tumors are being detected at an increased rate, probably due to the increased awareness and the liberal use of imaging.

We report a case of a 28-year-old North African woman with no prior medical or surgical history diagnosed with solid pseudopapillary pancreatic tumor. Our immunohistochemical study demonstrated that the tumor cells were positive for CCK-2/gastrin receptors and that were highly expressed within the cytoplasmic area of the cells. Hence we attempted to raise a hypothesis and to establish a link between some female hormones which represents powerful regulators of the expression of CCK and their possible impact on the development of solid pseudopapillary pancreatic tumours in young women.

Keywords: solid-pseudopapillary tumour; pancreas; CCK; CCK-2/gastrin-R; North African woman

Introduction

Solid Pseudopapillary Tumor (SPT) of the pancreas is a very rare entity with a reported incidence of 0.13% to 2.7% of all pancreatic tumors (1) this tumor was once described in many other terms, such as Frantz's tumor, solid and cystic tumor, papillary cystic neoplasm, and solid and papillary epithelial neoplasm. (2)

It is almost exclusively seen in females and occurs in the second or third decades of life; (3) suggesting that this tumor is associated with some female hormones and their receptors such as estrogen, progesterone and opioids (4, 5) Several lines of evidence support the role of G protein-coupled receptor cholecystokinin 2 and gastrin (CCK-2R/gastrin-R) in pancreatic cancer development. (6, 7)

In order to study immunohistochemical features of G protein coupled CCK2/gastrin receptors in this kind of rare tumors, we herein present a case of solid pseudopapillary pancreatic tumor associated with a positive CCK-2/gastrin-R reactivity.

Case Report

A 28-year-old North African woman with no prior medical or surgical history presented with complaints of epigastric and right upper quadrant (RUQ) pain and decreased appetite during one month. Her pulse rate was 72 min⁻¹ and her blood pressure was 110/60 mmHg. There was no precipitating or aggravating factor and no evidence of jaundice. On physical examination her abdomen was soft, non-tender and non-distended; there were no palpable masses and bowel sounds were audible. Other physical examinations were unremarkable. Laboratory data including hematology, blood chemistry including amylase and lipase, as well as tumor markers were within the reference limits (CEA = 0.692 ng/ml, CA 125 = 12.27 U/ml, and CA 19-9 = 22.59 U/ml).

Ultrasound imaging (Figure 1) showed a solid heterogeneous mass at the level of left quadrant measuring 124 mm.

CT scan of the abdomen (Figure 2) revealed a voluminous hypoattenuating mass in the tail and the body of the pancreas, measuring 127mm x 87mm with multiple intratumoral vessels.

After a surgical biopsy was performed; histological examination demonstrated a solid pattern with non infiltrant pseudopapillary cores; the tumor was found to be confined to the pancreas. (Figure 03) Our immunohistochemical analysis revealed that the tumor cells were positive for CCK-2/gastrin receptors that were highly expressed within the cytoplasmic area of the cells. (Figure 03)

Discussion

Solid pseudopapillary tumors of the pancreas affect primarily young women, suggesting that hormonal factors contribute to the tumor growth (4, 5). In the current study, symptoms were reported at a woman of 28 years of age, an age at which female hormones and their receptors such as progesterone, estrogen are very active and might play a role in the development of solid pseudopapillary tumor of the pancreas (8).

Pancreatic cancer risk was elevated in women with early age at menarche, as noted previously (9; 10), sex steroid receptors in normal and neoplastic pancreatic tissue have been found in animals and in humans (11. 12); the incidence of pancreatic cancer is lower in female than in male rodents (13), and estrogens and/or castration have an inhibitory effect on the early stages of pancreatic carcinogenesis (14).

Some epidemiological studies have assessed the role of hormone-related factors in the etiology of pancreatic cancer (9,10)

The exact cell of origin is still disputed (15); the strong female predilection (16. 17) and the reported expression of progesterone receptors in some SPT cases (18) may suggest an association between female sex hormones and tumorigenesis, but a causal relationship has not

been definitively proven. *Yeh et al.* have reported that the progesterone receptor is uniquely expressed in solid pseudopapillary tumors while both estrogen and progesterone receptors are expressed in mucinous cystic neoplasm. (19)

Zamboni *et al.* (20) attempted to give an explanation about pancreatic tumors that affect women by stating that pancreatic anlagen are very close to the genital ridge during embryogenesis. Primitive ovarian tissue may be incorporated into pancreatic tissue during the process of pancreatic fusion, after which dislocated ovarian tissue may start growing in response to female hormones during adolescence. Indeed, immune-profiles of pancreatic tumors which affect women are similar to those in certain ovarian tumors. (20; 21)

Our case showed that pancreatic tumor cells were positive to CCK-2R/gastrin-R according to our immunohistochemical study. Several studies have shown that CCK-2R/gastrin-R are present in pancreatic tumor cell lines and that exogenous administration of CCK to pancreatic cancer cells stimulates growth (22, 23, 24) however the role of CCK as an autocrine growth regulator in pancreatic cancer has not been examined.

In addition, it was reported in *Elas-CCK2* transgenic mice, expressing functional human CCK-2R in pancreatic exocrine cells, an increased pancreatic growth, an acinar to ductal trans-differentiation, postulated to be a preneoplastic step in pancreatic carcinogenesis and the development of tumours. (25, 26)

We may explain the important role of CCK-2R/gastrin-R in the solid pseudopapillary pancreatic tumor especially in young women by the interaction between cholecystokinin and female hormones; mainly estrogen and opioids.

Micevych et al concluded that estrogen plays the role of a powerful regulator over the expression of CCK after the results of their studies showed that estrogen reduces CCK binding within 24 hr of treatment. The same team have examined as well the estrogen modulation and its interactions in the hypothalamus and limbic system where opioids exert a dual regulation on the release and expression of CCK to modulate reproductive behavior and found that CCK-opioids reciprocal interactions modulated by estrogen state influence the response of mammals to stimuli altering reproduction, memory/learning and perception of pain in case one of those hormones is deregulated. (27)

In summary, referring to our results and those of *Micevych et al* (27); *Zamboni et al.* (20) *Matters et al.* (24) *Yeh et al* (19) we may raise the following hypothesis: Solid pseudopapillary tumors of the pancreas affect mostly young women at an age when female hormones and their receptors are very active (8); however; unlike progesterone; estrogen was not found to be expressed in solid pseudopapillary pancreatic tumors (19) knowing that there are no doubt estrogen receptors and estrogen-binding protein are expressed in human healthy pancreas (28). Estrogen represents as well a powerful regulator of the expression of CCK since it decreases cholecystokinin binding (27). Thus if estrogen is down regulated; CCK binding would increase; and CCK-2/gastrin receptors would be overexpressed; and as *Matters et al.* reported this may lead cholecystokinin to play the role of a growth factor for human pancreatic cancer (24).

Conclusion

Solid pseudopapillary pancreatic tumors cells overexpress G protein coupled CCK-2/gastrin receptors which could be a very interesting biomarkers for SPT diagnosis and target therapies.

Acknowledgments

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

Conflict of interest: The authors declare that they have no conflict of interest.

Funding: any organization funded our study

References

- 1- Crawford BE 2nd. Solid and papillary epithelial neoplasm of the pancreas, diagnosis by cytology. *South Med J.* 91:973-937.
- 2- Cheng DF, Peng CH, Zhou GW, et al. Clinical misdiagnosis of solid pseudopapillary tumour of pancreas. *Chin Med J.* 2005;118:922-926.
- 3- Oliveira Lima S, Rocha Santana V, Correia Leao S et al. Solid-pseudopapillary tumor of pancreas in a young woman: a case report and literature review. *Rev Med Chil* 2012;140:1179–84.
- 4- Mortenson MM, Katz MH, Tamm EP, Bhutani MS, Wang H, Evans DB, et al. Current diagnosis and management of unusual pancreatic tumors. *Am J Surg* 2008; 196:100-13.
- 5- Kallichanda N, Tsai S, Stabile BE, Buslon V, Delgado DL, French SW. Histogenesis of solid pseudopapillary tumor of the pancreas: the case for the centroacinar cell of origin. *Exp Mol Pathol* 2006; 81:101-7.
- 6- Caplin M, Savage K, Khan K, Brett B, Rode J, Varro A, Dhillon A. Expression and processing of gastrin in pancreatic adenocarcinoma. *Br J Surg* 2000; 87: 1035-1040
- 7- Goetze JP, Nielsen FC, Burchard F, Rehfeld JF. Closing the gastrin loop in pancreatic carcinoma: coexpression of gastrin and its receptor in solid human pancreatic adenocarcinoma. *Cancer* 2000; 88: 2487-2494
- 8- Daisuke Watanabe, Kouichi Miura, Takashi Goto, Hiroshi Nanjo, Yuzo Yamamoto, Hirohide Ohnishi; Solid Pseudopapillary Tumor of the Pancreas with Concomitant Pancreas Divisum. A Case Report, *JOP. J Pancreas*; 2010. 11(1):45-48.
- 9- BUENOD E MESQUITA, .B., MAISONNEUVPE., MOERMANC, .J. and WALKERA, .M., Anthropometric and reproductive variables and exocrine carcinoma of the pancreas: a population-based case-control study in The Netherlands. *Int. J. Cancer*, 52,2629 (1992).
- 10- KALAPOTHAVK.I., TZONOUA, ., HSIEH,C .-C., TOUPADAKNI., KARAKATSANAI., and TRICHOPOULOS., Tobacco, ethanol, coffee,

- pancreatitis, diabetes mellitus, and cholelithiasis as risk factors for pancreatic carcinoma. *Cancer Causes Contr.*, 4,375-382 (1993).
- 11- ANDREN-SANDBEAR,G, E, stro ens and pancreatic cancer: some recent aspects. *Scand. J. Gastroenterof*, 21,129-133 (1986).
 - 12- GREENWABY., IQBALM, .J., JOHNSONP., J. and WILLIAMSR., , Oestrogen receptor roteins in malignant and fetal pancreas. *Brit. med. J.*, 283,751-753 8981).
 - 13- LONGNECKEDR.,S . and SUMI,C ., Effects of sex steroid hormones on pancreatic cancer in the rat. *Int. J. Pancreafob*, 7,159-165 (1990).
 - 14- SUMI,C ., LONGNECKEDR.,S ., ROEBUCKB, .D. and BRINCK-JOHNSEN, T., Inhibitory effects of estrogen and castration on the early stage of pancreatic carcinogenesis in Fischer rats treated with azaserine. *Cancer Res.*, 49,2332-2336 (1989).
 - 15- M. Kosmahl, L. S. Seada, U. J`anig, D. Harms, and G. Kl`oppel, "Solid-pseudopapillary tumor of the pancreas: its origin revisited," *Virchows Archiv*, vol. 436, no. 5, pp. 473–480, 2000.
 - 16- T. Papavramidis and S. Papavramidis, "Solid pseudopapillary tumors of the pancreas: review of 718 patients reported in english literature," *Journal of the American College of Surgeons*, vol. 200, no. 6, pp. 965–972, 2005.
 - 17- S. M. de Castro,D. Singhal,D. C.Aronson et al., "Management of solid-pseudopapillary neoplasms of the pancreas: a comparison with standard pancreatic neoplasms," *World journal of surgery*, vol. 31, no. 5, pp. 1130–1135, 2007.
 - 18- G. Pettinato, D. di Vizio, J. C. Manivel, S. E. Pambuccian, P. Somma, and L. Insabato, "Solid-pseudopapillary tumor of the pancreas: a neoplasm with distinct and highly characteristic cytological features," *Diagnostic Cytopathology*, vol. 27,no. 6, pp. 325–334, 2002.
 - 19- Yeh TS, Jan YY, Chiu CT, Ho YB, Chen TC, Lee KF, et al. Characterisation of oestrogen receptor, progesterone receptor, trefoil factor 1, and epidermal growth factor and its receptor in pancreatic cystic neoplasms and pancreatic ductal adenocarcinoma. *Gut* 2002; 51:712-6. [PMID 12377812]
 - 20- Zamboni G, Scarpa A, Bogina G, Iacono C, Bassi C, Talamini G, et al. Mucinous cystic tumors of the pancreas: clinicopathological features, prognosis, and relationship to other mucinous cystic tumors. *Am J Surg Pathol* 1999; 23:410-22. [PMID 10199470]

- 21- Kosmahl M, Seada LS, Jänig U, Harms D, Klöppel G. Solidpseudopapillary tumor of the pancreas: its origin revisited. *Virchows Arch* 2000; 436:473-80. [PMID 10881741]
- 22- Smith JP, Kramer ST, Solomon TE, Smith JP, Kramer ST, Solomon TE. CCK stimulates growth of six human pancreatic cancer cell lines in serum-free medium. *Regul Pept.* 1991; 32:341–349. [PubMed: 1866474]
- 23- Smith JP, Solomon TE, Bagheri S, Kramer S, Smith JP, Solomon TE, Bagheri S, Kramer S. Cholecystokinin stimulates growth of human pancreatic adenocarcinoma SW-1990. *Dig Dis Sci.* 1990; 35:1377–1384. [PubMed: 2226098]
- 24- . Matters G L, Christopher McGovern, John F. Harms, Kevin Markovic at al. Role of Endogenous Cholecystokinin on Growth of Human Pancreatic Cancer. *Int J Oncol* ; 2011. 38(3): 593–601. doi:10.3892/ijo.2010.886
- 25- Clerc P, Saillan-Barreau C, Desbois C, Pradayrol L, Fourmy D, Dufresne M. Transgenic mice expressing cholecystokinin 2 receptors in the pancreas. *Pharmacol Toxicol* 2002; 91: 321-326
- 26- Clerc P, Leung-Theung-Long S, Wang TC, Dockray GJ, Bouisson M, Delisle MB, Vaysse N, Pradayrol L, Fourmy D, Dufresne M. Expression of CCK2 receptors in the murine pancreas: proliferation, transdifferentiation of acinar cells, and neoplasia. *Gastroenterology* 2002; 122: 428-437
- 27- Paul Micevych, Victor Chaban, Arnulfo Quesada and Kevin Sinchak. Oestrogen Modulates Cholecystokinin: Opioid Interactions in the Nervous System; *Pharmacology & Toxicology* 2002, 91, 387–397.
- 28- A. Andren-Sandberg, D. Hoem & Pia Lena Backman; Other risk factors for pancreatic cancer: Hormonal aspects; *Ann Oncol*; 1999. 10 Suppl: S131-S1



Figure 01: Ultrasound imaging showing a solid heterogeneous mass measuring 124 mm

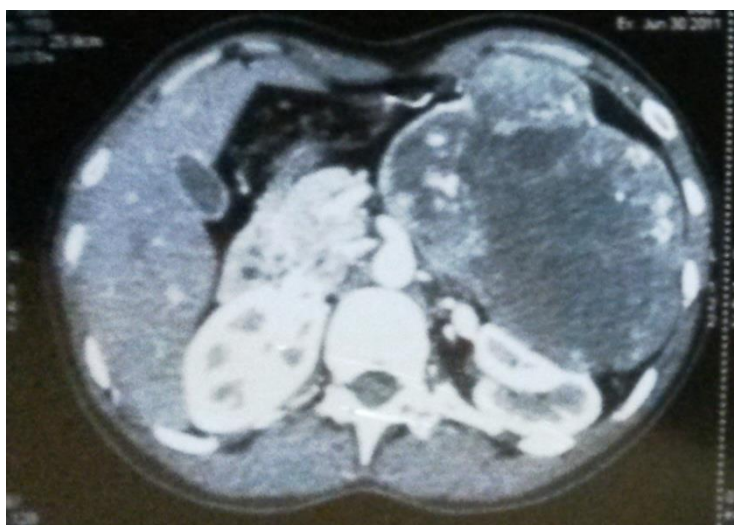


Figure 02: CT scan of the abdomen showing a voluminous necrotic mass in the tail and the body of the pancreas measuring 127mm x 87mm

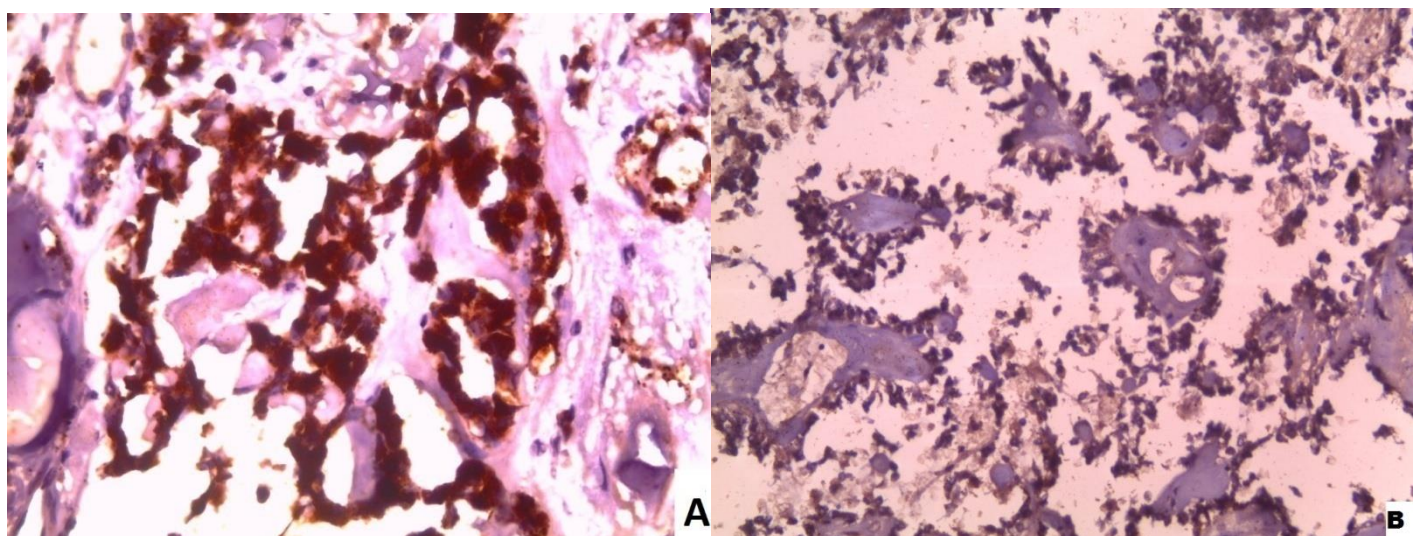


Figure 03: Histological examination demonstrating a solid pattern with non infiltrant pseudopapillary cores; and the immunohistochemical analysis is revealing that the tumor cells are positive for CCK-B receptors which were highly expressed within the cytoplasmic area of the cells; **a** (magnification x400) **b**(magnification x200)

Chapitre 5

Discussion

Au cours de notre période d'investigation (8 ans), 160 cas de cancer pancréatique ont été enregistrés dans les trois régions étudiées de l'ouest algérien avec un âge moyen de $62,2 \pm \text{SD}$ ans et un sex-ratio de 1,65. Notre étude a démontré encore une fois que la tranche d'âge la plus touchée par le cancer pancréatique était de 61-80 ans, avec une prédominance masculine. Ceci s'accorde avec les résultats de plusieurs travaux (American Cancer Society, 2014 ; SEER, 2014).

Le tabagisme et l'alcoolisme chronique étaient parmi les facteurs de risque principaux rapportés par la présente enquête. Une analyse récente (Perez *et al.*, 2011) montre que le risque de cancer pancréatique par rapport aux non fumeurs (risque=1,0) est élevé à 1,7 chez les personnes qui continuent à fumer et 1,2 chez celles qui ont cessé de fumer. D'autres auteurs ont rapporté que le risque relatif d'adénocarcinome pancréatique est augmenté en cas de surconsommation tabagique (en particulier au cours de formes héréditaires) avec un risque relatif de 2,2 (Lüttges *et al.*, 2004 ; Brand *et al.*, 2009). Le rôle promoteur de la consommation d'alcool, a été suggéré alors que les résultats de toutes les études de cohorte conduites sur de larges échantillons de population ont été négatifs (Lüttges *et al.*, 2004).

Les manifestations cliniques de ce type de cancer chez nos patients étaient dominées par : des douleurs abdominales, un ictère, des douleurs à l'hypocondre droit, un amaigrissement, ainsi que des vomissements et des nausées. Certaines études ont indiqué que ces premiers symptômes sont souvent non spécifiques, raison pour laquelle le cancer pancréatique est souvent diagnostiqué tardivement (American Cancer Society, 2014 ; Cancer Nursing Practice, 2013).

Une prédominance du siège au niveau de la tête du pancréas a été notée dans notre série, représentant 90% des cas par rapport au corps et à la queue du pancréas. Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés par la littérature qui ont révélé que plus des deux tiers des tumeurs pancréatiques sont situées dans la tête du pancréas (Bien *et al.*, 2011 ; Gulliford 2012). Sur le plan histologique, la forme la plus fréquente était l'adénocarcinome bien différencié, tandis que le stade durant lequel la majorité des patients étaient diagnostiqués avec un cancer pancréatique était le M1. Ceci s'accorde avec d'autres études rapportant que la quasi-totalité des tumeurs exocrines (le type le plus commun du cancer du pancréas) sont des adénocarcinomes (Kuvshinoff & Bryer, 2000). Ce dernier représente 90% des cas, sans oublier qu'il est de mauvais pronostic (survie à 5 ans inférieure à 3,5%), à cause de l'absence de facteurs de risque très spécifiques empêchant une prévention efficace, un diagnostic tardif en raison de signes cliniques non spécifiques ou même absents au début de la pathologie. Une invasion tumorale rapide par voie lymphatique et nerveuse est observée en l'absence de marqueurs biologiques précoces disponibles en pratique clinique quotidienne (Korner *et al.*, 2010 ; Bien *et al.*, 2011).

Dans notre deuxième article, nous nous sommes particulièrement intéressés aux facteurs de risques du cancer pancréatique et en analysant les résultats des antécédents chirurgicaux nous avons remarqué que la cholécystectomie domine le classement avec un taux de 35,63%. L'intervalle entre l'ablation de la vésicule biliaire et le diagnostic du cancer pancréatique était d'une moyenne de $5,23 \pm \text{SD}$ ans.

À ce jour, au moins 15 études épidémiologiques ont étudié les associations de cholécystectomie et / ou les pathologies biliaires avec le risque de cancer du pancréas (Zhang *et al.*, 2014 ; Lin & Kessler, 1981 ; Ekborn *et al.*, 1996 ; Gullo *et al.*, 1996 ; Chow *et al.*, 1999 ; Coughlin *et al.*, 2000 ; Silverman *et al.*, 1999 ; Talamini *et al.*, 2001 ; Lee *et al.*, 1996 ; Lin *et al.*, 2002 ; Schernhammer *et al.*, 2002 ; Stolzenberg *et al.*, 2002 ; Hassan *et al.*, 2007 ; Lipworth *et al.*, 2011 ; Gray *et al.*, 2008). Gray *et al.* (2008) ont tenté d'expliquer cette association en

contrôlant les étapes de l'évolution des tumeurs pancréatiques ainsi que des symptômes, et ont constaté que la survie à 1 an était significativement plus faible chez les patients subissant une cholécystectomie à cause du développement rapide de la tumeur (OR, 0,75; IC 95%, 0,58 à 0,97). La cholécystectomie a donc été associée à une diminution d'un an de survie chez les patients atteints d'un cancer du pancréas

L'ablation de la vésicule biliaire peut se produire à la suite de calculs biliaires ou une pathologie de la vésicule biliaire. La sécrétion de la bile, qui est produite dans le foie et stockée et concentrée dans la vésicule biliaire, cette dernière est sous l'influence de la CCK. La CCK est libérée dans le sang par les cellules entéro-endocrines "I" du duodénum en réponse aux lipides qui viennent vers l'intestin grêle. Lorsque la CCK se lie à ses récepteurs (récepteurs CCK) sur la vésicule biliaire, les cellules musculaires biliaires lisses se contractent et libèrent par la suite de la bile qui permet à la lipase pancréatique (une enzyme sécrétée en réponse à la CCK) d'agir plus efficacement dans la digestion et briser les triglycérides (Marieb 1998).

La CCK exogène ou endogène provoque deux actions coordonnées : celle de contracter la vésicule biliaire et de détendre le sphincter d'Oddi et le segment adjacent du duodénum, induisant une bonne sécrétion de la bile dans le duodénum. Haddock et Carter (1990) ont conclu que la cholécystectomie pourrait augmenter les niveaux de la cholécystokinine sériques dans le sang de plus ; Hyvarinen et Partanen (1987) ont ajouté que l'augmentation de la sécrétion de la CCK, suite à une cholécystectomie pourrait contribuer à un risque accru de développer un cancer du pancréas.

En 1997, Luman *et al.* ont trouvé qu'une cholécystectomie pourrait aussi supprimer l'effet inhibiteur normal de la CCK sur le sphincter d'Oddi et est devenu un facteur de risque pour le cancer du pancréas.

D'autres chercheurs ont cependant rapporté qu'il n'y avait aucune preuve d'une possible association de causalité entre la cholécystectomie et le développement d'un cancer pancréatique ; Ye *et al.* (2007) ont suggéré que les symptômes du cancer du pancréas peuvent être interprétés à tort comme étant ceux d'une pathologie de la vésicule biliaire, ce qui pourrait même conduire à une cholécystectomie à cause du diagnostic erroné.

La CCK fait partie de la famille d'hormones peptidiques réglementaires ayant un large éventail d'actions physiologiques dans le tractus gastro-intestinal, sa médiation se fait par le biais de récepteurs répartis au long de ce tractus. En plus de favoriser la prolifération cellulaire normale. Certaines études ont montrés que la CCK stimulait la croissance de plusieurs tumeurs ; et que ces récepteurs étaient exprimés dans une variété de tissus néoplasiques humains (Baldwin & Shulkes, 2007). C'est pour cette raison que ces types de d'hormones qui jouent le rôle de facteurs de croissance et les changements qui touchent leurs récepteurs sont devenus importants en oncologie. En outre, la CCK représente un puissant modulateur de la vésicule biliaire grâce à l'activation de la motilité de type récepteur CCK1 (CCKAR) répartis sur les cellules de la vésicule biliaire et les récepteurs CCK2/gastrine présent sur le pancréas normal et pathologique (Miller *et al.*, 1983 ; Ding *et al.*, 2005)

Bien qu'il existe des preuves que le diagnostic précoce et la résection tumoral peuvent entraîner une amélioration de la survie à long terme, il y a un manque de marqueurs moléculaires spécifiques pour détecter le cancer du pancréas ou d'identifier les patients à risque plus élevé pour développer ce type de cancer. Des études plus détaillées sur l'expression différentielle sur les récepteurs de la CCK peuvent révéler le CCK-2R comme étant un marqueur biologique utile pour le diagnostic précoce et le traitement du cancer du pancréas (Weinberg *et al.*, 1997). Plusieurs travaux de recherches ont été réalisés afin d'étudier la distribution des récepteurs de la cholécystokinine dans le tractus gastro-intestinal. Alors que peu d'entre eux qui se sont intéressés à comparer l'expression immunohistochimique des

récepteurs cholécystokinine-2 et de la gastrine dans les cellules pancréatiques humaines normales et malignes. La raison pour laquelle nous nous sommes particulièrement intéressés à évaluer l'expression des récepteurs CCK-2/gastrine par le biais de l'immunohistochimie dans des tissus humains provenant de pancréas exocrines normaux et cancéreux. Notre étude expérimentale a démontré que les récepteurs CCK-2/gastrine étaient répartis d'une manière dissemblable dans les deux types de tissus étudiés. En effet les récepteurs CCK-2/gastrine étaient fortement exprimés à l'échelle cytoplasmique et membranaire des cellules cancéreuses; plus de la moitié de nos échantillons avait une très forte immunoreactivité avec l'anticorps anti CCK-2/gastrine; l'immunocoloration était ainsi très intense puisque nous avons enregistré une coloration brune foncé des cellules malignes. Toutefois, dans les tissus normaux, l'immunoréactivité était plutôt faible; la majorité de nos échantillons avait une très faible immunoréactivité. L'immunocoloration était elle aussi nettement moins intense que celle des cellules cancéreuses car nous avons noté une coloration brune clair de certaines cellules normales. En se référant à ces résultats, nous avons rapporté que les récepteurs CCK-2/gastrine sont surexprimés dans les cellules cancéreuses pancréatiques et sont modérément exprimés dans les tissus pancréatiques normaux.

Au moyen du Northern blot et de la RT-PCR, quelques études ont signalé que les récepteurs CCK-2 /gastrine sont bel et bien exprimés dans les cellules du pancréas humain normal (Goetze *et al.*, 2000; Monstein *et al.*, 1996; Ryberg *et al.*, 2001), bien que ces résultats concordent avec les nôtres; ils n'ont malencontreusement pas apporté des résultats précis sur les niveaux immunohistochimiques de leurs expressions dans les tissus pancréatiques exocrines normaux et surtout cancéreux.

Semblable à nos conclusions; celles de plusieurs travaux qui ont détecté de faibles taux de l'ARNm de la gastrine et de la CCK2 dans le pancréas humains normal, et l'absence totale des peptides de la gastrine. En revanche, ces même chercheurs ont découvert des niveaux élevés

de l'ARNm de gastrine/CCK2 ainsi que des peptides de la gastrine dans les cellules du cancer du pancréas. (Goetze *et al.*, 2000; Ryberg *et al.*, 2001; Clerc *et al.*, 2002; Smith *et al.*, 1996).

Certain auteurs ont rapporté que la gastrine stimulait la croissance de l'adénocarcinome pancréatique humain et des lignées cellulaires cancéreuses pancréatiques. En se basant sur ces résultats, il a été suggéré que l'adénocarcinome pancréatique humain pourrait être stimulés par une boucle autocrine impliquant la co-expression de CCK2R et la gastrine. (Goetze *et al.*, 2000; Ryberg *et al.*, 2001; Yassin, 1999 ; Smith *et al.*, 1995; Smith *et al.*, 2014; Phillips *et al.*, 2010).

De plus, d'autres auteurs ont constaté que les récepteurs de la gastrine et de la CCK-2 sont surexprimé dans l'adénocarcinome pancréatique humain et aussi dans les lésions pré-néoplasiques pancréatiques (Caplin *et al.*, 2000; Smith *et al.*, 2002; Smith *et al.*, 2014). D'autres chercheurs ont aussi signalé chez les souris transgéniques Elas-CCK2, exprimant les CCK2R humains fonctionnels dans des cellules exocrines du pancréas, une croissance accrue des cellules pancréatiques, et une trans-différentiation acinaire et canalaire, ce qui a été reconnu comme étape pré-néoplasique dans la carcinogenèse pancréatique et le développement tumoral. La gastrine a aussi été montrée pour moduler l'adhésion et la migration cellulaire. Des études ont récemment démontré, *in vitro*, que l'activation prolongée du CCK2R/gastrine-R par la gastrine induit la formation de fibres de stress, modifie la morphologie des cellules, augmente la perte de adhésion cellulaire, ainsi que la motilité des cellules épithéliales. Ces recherches ont également montré cette activation prolongée par le biais de la gastrine mène à la perte de l'adhérence intercellulaire dans acini des souris Elas-CCK2 avant la formation de tumeurs pancréatiques (Clerc *et al.*, 2002).

La surexpression du CCK2-R/gastrine-R peut l'emmener à jouer le rôle de facteur de croissance chez les cellules cancéreuses pancréatiques endogènes (Matters *et al.*, 2011) ; en raison de plusieurs voies de signalisation activées par le CCK2-R/gastrine-R qui ont été impliqués dans les effets de prolifération ou la migration cellulaire induite par la gastrine. Ces

voies comprennent: la MAP-kinases; (Daulhac *et al.*, 1999; Todisco *et al.*, 1997), la phosphatidylinositol 3-kinase et la voie JAK2 / STAT3 (Cayrol *et al.*, 2011, Ferrand *et al.*, 2005). Il a également été démontré que la famille Src tyrosine kinases et p125FAK jouent un rôle crucial dans les effets biologiques de la gastrine (Daulhac *et al.*, 1999).

Les résultats de certaines études comparatives similaires aux notre ont montré la présence des CCK-2/gastrine-R dans le tissu non néoplasique ; ce qui soulève la possibilité que la médiation de la croissance locale par les récepteurs gastrine / CCK2 n'est pas réservée qu'au tissu tumoral, mais pourrait aussi promouvoir la croissance du parenchyme environnant. En outre, tout dépend de l'expression du gène CCK2 ; si elle est élevée, non seulement au niveau du pancréas néoplasique, mais aussi dans les tissus morphologiquement normaux ; la CCK pourrait agir comme facteur de croissance sur les cellules pancréatiques et affecter le cycle cellulaire. Une expression accrue de gastrine dans des cellules exocrines pancréatiques peut être une réponse générale à plusieurs formes de dommages pancréatiques (Goetze *et al.*, 2002; Bardram *et al.*, 1990).

Les tumeurs solides pseudopapillaires du pancréas son des tumeurs extrêmement rares et dangereuses qui affectent principalement les jeunes femmes, ce qui suggère que des facteurs hormonaux féminines peuvent en effet contribuer à la croissance tumorale (Mortenson *et al.* 2008, Kallichanda *et al.* 2006). En ce qui concerne notre étude, ce type de tumeur était diagnostiqué chez une jeune femme de 28 ans, un âge où les hormones féminines et de leurs récepteurs ; tels que la progestérone, et les œstrogènes sont très actifs et pourraient jouer un rôle important dans le développement de la tumeur solide pseudopapillaire pancréatique (Daisuke *et al.*, 2010). Yeh *et al.*, (2002) ont rapporté que le récepteur de la progestérone est exprimé uniquement dans les tumeurs solides pseudopapillaires alors que dans les tumeurs kystiques mucineuses ; les récepteurs des œstrogènes ainsi que ceux de la progestérone sont exprimés.

Zamboni *et al.*, (1999) ont tenté de donner une explication concernant les tumeurs pancréatiques qui touchent les jeunes femmes en déclarant que l'emplacement pancréatiques est très proche de la crête génitale au cours de l'embryogenèse. Le tissu ovarien primitif peut être incorporé dans le tissu pancréatique au cours du processus de fusion du pancréas, après lequel le tissu ovarien disloqué peut commencer à croître en réponse aux hormones féminines au cours de l'adolescence. En effet, l'immuno-profil des tumeurs pancréatiques qui affectent les femmes sont semblables à ceux de certaines tumeurs de l'ovaire. (Zamboni *et al.*, 1999 ; Kosmahl *et al.*, 2000)

Notre étude immunohistochimique a montré que les cellules tumorales pancréatiques étaient positives aux récepteurs CCK2-R/gastrine-R. Nous avons noté une forte immunoreactivité avec l'anticorps anti-CCK2-R/gastrine-R ainsi qu'une intense immunocoloration des cellules tumorales. Plusieurs études ont montré que les CCK2-R/gastrine-R sont présents dans les lignées cellulaires de tumeurs pancréatiques et que l'administration exogène de la CCK dans les cellules du cancer du pancréas stimule la croissance tumorale (Matters *et al.*, 2011, Smith *et al.*, 1991, Smith *et al.*, 1990). Toutefois, le rôle de la CCK comme étant un régulateur de la croissance autocrine dans le cancer du pancréas n'a pas encore été examiné.

Nous pouvons expliquer le taux important des CCK2-R/gastrine-R dans la tumeur pancréatique solide pseudopapillaire en particulier chez les jeunes femmes par l'interaction entre la cholécystokinine et les hormones féminines; principalement l'œstrogène et les opioïdes.

Micevych *et al.*, (2002) ont rapporté que l'œstrogène est un régulateur puissant de l'expression de la CCK car il réduit la liaison de CCK dans les 24 heures de traitement. Ces mêmes chercheurs ont examiné aussi la modulation de l'œstrogène et de ses interactions dans l'hypothalamus et le système limbique, où les opioïdes exercent une double régulation sur la libération et l'expression de la CCK pour moduler le comportement reproductif. De plus ils ont constaté que des interactions réciproques CCK-opioïdes modulées par l'œstrogène influencent

la réponse des cellules des mammifères aux stimuli en altérant le processus de la reproduction, de la mémoire, de l'apprentissage et de perception de la douleur dans les cas de dérégulation de l'un de ces hormones.

En associant l'ensemble des résultats obtenus avec ceux de Micevych *et al.* (2002); Zamboni *et al.* (1999) Matters *et al.* (2011) et Yeh *et al.* (2002), nous pouvons soulever l'hypothèse suivante: les tumeurs solides pseudo-papillaires du pancréas affectent surtout les jeunes femmes à un âge où les hormones féminines et leurs récepteurs sont très actifs. Toutefois, à la différence de la progestérone l'œstrogènes n'est pas exprimé dans les tumeurs solides pseudopapillaires pancréatiques (Yeh *et al.*, 2002) tout en sachant que sans le moindre doute que les récepteurs d'œstrogène et des les protéines de liaison d'œstrogènes sont exprimées dans le pancréas humain sain (Sandberg *et al.*, 1999). L'œstrogène représente ainsi un bon régulateur de l'expression de la CCK, car il diminue la liaison de la cholécystokinine (Micevych *et al.*, 2002). En d'autres termes, si l'œstrogène est faiblement régulé, la liaison de la CCK augmente et les récepteurs CCK2/gastrine seront surexprimés. Ceci pourrait mener la cholécystokinine à jouer le rôle d'un facteur de croissance pour les cellules pancréatiques cancéreuses (Matters *et al.* 2011).

Une meilleure connaissance de l'histopathologie, des facteurs de risques et des voies de signalisation du cancer pancréatique contribuera probablement à un meilleur diagnostic, une meilleure mise au point de marqueurs biologiques et une bonne élaboration d'une thérapie ciblée.

Actuellement de nombreux efforts sont réalisés afin d'améliorer les propriétés des analogues de la CCK et de la gastrine, dont un certain nombre est en cours d'études précliniques et cliniques (Roosenburg *et al* 2010).

Le récepteur CCK2R/gastrine-R est une cible diagnostique et thérapeutique potentielle, notamment dans certains cancers, du fait de sa surexpression, comme le cas du cancer du pancréas (Fourmy *et al.*, 2011). Certains travaux récents, qui ont pour origine l'étude du site de liaison et d'activation du CCK2R/gastrine-R, ainsi que les mécanismes moléculaires régissant sur son internalisation, ont permis d'identifier des agonistes et un antagoniste présentant des activités très différentes sur les voies de signalisation dépendantes des protéines G (Magnan *et al.*, 2011). Il a été par ailleurs montré que les états conformationnels du CCK2R à l'origine de ces signalisations présentent des différences au niveau du site de liaison orthostérique du récepteur (Magnan *et al.*, 2012).

Ce même récepteur pourrait aussi être une autre cible potentielle des radio-ligands, notamment pour la détection des carcinomes du pancréas ou de la thyroïde qui surexpriment ce type de récepteur. Des analogues de gastrine et de CCK sont actuellement en cours d'évaluations cliniques (Roosenburg *et al.*, 2010). Après la découverte de la forte incidence et densité d'expression du récepteur CCK2 dans les Carcinome Médullaire de la Thyroïde (MTC), plusieurs équipes ont commencé à développer des radio-ligands spécifiques de ce récepteur. La première génération de composés était basée sur des analogues de CCK non sulfatés, couplés à des chélateurs. Ces analogues marqués à l'indium 111 ont produit des résultats encourageants après leur injection chez plusieurs patients, chez lesquels ils ont permis de marquer les lésions de MTC (Kwekkeboom *et al.*, 2000). Malheureusement ceci n'a pas encore été appliqué sur des patients avec un cancer pancréatique, et pour cause, l'accumulation de ce type de récepteurs dans les tumeurs n'était pas suffisante pour des applications cliniques.

L'émergence des nanotechnologies a ouvert une nouvelle ère dans le diagnostic et la thérapie anti-cancéreuse. Les nanoparticules magnétiques sont actuellement utilisées comme agent de contraste pour améliorer la sensibilité de la détection en IRM. De plus, leurs propriétés magnétiques permettent l'utilisation des nanoparticules en tant que vecteurs pour la thérapie

par hyperthermie (Duguet *et al.*, 2006). Lorsqu'elles sont injectées chez les patients, les nanoparticules magnétiques sont captées par les cellules immunitaires du système réticuloendothélial (RES), et s'accumulent dans le foie et la rate. Elles sont donc utilisées pour le diagnostic des pathologies associées à ces organes. La détection de cancers qui affectent d'autres organes requiert la vectorisation des nanoparticules, qui consiste à rajouter à leur surface un ligand ou un anticorps dont la cible est surexprimée dans le tissu d'intérêt. Une équipe de recherche (Sanchez *et al.*, 2012) a choisi de vectoriser des nanoparticules magnétiques avec la gastrine, afin de cibler les cellules cancéreuses qui surexpriment le récepteur CCK2. La gastrine présente l'avantage d'être spécifique du RCCK2, alors que la CCK lie les sous-types RCCK1 et RCCK2 avec des affinités similaires. Cependant, les analogues radio-marqués de gastrine ont montré une rétention rénale élevée, entraînant un risque de néphrotoxicité. Ce phénomène est lié à la présence de 5 acides glutamiques dans la séquence de la gastrine. D'autre part, le couplage des nanoparticules avec la gastrine est susceptible de modifier l'interaction du peptide avec son récepteur, et d'entraîner des perturbations dans l'activation et le trafic intracellulaire de celui-ci (Sanchez *et al.*, 2012).

Chapitre 6

Conclusion

Ce projet a été centré sur l'étude des rôles des hormones gastro-intestinales ; cholecystokinine et gastrine ainsi que le statut de leurs récepteurs couplé aux protéines G

CCK2-R/gastrine-R dans le cancer pancréatique en association avec d'autres facteurs de risques tel que la cholécystectomie qui peut contribuer au développement de ce type de cancer.

L'ensemble de ce travail a permis de montrer que :

- la catégorie des jeunes adultes est celle qui est la moins touchée par le cancer du pancréas mais la plus tardivement diagnostiquée ;
- le cancer de la tête du pancréas en particulier augmente de plus en plus en Algérie. Il est malheureusement diagnostiqué à un stade très tardif lorsque la probabilité de rétablissement et les chances de survie sont extrêmement faibles ;
- les jeunes adultes sont souvent perçus comme plus sains que les plus âgés ;
- le manque de sensibilisation et la négligence pourraient être fatals pour les patients qui souffrent de ce type de cancer. La sensibilisation devrait être augmentée chez les professionnels de la santé et principalement pour les citoyens des pays du tiers monde, car plus le diagnostic est fait de façon précoce, meilleures sont les chances de survie du patient.

Selon nos résultats, la cholécystectomie pourrait être un facteur de risque pour le développement du cancer du pancréas vu qu'elle pourrait provoquer une perturbation de la régulation hormonale de cet organe.

La cholécystectomie pourrait augmenter les niveaux de la cholécystokinine sériques dans le sang. L'augmentation de la sécrétion de la CCK suite à une cholécystectomie pourrait contribuer à un risque accru de développer ce type de tumeurs en se liants sur ces récepteurs couplés à la protéine G CCK2/gastrine en jouant un rôle de facteur de croissance. L'étude immunohistochimique a démontré que ces récepteurs sont nettement surexprimés dans les tissus pancréatiques cancéreux que dans les tissus pancréatiques sains avec une intense immunoréactivité et immunointensité.

Concernant les tumeurs solides pseudo-papillaires pancréatiques, nous avons constaté que ce type de tumeurs affecte surtout les jeunes femmes à un âge où les hormones féminines et leurs récepteurs sont très actifs et qu'à la différence de la progestérone; l'œstrogène n'est pas exprimé dans les tumeurs solides pseudopapillaires pancréatiques tout en sachant que les récepteurs d'œstrogènes et des protéines de liaison d'œstrogènes sont exprimés dans le pancréas humain sain. L'œstrogène représente ainsi un bon régulateur de l'expression de la CCK, car il diminue la liaison de la cholécystokinine en d'autres termes ; si l'œstrogène est faiblement régulé, la liaison de la CCK augmente et les récepteurs CCK2/gastrine seront surexprimés. C'est ce qui pourrait mener la cholécystokinine à jouer le rôle d'un facteur de croissance pour les cellules pancréatique cancéreuses.

Nos résultats expérimentaux nous ont mené à conclure que dans le cancer pancréatique, la production endogène accrue et non contrôlée de la CCK et la gastrine suite à une cholecystectomie ainsi que les actions de ces hormones gastro-intestinales stimulent la synthèse de leurs récepteurs couplés à la protéine G, tel que les CCK2-R/gastrine-R et peuvent probablement contribuer à une croissance des cellules pancréatiques malignes par un mécanisme autocrine. Les jeunes femmes présentaient des tumeurs solides pseudo-papillaires pancréatiques. La faible régulation des hormones féminines comme l'œstrogène provoque une augmentation de la liaison de la CCK sur ces récepteur CCK2-R/gastrine-R ; et cette surexpression pourra mener cette hormone gastro-intestinale à jouer le rôle d'un facteur de croissance sur les cellules pancréatiques et ainsi développer des tumeurs solides pseudo-papillaires.

References

- American Cancer Society. American Cancer Society's publication, Cancer Facts & Figures (2014). Available from: <http://www.cancer.net/cancer-types/pancreatic-cancer/statistics>
- Andren-Sandberg A, D. Hoem & Pia Lena Backman; Other risk factors for pancreatic cancer: Hormonal aspects; *Ann Oncol*; 1999. 10 Suppl: S131-S13
- Arcagy-gineco; anatomie-generale-du-pancreas-3044508-3044608; 2009
- Arnould, M., Tassa, A., Ferrand, A., Archer, E., Esteve, J. P., Penalba, V., Portolan, G., Escherich, A., Moroder, L., Fourmy, D., Seva, C. & Dufresne, M. (2004) The G-protein-coupled CCK2 receptor associates with phospholipase Cgamma1, *FEBS Lett.* 568, 89-93.
- Austin community college (ACC) ;digestive system ; cholecystokinin; 2010
- Baldwin GS, Shulkes A. (2007), CCK receptors and cancer. *Curr Top Med Chem*, 7, 1232-1238
- Bardram L. Gastrin in non-neoplastic pancreatic tissue from patients with and without gastrinomas. *Scand J Gastroenterol* 1990;25:935-43.
- Bien E , Godzinski J , Dalligna P , Defachelles AS, Stachowicz-Stencel T, Orbach D et al. Pancreatoblastoma: A report from the European cooperative study group for paediatric rare tumours (EXPeRT) .*Eur J Cancer*. 2011 Oct;47(15):2347-52
- Binder-Foucard F, Belot A, Delafosse P, Remontet L, Woronoff AS, Bossard N. Estimation nationale de l'incidence et de la mortalité par cancer en France entre 1980 et 2012. INVS, <http://www.invs.sante.fr/>
- Bosetti C, Bertuccio P, Negri E, La Vecchia C, Zeegers MP, Boffetta P. Pancreatic cancer: overview of descriptive epidemiology. *Mol Carcinog.* 2012;51:3-13.
- Boullu S, Batteux Fr, BRIET Marie et al. Physiologie pancréatique. *Physiologie humaine*. Ruel-Malmaison : Editions Pradel, 2009, p. 348-351
- Brand RE ; Greer JB, Zolotarevsky E. Brand R, DuH,Simeone D et al.; Pancreatic Cancer Patients Who Smoke and Drink Are Diagnosed at Younger Ages. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* 2009;7(9):1007-1012
- Cancer Nursing Practice; Pancreatic cancer diagnosis delayed in people under 55, *Electronic, Individual* 2013. 13(5):pp. 7
- Caplin M, Savage K, Khan K, Brett B, Rode J, Varro A, Dhillon A. Expression and processing of gastrin in pancreatic adenocarcinoma. *Br J Surg* 2000; 87: 1035-1040
- Cayrol C, Bertrand C, Kowalski-Chauvel A; et al; α V integrin: A new gastrin target in human pancreatic cancer cells; *World J Gastroenterol* 2011 October 28; 17(40): 4488-4495
- Chow WH, Johansen C, Gridley G, Mellemejaer L, Olsen JH, Fraumeni JF Jr. Gallstones, cholecystectomy and risk of cancers of the liver, biliary tract and pancreas. *Br J Cancer* 1999; 79: 640-644.
- Christophe, J., De Neef, P., Deschodt-Lanckman, M. & Robberecht, P. (1978) The interaction of caerulein with the rat pancreas. 2. Specific binding of [3H]caerulein on dispersed acinar cells, *Eur J Biochem.* 91, 31-8.
- Clerc P, Leung-Theung-Long S, Wang TC, Dockray GJ, Bouisson M, Delisle MB, Vaysse N, Pradayrol L, Fourmy D, Dufresne M. Expression of CCK2 receptors in the murine pancreas: proliferation, transdifferentiation of acinar cells, and neoplasia. *Gastroenterology* 2002; 122: 428-437

Clerc P, Saillan-Barreau C, Desbois C, Pradayrol L, Fourmy D, Dufresne M. Transgenic mice expressing cholecystokinin 2 receptors in the pancreas. *Pharmacol Toxicol* 2002; 91: 321-326

Coughlin SS, Calle EE, Patel AV, Thun MJ. Predictors of pancreatic cancer mortality among a large cohort of United States adults. *Cancer Causes Control* 2000. 11: 915–923.

Daisuke Watanabe, Kouichi Miura, Takashi Goto, Hiroshi Nanjo, Yuzo Yamamoto, Hirohide Ohnishi; Solid Pseudopapillary Tumor of the Pancreas with Concomitant Pancreas Divisum. A Case Report, *JOP. J Pancreas*; 2010. 11(1):45-48.

Daulhac L, Kowalski-Chauvel A, Pradayrol L, Vaysse N, Seva C. Gastrin stimulates the formation of a p60Src/p125FAK complex upstream of the phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathway. *FEBS Lett* 1999; 445: 251-255

Daulhac L, Kowalski-Chauvel A, Pradayrol L, Vaysse N, Seva C. Src-family tyrosine kinases in activation of ERK-1 and p85/p110-phosphatidylinositol 3-kinase by G/CCKB receptors. *J Biol Chem* 1999; 274: 20657-20663

De Angelis R, Sant M, Coleman MP, Francisci S, Baili P, Pierannunzio D, EUROCORE-5 Working Group et al. Cancer survival in Europe 1999-2007 by country and age: results of EUROCORE5 a population-based study. *Lancet Oncol.* 2014;15:23-34.

Dehez, S., Daulhac, L., Kowalski-Chauvel, A., Fourmy, D., Pradayrol, L. & Seva, C. Gastrin-induced DNA synthesis requires p38-MAPK activation via PKC/Ca(2+) and Src-dependent mechanisms, *FEBS Lett.* 2001 496, 25-30.

Deraumaudt T1, Rustgi AK. ; Mutant KRAS in the initiation of pancreatic cancer; *Biochim Biophys Acta.* 2005 Nov 25;1756(2):97-101. Epub 2005 Sep 7.

Ding X, Lu CY, Mei Y, Liu CA, Shi YJ. , Correlation between gene expression of CCK-A receptor and emptying dysfunction of the gallbladder in patients with gallstones and diabetes mellitus. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int.* 2005; 4, 295-298

Ding, W. Q., Kuntz, S. M. & Miller, L. J. (2002) A misspliced form of the cholecystokinin-B/gastrin receptor in pancreatic carcinoma: role of reduced cellular U2AF35 and a suboptimal 3'-splicing site leading to retention of the fourth intron, *Cancer Res.* 62, 947-52.

Dufresne, M., Seva, C. & Fourmy, D; Cholecystokinin and gastrin receptors, *Physiol Rev.* 2006; 86, 805-47.

Duguet E, Vasseur S, Mornet S, Devoisselle JM: Magnetic nanoparticles and their applications in medicine. *Nanomedicine (Lond)* 2006, 1(2):157-168.

Ekbom A, Yuen J, Karlsson BM, McLaughlin JK, Adami HO Risk of pancreatic and periampullar cancer following cholecystectomy: a population-based cohort study. *Dig Dis Sci* 1996; 41: 387–391

Ferlay J; Le cancer du pancréas dans le monde Worldwide Burden of Pancreatic Cancer ; e-mémoires de l'Académie Nationale de Chirurgie, 2014, 13 (4) : 012-016

Ferrand, A., Kowalski-Chauvel, A., Bertrand, C., Escricut, C., Mathieu, A., Portolan, G., Pradayrol, L., Fourmy, D., Dufresne, M. & Seva, C. (2005) A novel mechanism for JAK2 activation by a G protein-coupled receptor, the CCK2R: implication of this signaling pathway in pancreatic tumor models, *J Biol Chem.* 280, 10710-5.

Forman D, Bray F, Brewster DH, Gombe Mbalawa C, Kohler B, Piñeros M et al. eds (2013). Cancer Incidence in Five Continents, Vol. X (electronic version) Lyon, IARC. <http://ci5.iarc.fr> last accessed on (02-12-2014).

Fourmy D, Gigoux V, Reubi JC. Gastrin in gastrointestinal diseases. *Gastroenterology* 2011;141:814-8.

Gales, C., Kowalski-Chauvel, A., Dufour, M. N., Seva, C., Moroder, L., Pradayrol, L., Vaysse, N., Fourmy, D. & Silvente-Poirot, S. (2000) Mutation of Asn-391 within the conserved NPXXY motif of the cholecystokinin B receptor abolishes Gq protein activation without affecting its association with the receptor, *J Biol Chem.* 275, 17321-7.

Go VL, Gukovskaya A, Pandol SJ; Alcohol and pancreatic cancer. *Alcohol.* 2005 Apr; 35(3):205-11.

Goetze JP, Nielsen FC, Burcharth F, Rehfeld JF. Closing the gastrin loop in pancreatic carcinoma: coexpression of gastrin and its receptor in solid human pancreatic adenocarcinoma. *Cancer* 2000;88:2487–2494.

Gray Stephen H.; Hawn Mary T.; Kilgore, Meredith L.; Yun, Huifeng; Christein, John D. (2008) Does Cholecystectomy Prior to the Diagnosis of Pancreatic Cancer Affect Outcome?. *The American Surgeon*, July 2008 Volume 74, Number 7, pp. 602-606

Guo, Y. S., Cheng, J. Z., Jin, G. F., Gutkind, J. S., Hellmich, M. R. & Townsend, C. M., Jr. (2002) Gastrin stimulates cyclooxygenase-2 expression in intestinal epithelial cells through multiple signaling pathways. Evidence for involvement of ERK5 kinase and transactivation of the epidermal growth factor receptor, *J Biol Chem.* 277, 48755-63.

[Gulliford](#) M. Primary care and diagnosis of cancer. *Lancet Oncol.* 2012;13(4): 321 – 323.

Haddock G, Carter DC, (1990), Aetiology of pancreatic cancer. *Br J Surg*, 77, 1159–1166.

Hassan MM, Bondy ML, Wolff RA, Abbruzzese JL, Vauthey JN, Pisters PW, Evans DB, Khan R, Chou TH, Lenzi R, Jiao L, Li D Risk factors for pancreatic cancer: case-control study. *Am J Gastroenterol* 2007; 102: 2696–2707.

Hellmich, M. R., Rui, X. L., Hellmich, H. L., Fleming, R. Y., Evers, B. M. & Townsend, C. M., Jr. (2000) Human colorectal cancers express a constitutively active cholecystokinin-B/gastrin receptor that stimulates cell growth, *J Biol Chem.* 275, 32122-8.

Howatson AG, Carter DC. Pancreatic carcinogenesis—enhancement by cholecystokinin in the hamsternitrosamine model. *Br J Cancer* 1985;51:107–14. 6

Hyvarinen H, Partanen S; (1987), Association of cholecystectomy with abdominal cancers. *Hepatogastroenterology*; 34, 280 – 284

Innis, R. B. & Snyder, S. H. (1980) Distinct cholecystokinin receptors in brain and pancreas, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 77, 6917-21.

Kallichanda N, Tsai S, Stabile BE, Buslon V, Delgado DL, French SW. Histogenesis of solid pseudopapillary tumor of the pancreas: the case for the centroacinar cell of origin. *Exp Mol Pathol* 2006; 81:101-7

Khan, Z. E., Wang, T. C., Cui, G., Chi, A. L. & Dimaline, R. (2003) Transcriptional regulation of the human trefoil factor, TFF1, by gastrin, *Gastroenterology.* 125, 510-21.

Kopin, A. S., Lee, Y. M., McBride, E. W., Miller, L. J., Lu, M., Lin, H. Y., Kolakowski, L. F., Jr. & Beinborn, M. (1992) Expression cloning and characterization of the canine parietal cell gastrin receptor, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89, 3605-9.

Kosmahl M, Seada LS, Jänig U, Harms D, Klöppel G. Solidpseudopapillary tumor of the pancreas: its origin revisited. *Virchows Arch* 2000; 436:473-80. [PMID 10881741]

Korner, M., Waser, B., Reubi, J. C. & Miller, L. J. (2010) CCK(2) receptor splice variant with intron 4 retention in human gastrointestinal and lung tumours, *J Cell Mol Med.* 14, 933-43.

Kuvshinoff BW, Bryer MP. Treatment of Resectable and Locally Advanced Pancreatic Cancer. *Cancer Control*. 2000, 7(5): 428-436

Kwekkeboom DJ, Bakker WH, Kooij PP, Erion J, Srinivasan A, de Jong M, Reubi JC, Krenning EP: Cholecystokinin receptor imaging using an octapeptide DTPA-CCK analogue in patients with medullary thyroid carcinoma. *Eur J Nucl Med* 2000, 27(9):1312-1317.

LAFITTE Marie, Adénocarcinome canalaire pancréatique : mécanisme moléculaire et approche thérapeutique. 220 p. Thèse de doctorat : Sciences de la vie et de la santé. Bordeaux : Bordeaux 2 : 2012

Landry Y; Rival Y ; Dictionnaire pharmaceutique - Pharmacologie et chimie des médicaments - Editions EMInter - Editions Tec & Doc 2014.

LAVERDET Betty ; Physiopathologie du pancréas : Rôle de l'inflammation dans la cancérogenèse du pancréas exocrine ; 102p. thèse doctorat : Faculté de Pharmacie UNIVERSITE DE LIMOGES ; 2013

LESUR G. SAUVANET A. LE VYP BELGHITTI ET BERNADES P. : Cancer du pancréas exocrine. Encyclopédie Méd. Chirurgie (Paris France), hépatologie, 7-106-A-1990, 10p

LEE CHI-TE, FULL-YOUNG CHANG*and SHOU-DONG LEE. Risk factors for pancreatic cancer in Orientals. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* Volume 11, Issue 5, pages 491–495, May 1996

Lee, Y. M., Beinborn, M., McBride, E. W., Lu, M., Kolakowski, L. F., Jr. & Kopin, A. S. (1993) The human brain cholecystokinin-B/gastrin receptor. Cloning and characterization, *J Biol Chem*. 268, 8164-9.

Lin RS, Kessler II; A multifactorial model for pancreatic cancer in man. Epidemiologic evidence. *JAMA* 1981; 245: 147–152

Lin Y, Tamakoshi A, Kawamura T, Inaba Y, Kikuchi S, Motohashi Y, Kurosawa M, Ohno Y Risk of pancreatic cancer in relation to alcohol drinking, coffee consumption and medical history: findings from the Japan collaborative cohort study for evaluation of cancer risk. *Int J Cancer* 2002; 99: 742–746.

Lüttges, J., Stigge, C., Pacena, M. and Klöppel, G. Rare ductal adenocarcinoma of the pancreas in patients younger than age 40 years. *Cancer*, 2004 ,100:173–182.

Luman W, Williams AJ, Pryde A, Smith GD, Nixon SJ, Heading RC, Palmer KR (1997), Influence of cholecystectomy on sphincter of Oddi motility. *Gut*, 41, 371 – 374

Magnan R, Escrieux C, Gigoux V, De K, Clerc P, Niu N, Azema J, Masri B, Cordomi A, Baltas M, Tikhonova IG, Fourmy D. Distinct CCK-2 receptor conformations associated with β -arrestin-2 recruitment or phospholipase-C activation revealed by a biased antagonist. *J Am Chem Soc*, in press 2012

Magnan R, Masri B, Escrieux C, Foucaud M, Cordelier P, Fourmy D. Regulation of membrane cholecystokinin-2 receptor by agonists enables classification of partial agonists as biased agonists. *J Biol Chem* 2011; 286:6707-19.

MAGNAN Rémi. Mécanismes de l'internalisation du récepteur CCK2 : bases pharmacologiques et structurales. Thèse de DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE ; Le 19 janvier 2011.

Marieb Elaine N. 1998. Human Anatomy and Physiology: 4th ed. Menlo Park, CA

Marx M, Gomez G, Lonovics J, Thompson JC, (1987) , Cholecystokinin. In *Gastrointestinal Endocrinology* Thompson JC, Greeley Jr GH, Rayford PL, Townsend Jr CM (eds) pp 213 – 222 New York: McGraw-Hill

Matsuda T, Ajiki W, Marugame T, Ioka A, Tsukuma H, Sobue T, Research Group of Population-Based Cancer Registries of Japan et al. Population-based survival of cancer patients diagnosed between 1993 and 1999 in Japan: A chronological and international comparative study. *Jpn J Clin Oncol*. 2011;41:40–51

Matters G L, McGovern C, Harms J F, et al; Role of endogenous cholecystokinin on growth of human pancreatic cancer; INTERNATIONAL JOURNAL OF ONCOLOGY 38: 593-601, 2011

Micevych P, Chaban v, Quesada A and Sinchak K. Oestrogen Modulates Cholecystokinin: Opioid Interactions in the Nervous System; Pharmacology & Toxicology 2002, 91, 387–397.

Miller LJ, Holicky EL, Ulrich CD, Wieben ED. (1995) Abnormal processing of the human cholecystokinin receptor gene in association with gallstones and obesity. Gastroenterology 109:1375-1380

Miyake, A. (1995) A truncated isoform of human CCK-B/gastrin receptor generated by alternative usage of a novel exon, *Biochem Biophys Res Commun.* 208, 230-7.

Monstein HJ, Nylander AG, Salehi A, Chen D, Lundquist I, Hakanson R: Cholecystokinin-A and cholecystokinin-B/gastrin receptor mRNA expression in the gastrointestinal tract and pancreas of the rat and man. A polymerase chain reaction study. Scand J Gastroenterol 1996, 31:383-390.

Mortenson MM, Katz MH, Tamm EP, Bhutani MS, Wang H, Evans DB, et al. Current diagnosis and management of unusual pancreatic tumors. Am J Surg 2008; 196:100-13.

Noble, F., Wank, S. A., Crawley, J. N., Bradwejn, J., Seroogy, K. B., Hamon, M. & Roques, B. P.(1999) International Union of Pharmacology. XXI. Structure, distribution, and functions of cholecystokinin receptors, *Pharmacol Rev.* 51, 745-81.

OMS world cancer report 2014

OUKKAL. M; BOUZID ;K ; Mise au point sur le traitement médical du cancer du pancréas ; Santé-Mag - N° 03 Février 2012.

Owyang C. Physiological mechanisms of cholecystokinin action on pancreatic secretion. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 271: G1–G7, 1996

Owyang C, Logsdon CD. New insights into neurohormonal regulation of pancreatic secretion. Gastroenterology 127: 957–969, 2004

Paré. P et al. (2005) PRINCIPES FONDAMENTAUX DE GASTRO-ENTÉROLOGIE. Ontario ; Thomson. 469p Registre des tumeurs d'Alger. INSP 2012

Perez EA, Gutierrez JC, Koniaris LG, Neville HL, Thompson WR, Sola JE. Malignant pancreatic tumors: incidence and outcome in 58 pediatric patients . J PediatrSurg. 2009 ; 44 : 197 – 203

Phillips AP, Yang L, Shulkes A, Vonlaufen A, Poljak A, Bustamante S, et al. Pancreatic stellate cells produce acetylcholine and may play a role in pancreatic exocrine secretion; Proc Natl Acad Sci U S A. 2010 Oct 5; 107(40): 17397–17402.

Pommier, B., Marie-Claire, C., Da Nascimento, S., Wang, H. L., Roques, B. P. & Noble, F. (2003) Further evidence that the CCK2 receptor is coupled to two transduction pathways using site-directed mutagenesis, *J Neurochem.* 85, 454-61.

Redrawn from Barrett KE: Gastrointestinal Physiology. New York, McGraw Hill, 2006

Rivard N, Guan D, Maouyo D, Grondin G, Berube FL, Morisset J, (1991), Endogenous cholecystokinin release responsible for pancreatic growth observed following pancreatic juice diversion. Endocrinology, 129, 2867 – 2874

Roosenburg S, Laverman P, van Delft FL, Boerman OC: Radiolabeled CCK/gastrin peptides for imaging and therapy of CCK2 receptor-expressing tumors. Amino Acids 2010, 41(5):1049-1058.

Ryberg Anna, Kurt Borch and Hans-Jürg Monstein.: Expression of multiple forms of 3'-end variant CCK2 receptor mRNAs in human pancreatic adenocarcinomas. BMC Research Notes 2011; 4:131.

SANCHEZ Claire. Daniel FOURMY (dir) ; 2012: Le récepteur CCK2 dans les cancers: Ciblage diagnostique et thérapeutique grâce à la vectorisation de nanoparticules magnétiques ; 141p ; DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE Délivré par l'Université Toulouse III ; Paul Sabatier

Schernhammer ES, Michaud DS, Leitzmann MF, Giovannucci E, Colditz GA, Fuchs CS Gallstones, cholecystectomy, and the risk for developing pancreatic cancer. *Br J Cancer* 2002; 86: 1081–1084.

SCHLIENGER Jean-Louis, « CHOLÉCYSTOKININE-PANCRÉOZYME », Encyclopædia Universalis [en ligne], 2015. URL : <http://www.universalis.fr/encyclopedie/cholecystokinine-pancreozymine/>

SCHLIENGER Jean-Louis, « GASTRINE », Encyclopædia Universalis [en ligne], consulté l2015. URL : <http://www.universalis.fr/encyclopedie/gastrine>

Schotten D, Field JF, Fraumeni Jr. (Eds.) (2006) *Cancer epidemiology and prevention* (3rd ed.), Oxford University Press, New York

SEER (The surveillance, epidemiology, and end results) Stat Fact Sheets. Cancer of the pancreas. <http://seer.cancer.gov/statfacts>. Accessed August 6, 2014

Silvente-Poirot, S., Dufresne, M., Vaysse, N. & Fourmy, D. (1993) The peripheral cholecystokinin receptors, *Eur J Biochem.* 215, 513-29.

Silverman DT, Schiffman M, Everhart J, Goldstein A, Lillemoe KD, Swanson GM, et al; Diabetes mellitus, other medical conditions and familial history of cancer as risk factors for pancreatic cancer. *Br J Cancer*; 1999; 80: 1830–1837.

Sinclair, N. F., Ai, W., Raychowdhury, R., Bi, M., Wang, T. C., Koh, T. J. & McLaughlin, J. T. (2004) Gastrin regulates the heparin-binding epidermal-like growth factor promoter via a PKC/EGFRdependent mechanism, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 286, G992-9

Smith JP, Cooper TK, McGovern CO, Gilius EL, Zhong Q, Liao J, et al. Cholecystokinin receptor antagonist halts progression of pancreatic cancer precursor lesions and fibrosis in mice. *Pancreas.* 2014 Oct;43(7): 1050-1059. PMID: 25058882

Smith JP, Fantaskey AP, Liu G, Zagon IS: Identification of gastrin as a growth peptide in human pancreatic cancer. *Am J Physiol* 1995, 268:R135-141.

Smith JP, Hamory MW, Verderame MF, Zagon IS: Quantitative analysis of gastrin mRNA and peptide in normal and cancerous human pancreas. *Int J Mol Med* 1998, 2:309-315

Smith JP, Kramer ST, Solomon TE, Smith JP, Kramer ST, Solomon TE. CCK stimulates growth of six human pancreatic cancer cell lines in serum-free medium. *Regul Pept.* 1991; 32:341–349.

Smith JP, Shih A, Wu Y, McLaughlin PJ, Zagon IS: Gastrin regulates growth of human pancreatic cancer in a tonic and autocrine fashion. *Am J Physiol* 1996, 270:R1078-1084

Smith JP, Solomon TE, Bagheri S, Kramer S, Smith JP, Solomon TE, Bagheri S, Kramer S. Cholecystokinin stimulates growth of human pancreatic adenocarcinoma SW-1990. *Dig Dis Sci.* 1990; 35:1377–1384.

Smith JP, Solomon TE. Cholecystokinin and pancreatic cancer: the chicken or the egg? *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2014 Jan;306(2):G91-G101. PMID: 24177032

Smith JP, Verderame MF, McLaughlin P, Martenis M, Ballard E and Zagon IS: Characterization of the CCK-C (cancer) receptor in human pancreatic cancer. *Int J Mol Med* 10: 689-694, 2002

Soll, A. H., Amirian, D. A., Thomas, L. P., Reedy, T. J. & Elashoff, J. D. (1984) Gastrin receptors on isolated canine parietal cells, *J Clin Invest.* 73, 1434-47.

Song, I., Brown, D. R., Wiltshire, R. N., Gantz, I., Trent, J. M. & Yamada, T. (1993) The human gastrin/cholecystokinin type B receptor gene: alternative splice donor site in exon 4 generates two variant mRNAs, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90, 9085-9.

Stolzenberg-Solomon RZ, Pietinen P, Taylor PR, Virtamo J, Albanes D A prospective study of medical conditions, anthropometry, physical activity, and pancreatic cancer in male smokers (Finland). *Cancer Causes Control* 2002; 13: 417–426

Talamini G, Falconi M, Bassi C, Casetti L, Fantin A, Salvia R, Pederzoli P: Previous cholecystectomy, gastrectomy, and diabetes mellitus are not crucial risk factors for pancreatic cancer in patients with chronic pancreatitis. *Pancreas* 2001; 23: 364–367.

The surveillance, epidemiology, and end results (SEER) Program of the National Cancer Institute (<http://seer.cancer.gov/>) 2014.

Todisco A, Takeuchi Y, Urumov A, Yamada J, Stepan VM, Yamada T. Molecular mechanisms for the growth factor action of gastrin. *Am J Physiol* 1997; 273: G891-G898

Vila S , L Daulhac , A Kowalski-Chauvel , L Pradayrol , N Vaysse, Seva, L'ACTIVATION DE LA VOIE JUN-KINASE PAR LA GASTRINE EST DÉPENDANTE DE SRC, DE LA PROTÉINE KINASE C ET DU CALCIUM ; *Gastroentérologie Clinique et Biologique* Vol 23, N° 10 - octobre 1999 p. 1075

WACK S ; ETUDE DE MODALITES MULTITHERAPEUTIQUES ET DIAGNOSTIQUES APPLIQUEES AU CANCER DU PANCREAS ; Thèse présentée pour obtenir le grade de Docteur de l'Université Louis Pasteur Strasbourg I ; 08 novembre 2005

Wank, S. A., Pisegna, J. R. & de Weerth, A. (1992) Brain and gastrointestinal cholecystokinin receptor family: structure and functional expression, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89, 8691-5.

Weinberg DS, Bruce Ruggeri, I Michael T. Barber, Sanjoy Biswas, Sheila Miknyocki, I and Scott A. (1997) Cholecystokinin A and B Receptors Are Differentially Expressed in Normal Pancreas and Pancreatic

Yassin RR: Signaling pathways mediating gastrin's growth-promoting effects. *Peptides* 1999, 20:885-898

Ye W, J Lagergren, O Nyren, and A Ekblom. Risk of pancreatic cancer after cholecystectomy: a cohort study in Sweden. *Gut.* 2001 Nov; 49(5): 678–681

Yeh TS, Jan YY, Chiu CT, Ho YB, Chen TC, Lee KF, et al. Characterisation of oestrogen receptor, progesterone receptor, trefoil factor 1, and epidermal growth factor and its receptor in pancreatic cystic neoplasms and pancreatic ductal adenocarcinoma. *Gut* 2002; 51:712-6.

Zamboni G, Scarpa A, Bogina G, Iacono C, Bassi C, Talamini G, et al. Mucinous cystic tumors of the pancreas: clinicopathological features, prognosis, and relationship to other mucinous cystic tumors. *Am J Surg Pathol* 1999; 23:410-22.

Zhang J; Prizment A E, Dhakal I B and Anderson K E, Cholecystectomy, gallstones, tonsillectomy, and pancreatic cancer risk: a population-based case-control study in Minnesota; *BJC*; (2014) 110, 2348–2353; doi: 10.1038/bjc.2014.154