



ETUDE IMMUNOHISTOCHEMIQUE DE L'EXPRESSION DE L'ONCOPROTEINE pS2 DANS LES CARCINOMES CANALAIRES INFILTRANTS DE GRADES I, II ET III

EDORH¹Aléodjrodo Patrick, AHISSOU¹Hyacinthe, LALEYE²Anatole, DOUGNON³Jacques Tossou, LEROUX-BROUSSIER⁴Agnès, RIHN⁵Bertrand

¹Département de Biochimie et de Biologie Cellulaire, Université d'Abomey-Calavi, 01B.P. 526, Cotonou, Bénin.

²Unité de Biologie Humaine, Laboratoire de Cytogénétique, Faculté des Sciences de la Santé, Université d'Abomey-Calavi, B.P. 188, Cotonou, Bénin.

³Ecole Polytechnique d'Abomey-Calavi (EPAC), Département de Productions Animales, Laboratoire de Recherches en Biologie Appliquée (LARBA), Université d'Abomey-Calavi, 01 BP 2009 Cotonou, Bénin.

⁴Service d'Anatomie et de Cytologie Pathologiques, Centre Régional de Lutte contre le Cancer (Centre Alexis Vautrin), Avenue de Bourgogne, 54511Vandoeuvre-lès-Nancy Cédex, France.

⁵Unité Inserm U525. Faculté de Pharmacie, 30 rue Lionnois, 54000 Nancy, France.

Auteur pour la correspondance : Aléodjrodo Patrick EDORH, ¹Département de Biochimie et de Biologie Cellulaire, Université d'Abomey-Calavi, 01B.P. 526, Cotonou, Bénin. Tél. : 00 (229) 97071596, E-mail : patrickedorh@yahoo.fr

RESUME

Le gène pS2 est l'un de ceux dont l'expression est contrôlée par l'œstradiol que ce soit dans les cellules mammaires humaines en culture MCF-7 ou dans les lésions tumorales du sein. Nous avons recherché par immunohistochimie la présence de pS2 dans 37 cas de carcinomes canaux infiltrants (CCI) : 3 CCI de grade I, 16 CCI de grade II et 18 CCI de grade III. Au total, 18 cas étaient positifs (48 %) : 2 positifs de grade I (66,7 %), 9 positifs de grade II (56 %), 7 positifs de grade III (39 %). 62 % des tumeurs exprimant la pS2 ont des récepteurs pour les estrogènes.

Cette étude montre l'utilité de l'analyse immunohistochimique de la protéine pS2 dans les carcinomes canaux infiltrants dans l'orientation des décisions thérapeutiques.

Mots-clés : Carcinomes canaux infiltrants, pS2, immunohistochimie, hyperexpression.

ABSTRACT

The pS2 gene is one of genes whose expression is controlled by estradiol, at both in the breast cancer cell line MCF-7 or in the human breast cancer. We have studied by immunohistochemistry the presence of pS2 in 37 infiltrating ductal carcinomas : 3 of grade I, 16 of grade II, and 18 of grade III. Our results have been showed 18 positive cases (48%) : 62% of tumors which have a pS2 hyperexpression presented estrogen receptors. This study shows the usefulness of immunohistochemical analysis of pS2 protein expression in the infiltrating ductal carcinomas in the orientation of therapeutical decisions.

Key words: Infiltrating ductal carcinomas, pS2, immunohistochemistry, hyperexpression.

INTRODUCTION

Le gène pS2 est l'un des gènes dont l'expression est contrôlée par l'œstradiol que ce soit dans les cellules mammaires humaines en culture MCF-7 ou dans les lésions tumorales du sein [1, 2]. La protéine pS2 est exprimée dans 45% à 70% des cancers du sein [3]. Afin d'apprécier la fonctionnalité des récepteurs aux estrogènes, la recherche de la protéine pS2 est proposée comme biomarqueur [4, 5]. Cette recherche a un intérêt pronostique; en effet, la durée de survie des patientes dont les tumeurs répondent aux hormones est en moyenne de un an et demi à deux ans supérieure à celles dont les tumeurs ne répondent pas à l'action des hormones stéroïdes.

La présence des récepteurs d'estrogènes a été détectée grâce à des anticorps monoclonaux (Laboratoires Abbott, Chicago, U.S.A.) sur des tissus congelés. Dans tous les cas, la présence des deux protéines RE (récepteur aux estrogènes) et pS2 est liée à celle de leurs ARNm. La présence de la protéine pS2 dans les cancers du sein reflète une augmentation de la transcription du gène pS2, comme cela avait été démontré antérieurement dans les cellules MCF-7.

Le gène pS2 a été cloné et séquencé [6, 7]; il est localisé sur le chromosome 21 en q22.3. La protéine pS2 présente des similitudes avec des facteurs de croissance tels que les insu-

line-like growth factors I et II qui sont des polypeptides sécrétés, constitués respectivement, de 67 et 70 acides aminés et renferment de nombreux résidus de cystéines.

L'ARNm de pS2 est induit par divers facteurs de croissance comme l'EGF, l'insuline, l'IGF-1 et le FGF [1, 8, 9]. La synthèse de pS2 est

sous le contrôle du récepteur d'estrogènes (RE). Les délétions dans la partie NH₂-terminale du RE bloquent la synthèse de la protéine pS2 [10]. La suppression de l'estradiol dans les cultures de cellules MCF-7 [11, 12, 13, 14] entraîne la disparition de pS2 et la mort de la cellule [15].

MATERIEL ET METHODES

Patients

Trente sept prélèvements de carcinomes canaux infiltrants (CCI) mammaires (3 de grade I, 16 de grade II, 18 de grade III) (Tableau 1), ont été étudiés dans le Service d'Anatomie et de Cytologie Pathologique du Centre Régional de Lutte contre le Cancer (Centre Alexis Vautrin, 54511 Vandoeuvre-Lès-Nancy, France). Il s'agit de pièces issues de mastectomies ou de prélèvements biopsiques, fixés dans du paraformaldéhyde et qui ont été inclus dans de la paraffine. Le diagnostic anatomopathologique a été réalisé par deux lecteurs indépendants.

Tableau 1 : Nombre de cas de carcinomes canaux infiltrants mammaires

Carcinomes canaux infiltrants	Nombre de cas
Carcinomes canaux infiltrants de grade I	3
Carcinomes canaux infiltrants de grade II	16
Carcinomes canaux infiltrants de grade III	18
Total	37

Technique immunohistochimique

Des coupes histologiques de 5 µm d'épaisseur, déparaffinées, ont été placées dans une solution à 3% de peroxyde d'hydrogène afin de neutraliser les activités de peroxydases endogènes pouvant être présentes dans les tissus, puis rincées dans du tampon PBS (Phosphate Buffered Saline: NaCl 135 mM ; Na₂HPO₄ 8 mM ; KCl 2 mM ; KH₂PO₄ 1 mM ; MgCl₂.6H₂O 1 mM ; pH 7,2). Afin de réduire les marquages aspécifiques, les coupes ont été recouvertes d'une solution de sérum normal de chèvre pendant 5 minutes (solution de blocage prête à l'emploi, Kit LSAB-K681, Dako). L'excès de sérum a été ensuite éliminé. Après 5 minutes de rinçage au PBS à deux reprises, les coupes ont été incubées avec un anticorps de liaison biotinylé de souris et de lapin (Dako) pendant 10 minutes à température ambiante. Puis, elles ont été incubées en présence de l'anticorps primaire anti-oncoprotéine pS2 (anticorps monoclonal pS2 prêt pour emploi : AM 190-5M, EuroBio, Les Ulis, France) à température ambiante pendant 2 heures.

Les coupes ont été successivement rincées dans du PBS pendant 5 minutes, placées dans une solution contenant de l'Amino-3-Ethyl-9-Carbazole (AEC, Dako 697) et rincées à l'eau courante pendant 10 à 15 minutes. Elles ont été ensuite contre colorées avec de l'hématoxyline de Harris durant 15 secondes et rincées à l'eau distillée. Enfin ces coupes ont été immergées dans de l'eau ammoniacale (2 mL d'ammoniacale pour un litre d'eau), puis dans de l'eau bidistillée, ensuite dans de l'alcool absolu (passage), et enfin dans du toluène. Elles ont été montées entre lame et lamelle en milieu aqueux (EukittTM : Surgipath, Labonord, France) puis observées.

RESULTATS

Les tumeurs seront considérées comme positives si plus de 10 % des cellules sont marquées et négatives si plus de 90 % des cellules ne sont pas marquées.

La protéine pS2 était localisée dans le cytoplasme tandis que le RE se trouve exclusivement dans le noyau (Figure 1).

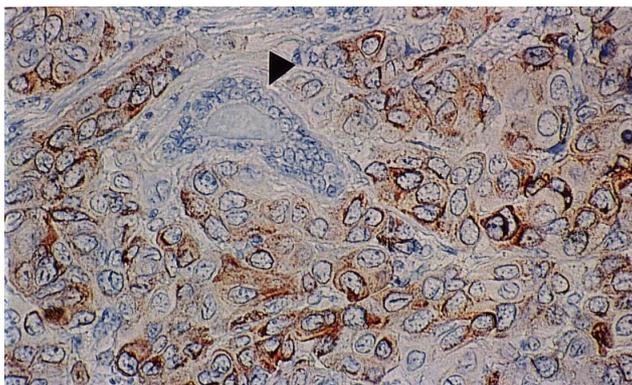


Figure 1 : Carcinome canalaire infiltrant de grade III : noter le marquage à l'anticorps anti pS2 du cytoplasme des cellules tumorales et l'absence de marquage des cellules d'un canal résiduel normal (Gr. x 250).

On observe souvent une densification périnucléaire correspondant probablement à l'appareil de Golgi. Le marquage par les anticorps est hétérogène (Figure 2).

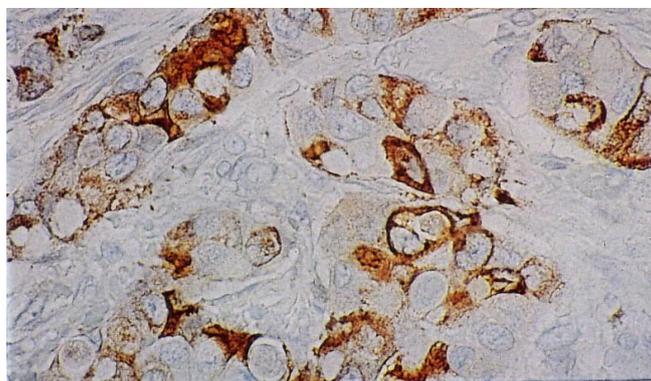


Figure 2 : Carcinome canalaire infiltrant de grade II : environ 60% des cellules néoplasiques montrent au niveau de leur cytoplasme un marquage à l'anticorps anti pS2 (Gr. x 400).

Au total, 18 cas étaient positifs (48 %), avec le taux diminuant avec la gravité : 2 positifs de grade I (66,7 %), 9 positifs de grade II (56 %), 7 positifs de grade III (39 %) (Tableau 2).

Tableau 2 : Résultats immunohistochimiques des carcinomes canaux infiltrants mammaires

Carcinomes canaux infiltrants	Nombre de cas	pS2 positif	pS2 négatif
Carcinomes canaux infiltrants de grade I	3	2	1
Carcinomes canaux infiltrants de grade II	16	9	7
Carcinomes canaux infiltrants de grade III	18	7	11
Total	37	18 (48 %)	19 (52 %)

DISCUSSION

Dans notre étude, les cas de tumeurs ayant exprimé la pS2 traduisent la présence de récepteurs pour les estrogènes. Nos résultats sont proches de ceux de Schwartz et coll., [16] et de Henry et coll., [3]; en effet, la mise en évidence de la protéine pS2 est un bon indicateur du pronostic. D'autres techniques peuvent être utilisées pour mettre en évidence les ré-

cepteurs à l'estrogène et à la progestérone et la protéine pS2. L'immunohistochimie peut donc être couplée au LBAs (Ligand-Binding Assays), étude dans laquelle il a été montré une importante corrélation entre ces deux méthodes [17]; elle peut également être couplée à l'immunoradiométrie [18].

Une étude rétrospective de 205 cytosols provenant de tumeurs du sein conservées dans

de l'azote liquide a été réalisée par dosage radio-immunologique de la protéine pS2.

En superposant les résultats immunohistochimiques des récepteurs pour l'estrogène, des récepteurs pour la progestérone et la présence de pS2 aux données cliniques et au suivi thérapeutique, des auteurs ont montré que l'évolution des tumeurs qui expriment la protéine pS2 était favorable comparée à celle des tumeurs qui ne l'exprimaient pas.

L'association entre la présence de la protéine pS2 et la réponse à l'hormonothérapie a été démontrée dans une étude *in vivo* portant sur 21 cas de cancers du sein [19]. Une liaison a été établie entre la présence de la protéine pS2 et la rémission de la maladie dans une étude immunohistochimique portant sur 72 cas de cancer du sein avec des métastases diverses chez des patientes ayant reçu un traitement hormonal. Dans le groupe des patientes où la recherche de la protéine pS2 était positive (pS2⁺), 52% ont eu une rémission partielle ou complète, et chez 24%, le processus tumoral était stable. Les taux sont plus bas dans le groupe des patientes où la recherche de la protéine pS2 était négative (pS2⁻), puisque 27% avaient une rémission partielle ou complète, et chez 10%, une stabilisation [16].

L'étude de Henry et coll., [3] incluant 172 cas de carcinomes mammaires et réalisée par dosage immunohistologique sur des coupes paraffinées, a conclu que la présence de pS2 dans la tumeur primaire est prédictive de la réponse à la thérapie hormonale.

Des études concernant plusieurs oncogènes ont révélé que la présence de pS2 ne paraît pas être corrélée au nombre de copies de l'oncoprotéine c-erbB-2 et que pS2 est expri-

mée quand le gène suppresseur de tumeur p53 ne l'est pas [20]. Khan et coll., [21] ont montré que le profil biologique des cancers du sein pourrait varier avec le cycle menstruel. La présence de l'oncoprotéine pS2 dans une lésion tumorale est donc le témoin de son caractère hormonosensible et de la bonne fonctionnalité des récepteurs d'estrogènes.

La pS2 pourrait jouer le rôle d'indicateur de pronostique dans les cancers du sein devant permettre de mieux définir les groupes de patients susceptibles de bénéficier d'une thérapie adjuvante [5].

CONCLUSION

Dans l'espèce humaine, il semble que les hormones jouent un rôle étiologique de premier ordre dans la genèse des cancers du sein, bien qu'un tiers des femmes bénéficient de l'administration d'hormones ou d'anti-hormones ainsi que de l'ablation d'une glande endocrine. La protéine pS2, comme facteur discriminant d'une population à haut risque, a fait l'objet de plusieurs études [22].

Depuis plus d'une décennie, l'une des préoccupations des chercheurs dans le domaine du cancer du sein se situe dans la recherche des facteurs pronostiques. Notre étude va dans ce sens et permet donc de mieux orienter la thérapie des patientes atteintes d'un cancer du sein apparemment non métastasé [2].

Les travaux de biologie moléculaire permettent actuellement de mieux connaître les mécanismes cellulaires de la sensibilité ou de la non-réponse des cellules du cancer du sein aux stimuli hormonaux. Il est aussi indispensable d'étudier plusieurs protéines à la fois pour mieux comprendre la pathogenèse des cancers du sein [20, 23, 24, 25, 26].

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. RIO M. C., BELLOCQ J. P., GAIRARD B., KOEHL C., RENAUD R., CHAMBON P., 1988.- Expression spécifique du gène humain pS2 dans les cancers du sein. *Biochimie*, 70 : 961-968.
2. BESSE G., KWIATKOWSKI F., GAILLARD G., DAVER A., DALIFARD I., BASUYAU J. P., BRUNELLE P., WAFFLART J., ANGIBEAU R. M., AUVRAY E., GOUSSARD J., 1994.- Rôle pronostique de la protéine pS2 dans 1065 cas de cancer du sein. Etude multicentrique. *Bull. Cancer*, 81 : 289-296.
3. HENRY J. A., PIGGOT N. H., MALLICK U. K., NICHOLSON S., FARNDON J. R., WESTLEY B. R., MAY F. E. B., 1991.- PNR-2/pS2 immunohistochemical staining in breast cancer : correlation with prognostic factors and endocrine response. *Br. J. Cancer*, 63 : 615-622.
4. GION M., MIONE R., PAPPAGALO G. L., GATTI C., NASCIMBEN O., BARI M., LEON A. E., VINANTE O., BRUSCAGNI G., 1993.- pS2 in breast cancer- alternative or complementary tool to steroid receptor status? Evaluation of 446 cases. *Br. J. Cancer*, 68 : 374-379.
5. FOEKENS J. A., VAN PUTTEN W. L. J., PORTENGEN H., DE KONING H. Y., THIRION B., ALEXIEVA-FIGUSEH J., KLIJN J. G., 1993.- Pronostic value of pS2 and cathepsin D in 710 human primary breast tumors: multivariate analysis. *J. Clin. Oncol.*, 11 : 899-908.
6. JELTSCH J. M., ROBERTS M., SCHATZ C., GARNIER J. M., BROWN A. M., CHAMBON P., 1987.- Structure of the human estrogen-responsive gene pS2. *Nucl. Acids Res.*, 15 : 1401-1414.

7. ROBERTS M., WALLACE J., JELTSCH J. M., BERRY M., 1988. The 5' flanking region of the human pS2 gene mediates its transcriptional activation by estrogen in MCF-7 cells. *Biochem. and Biophys. Com.*, 151 : 306-313.
8. CAVAILLES V., GARCIA M., ROCHEFORT H., 1989.- Regulation of cathepsin-D and pS2 gene expression by growth factors in MCF-7 human breast cancer cells. *Mol. Endocrinol.*, 3 : 552-558.
9. KIDA N., YOSHIMURA T., MORI K., HAYASHI K., 1989.- Hormonal regulation of synthesis and secretion of pS2 Protein relevant to growth of human breast cancer cells (MCF-7). *Cancer Res.*, 49 : 3494-3498.
10. KUMAR V., GREEN S., BERRY M., CHAMBON P., 1987.- Function domains of the human estrogen receptor. *Cell*, 24 : 941-951.
11. MORI K., FUJII R., UHTA M., KIDA N., OHTA M., HAYASHI K., 1988.- Identification of a polyoetude secreted by human breast cancer cells (MCF-7) as the human estrogen-responsive gene (pS2) product. *Biochem. Biophys. Res. Common.*, 1 : 366-372.
12. FOEKENS J. A., RIO M. C., SEGUIN P., VAN PUTTEN W. L., FAUQUE J., NAP M., KLIJN J. G. M., CHAMBON P., 1990.- Prediction of relapse and survival in breast cancer patients by pS2 protein status. *Cancer Res.*, 50 : 3832-3837.
13. CHO H. S., KATZENELLEN B. S., 1991.- Differential regulation of gene expression by estrogen in estrogen growth-independent and -dependent MCF-7 human breast cancer cells sublines. *Mol. Endocrinol.*, 5 : 1323-1320.
14. KOERNER F. C., GOLDBERG D. E., EDGERTON S. M., SCHWARTZ H., 1992.- pS2 protein and steroid hormone receptors in invasive breast carcinomas. *Int. J. Cancer*, 52 : 183-188.
15. KYPRIANOU N., ENGLISH H. F., DAVIDSON N. E., ISAACS J. T., 1991.- Programmed cell death during regression of the MCF-7 human breast cancer following estrogen ablation. *Cancer Res.*, 51 : 162-166.
16. SCHWARTZ L., KOERNER F., EDGERTON S. M., SAWICKA J. M., RIO M. C., BELLOCQ J. P., CHAMBON P., THOR D., 1991.- pS2 expression and response to hormonal therapy in patients with advanced breast cancer. *Cancer Research*, 51 : 624-628.
17. ELLEDGE R. M., GREEN S., PUGH R., ALLRED D. C., CLARK G. M., HILL J., RAVDIN P., MARTINO S., OSBORNE C. K., 2000.- Estrogen receptor (ER) and progesterone receptor (PgR), by ligand-binding assay compared with ER, PgR and pS2, by immuno-histochemistry in predicting response to tamoxifen in metastatic breast cancer : a Southwest Oncology Group Study. *Int. J. Cancer*, 89(2) : 111-117.
18. LUQMANI Y, TEMMIM L, MEMON A, PARKAR A, ALI M, MOTAWY M, BAKER H., 1999.- Immunoradiometric measurement of pS2 in breast cancer--correlation with steroid receptors and plasminogen activators. *Acta Oncol.*, 38(6) : 805-14.
19. HENRY J. A., NICHOLSON S., HANNESY C., LENNARD T., MAY F., WESTLEY B. R., 1989.- Expression of estrogen regulated pNR-2 mRNA in human breast cancer : relation to estrogen receptor mRNA levels and response to tamoxifen therapy. *Br. J. Cancer*, 61 : 32-38.
20. EDORH A., 1996.- *Expression d'oncogènes et tumeurs mammaires: Etude clinique et développement d'un modèle de souris transgéniques pour v-Ha-ras en toxicologie.* Doctorat de l'Université de Metz, France, 181p.
21. KHAN S. A., GONCHOROFF N. J., MILLER L. E., 1997.- Expression of pS2, c-erbB-2, and cathepsin D during the menstrual cycle in human breast cancers. *Ann. Surg. Oncol.*, 4(6) : 462-469.
22. CHARAFE-JAUFFRE E., EISINGER F., MATHOULIN-PORTIER M. P., SOBOL H., JACQUEMIER J., 2001.- pS2 expression in BRCA1-associated breast cancers. *Anticancer Res.*, 21(4B) : 2877-2881.
23. ATHANASSIADOU P. P., ATHANASSIADES P. H., DAVARIS P., PETRAKAKOU E. I., ZERVA C. I., KYRKOU K. A., 1998.- Expression of cathepsin D and pS2 in imprint smears of breast carcinoma. *Cytopathology*, 9(4) : 240-247.
24. EDORH A., LEROUX A., N'NOSSANI B., PARACHE R. M., RIHN B., 1999.- Detection by immunohistochemistry of c-erbB2 oncoprotein in breast carcinomas and benign mammary lesions. *Cell. Mol. Biol.*, 45(6) : 831-840.
25. SUROWIAK P., DZIEGIEL P., ZABEL M., MATKOWSKI R., KORNAFEL J., 2001.- Prognostic value of immunocytochemical estimation of estrogen receptor (ER) and of pS2 estrogen-dependent protein in cells of mammary ductal carcinoma. Analysis of five-year course of the disease. *Folia Histochem. Cytobiol.*, 39(2) : 143-144.
26. SUROWIAK P., DZIEGIEL P., ZABEL M., MATKOWSKI R., KORNAFEL J., 2001. Analysis of estrogen receptor (ER) and estrogen-dependent pS2 protein expression in cells of mammary ductal carcinoma. *Folia Histochem. Cytobiol.*, 39(2) : 141-142.