



HAL
open science

Etude de l'expression des matrix-métalloprotéases (MMP-2, -7 et -9), des inhibiteurs tissulaires des métalloprotéases (TIMP-1 et -2), des facteurs apoptotiques (P53 et Bcl-2) et des récepteurs hormonaux (RE et RP) dans les cancers et les hyperplasies de l'endomètre par comparaison à l'endomètre sain. Etude de la ploïdie et recherche des anomalies cytogénétiques par FISH. Evaluation de l'implication de ces facteurs dans le processus de carcinogenèse endométriale et de leur intérêt pronostic.

Olivier Graesslin

HAL Id: tel-00811965

<https://theses.hal.science/tel-00811965>

Submitted on 11 Apr 2013

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

► **To cite this version:**

Olivier Graesslin. Etude de l'expression des matrix-métalloprotéases (MMP-2, -7 et -9), des inhibiteurs tissulaires des métalloprotéases (TIMP-1 et -2), des facteurs apoptotiques (P53 et Bcl-2) et des récepteurs hormonaux (RE et RP) dans les cancers et les hyperplasies de l'endomètre par comparaison à l'endomètre sain. Etude de la ploïdie et recherche des anomalies cytogénétiques par FISH. Evaluation de l'implication de ces facteurs dans le processus de carcinogenèse endométriale et de leur intérêt pronostic.. Médecine humaine et pathologie. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2008. Français. NNT : 2008PA066310 . tel-00811965

**THESE DE DOCTORAT DE
L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE**

Spécialité :
Physiologie et physiopathologie
(Ecole Doctorale 394)

Présentée par :
M. Olivier GRAESSLIN

Pour obtenir le grade de :
DOCTEUR de L'UNIVERSITE PIERRE et MARIE CURIE.

Sujet de la thèse :

Etude de l'expression des matrix-métalloprotéases (MMP-2, -7 et -9), des inhibiteurs tissulaires des métalloprotéases (TIMP-1 et -2), des facteurs apoptotiques (P53 et Bcl-2) et des récepteurs hormonaux (RE et RP) dans les cancers et les hyperplasies de l'endomètre par comparaison à l'endomètre sain. Etude de la ploïdie et recherche des anomalies cytogénétiques par FISH. Evaluation de l'implication de ces facteurs dans le processus de carcinogenèse endométriale et de leur intérêt pronostic.

Soutenu le : 26 septembre 2008

Devant le jury composé de :

Mr Le Professeur Emile DARAÏ	(Directeur de thèse)
Mme Le Professeur Christine CLAVEL	(Rapporteur)
Mr Le Professeur Jean-Yves SCOAZEC	(Rapporteur)
Mr Le Professeur Fabrice LECURU	(Président)
Mr Le Professeur Roman ROUZIER	(Examineur)
Mme Myriam POLETTE	(Examineur)

Université Pierre et Marie Curie – Paris 6
15 rue de l'école de Médecine
75270 PARIS Cedex 06.

Remerciements.

Je tiens à remercier les membres du jury :

- Le Professeur Emile Daraï qui a été présent à toutes les étapes de ce travail et m'a guidé et accompagné avec enthousiasme. Sa culture médicale et sa technicité chirurgicale s'associent à un esprit de compagnonnage rarement rencontrés. Qu'il soit assuré de ma plus haute reconnaissance.
- Le Professeur Fabrice Lécuru, dont l'expertise dans le domaine de la pathologie endométriale est reconnue, et qui a immédiatement accepté de juger ce travail.
- Le Professeur Jean-Yves Scoazec, qui a déjà mené tant de travaux scientifiques et dont la présence dans ce jury m'honore.
- Le Professeur Christine Clavel, témoignant un engagement dans la recherche fondamentale et clinique qui est sans failles.
- Le Professeur Roman Rouzier, dont le parcours étincelant en fait un modèle, et avec lequel la collaboration pour ce travail comme pour d'autres projets est si utile et agréable.
- Le Docteur Myriam Polette, experte dans le domaine des métalloprotéases et qui, avec beaucoup de gentillesse, a accepté de juger ce travail.

Mais je tiens également à remercier :

- Le Professeur Christian Quéreux, qui a permis et soutenu ce projet, avec enthousiasme, et dont je suis fier d'être l'élève.
- Le Professeur Serge Uzan, qui m'a accueilli dans son service où j'ai pu apprécier, grâce à la motivation de tous et à la sienne en particulier, l'intérêt permanent porté à la recherche clinique au service des patientes.
- Le Professeur Philippe Birembaut, anatomopathologiste et chercheur passionné, dont la collaboration pour ce travail a été précieuse et avec lequel tant d'autres projets devraient voir le jour.
- Les Professeurs Patrice Callard et Jean-Pierre Siffroi qui m'ont généreusement ouvert les portes de leur laboratoire et m'ont souvent donné de précieux conseils.
- Le Docteur Jean Claude Challier pour m'avoir permis d'effectuer ce travail dans l'unité de recherche qu'il dirige.

- Le Docteur Annie Cortez, qui m'a éclairé tout au long de ce travail avec patience, rigueur, enthousiasme et humour.
- Le Docteur Marianne Lorenzato, experte en analyse d'images, technique à laquelle elle m'a initié avec beaucoup de gentillesse.
- Le Docteur Sandrine Chantot-Basatraud, qui m'a ouvert les portes du domaine de la cytogénétique moléculaire avec beaucoup de disponibilité, de pédagogie et de gentillesse.
- Frédéric Commo et Anita Rodenas qui m'ont initié aux techniques d'immunohistochimie.
- Les équipes des laboratoires d'anatomopathologie et de cytogénétique de l'hôpital Tenon qui m'ont chaleureusement accueilli dans leur service.
- Les laboratoires Astra-Zeneca, Organon et l'ARERS ainsi que l'ARRIGO (association rémoise pour la recherche et l'innovation en Gynécologie-Obstétrique) pour leur soutien financier.

Une pensée va également à tous ceux qui, tout au long de mon parcours professionnel, grâce à des échanges toujours nourris avec compétence et enthousiasme, m'ont aidé à me construire. Enfin, mes remerciements vont à Laurence et à nos quatres « petits », à ma famille, à mes proches et à mes amis car leur affection et leur présence me sont si indispensables.

« Connaître son ignorance est la meilleure part de la connaissance. »

Proverbe chinois.

RESUME.

Le cancer de l'endomètre est le cancer gynécologique le plus fréquemment diagnostiqué chez les femmes en Europe, aux USA et au Japon. Les mécanismes de carcinogenèse endométriale sont encore mal appréhendés et les facteurs histopronostiques classiques ne permettent pas toujours de prédire le risque évolutif.

Dans ce travail, l'étude de l'expression des métalloprotéases (MMP-2,-7 et -9) et des inhibiteurs tissulaires des métalloprotéases (TIMP-1 et -2) suggère l'implication de ce système enzymatique dans le processus de carcinogenèse endométriale avec un profil d'expression différent dans l'endomètre normal, l'hyperplasie et le cancer de l'endomètre. Nous avons par ailleurs pu montrer que l'analyse de l'expression de MMP-2 (gélatinase A) et de TIMP-2 permettait de définir un sous-groupe de cancer de l'endomètre qui était particulièrement à risque d'extension locale et à distance.

Nos résultats ont également permis de confirmer le rôle prépondérant de la perte d'hétérozygotie (LOH) de TP53 dans la genèse des cancers de l'endomètre de type II et la survenue plus tardive de cet événement dans les cancers de l'endomètre de type I (hormonodépendants). En terme de pronostic, l'analyse du gène TP53 par FISH (hybridation par fluorescence in situ) n'est pas supérieure à celle obtenue par IHC (immunohistochimie).

Enfin, l'étude des corrélations histopronostiques réalisée dans ce travail suggère que l'évaluation conjointe de la ploïdie, de MMP-2 et TIMP-2, de p53, du Ki67 et des récepteurs hormonaux (E et P) sur les prélèvements tissulaires pourrait mieux définir une population à haut risque évolutif pouvant bénéficier de thérapeutique ciblée.

Mots-clés : endomètre ; hyperplasie endométriale ; cancer de l'endomètre ; métalloprotéinases ; inhibiteurs tissulaires des métalloprotéinases ; apoptose ; p53 ; récepteurs hormonaux ; ploïdie.

ABSTRACT.

Endometrial carcinoma is the most common gynaecologic malignancy in industrialized countries. Mechanisms involved in endometrial carcinogenesis are not fully understood and the classic prognostic factors failed in some cases to predict clinical outcome.

In the current study, we analysed the expression of metalloproteinases (MMP-2,-7 and -9) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP-1 and -2) in normal endometrium, endometrial hyperplasia and endometrial cancer. Our results support the involvement of MMPs and TIMPs in endometrial carcinogenesis. Strong MMP-2 and weak TIMP-2 expression were potent markers of endometrial aggressiveness with a high risk of local and distant spread.

TP53 loss of heterozygosity (LOH) was preferentially detected in serous endometrial carcinomas and in high-grade endometrioid carcinomas suggesting that different pathways may be involved in endometrial carcinogenesis. In endometrial cancer, TP53 FISH does not appear to add significant prognostic data compared with routine immunohistochemistry.

Finally, histopronostic correlations established in this work suggest that concomitant evaluation of the expression of MMP-2, TIMP-2, ploidy, p53, Ki67 and oestrogen and progesterone receptors on specimens could select patients at high risk of local recurrence and distant spread.

Key-words : endometrium ; hyperplasia ; cancer ; metalloproteinases ; tissue inhibitor of metalloproteinases ; apoptosis ; p53 ; hormonal receptors ; ploidy.

Laboratoires où la thèse a été préparée.

Laboratoire d'accueil :

Dr Jean-Claude CHALLIER

Laboratoire de physiologie de l'implantation

UPRES EA 2396

Faculté de Médecine St Antoine

27 rue de Chaligny

75571-PARIS Cedex 12

Tél: 33140011459

Fax: 33140011423

Jean-Claude.Challier@snv.jussieu.fr

Service d'Anatomie Pathologique

Chef de Service : Pr Patrice CALLARD

Hôpital Tenon

4 rue de la Chine

75020 PARIS

patrice.callard@tnn.aphp.fr

Service de Cytogénétique et de Biologie de la Reproduction

Chef de Service : Pr Jean-Pierre SIFFROI

Hôpital Tenon

4 rue de la Chine

75020 PARIS

jean-pierre.siffroi@tnn.aphp.fr

Laboratoire Pol Bouin

Chef de Service : Pr Philippe BIREMBAUT

Hôpital Maison Blanche

45 rue Cognacq-Jay

51092 REIMS Cedex

pbirembaut@chu-reims.fr

TABLE DES MATIERES.

I. Introduction.

II. Métalloprotéases et apoptose, de l'endomètre normal au cancer.

1. De l'endomètre normal au cancer, aspects physiologiques et anatomopathologiques
 - 1.1. Le cycle menstruel
 - 1.2. Lésions précancéreuses de l'endomètre
 - 1.3. Adénocarcinome de l'endomètre

2. Les métalloprotéases et leurs inhibiteurs
 - 2.1. La famille des MMPs
 - 2.1.1. Structure en domaine des MMPs
 - 2.1.2. Classification des MMPs
 - 2.1.3. Les gènes des métalloprotéases
 - 2.1.4. Les systèmes de régulation des MMPs
 - 2.2. Rôles et activités biologiques des MMPs
 - 2.2.1. Les MMPs au cours du cancer
 - 2.2.2. Nouvelles fonctions des MMPs

3. Cycle cellulaire, apoptose et p53.
 - 3.1. Le cycle cellulaire
 - 3.1.1. Les différentes phases du cycle cellulaire
 - 3.1.2. La régulation du cycle cellulaire
 - 3.2. L'apoptose
 - 3.2.1. Déroulement général de l'apoptose
 - 3.2.2. Famille bcl-2
 - 3.2.3. Famille p53
 - 3.3. P53, cancers et carcinogenèse
 - 3.4. Détection de P53 par immunohistochimie, FISH et autres techniques de biologie moléculaire

4. Les altérations génétiques dans les cancers de l'endomètre
 - 4.1. Aspects de génétique moléculaire associés aux carcinomes endométrioïdes (type I)
 - 4.2. Aspects de génétique moléculaire associés aux carcinomes non endométrioïdes (type II)
 - 4.3. Autres protooncogènes impliqués

III. Matériel et Méthodes.

1. Matériel (origine des prélèvements)
2. Méthodes.
 - 2.1. Immunohistochimie
 - 2.1.1. Technique d'IHC
 - 2.1.2. Anticorps
 - 2.1.3. Analyse quantitative et semi-quantitative
 - 2.2. Quantification de l'ADN par analyse d'images
 - 2.2.1. Principe de la quantification d'ADN
 - 2.2.2. Coloration de Feulgen
 - 2.2.3. Etapes de la quantification
 - 2.2.4. Expression et traitement des résultats
 - 2.3. Hybridation in situ par fluorescence (FISH)
 - 2.3.1. Généralités
 - 2.3.2. Préparation de la sonde p53 et des coupes
 - 2.3.3. Dénaturation et hybridation
 - 2.3.4. Lavages stringents
 - 2.3.5. Lecture

IV. Résultats.

1. Métalloprotéases (MMP-2, -7, -9) et TIMPs (TIMP-1, -2) dans l'endomètre normal, l'hyperplasie endométriale et le cancer de l'endomètre.

Article 1 : « Expression des Métalloprotéases-2, -7 et -9 et des inhibiteurs des métalloprotéases -1 et -2 dans l'endomètre normal, hyperplasique et tumoral : étude clinicopathologique ».

Article 2 : « L'invasion tumorale dans les cancers de l'endomètre est associée à l'expression de MMP -2 et de TIMP-2 ».

2. Expression des facteurs apoptotiques (p53 et bcl-2) et de la ploïdie dans les cancers de l'endomètre.

Article 3 : « Analyse de l'expression de P53 par FISH et immunohistochimie dans le cancer de l'endomètre ; valeur pronostique et corrélation avec la ploïdie ».

3. Résultats non publiés.

V. Synthèse des résultats et discussion.

VI. Conclusion.

VII. Références bibliographiques.

Liste des abréviations.

Ac : anticorps

ADAM : a disintegrin-like and metalloprotease

ADAMTs : a disintegrin-like and metalloprotease with thrombospondin repeats

ADN : acide désoxyribonucléique

AF : activation function

AIF : apoptosis inducing factor

AP-1 : Activator Protein-1 (facteur de transcription)

APC : adenomatous polyposis coli protein

ARN : acide ribonucléique

ARNm : acide ribonucléique messenger

Cdk : cyclin dependent kinase

CE : cancer de l'endomètre

Ced : cell death

CGH : hybridation génomique comparative (Comparative Genomic Hybridization)

Chr : chromosome

Cm : centromérique

COX : cyclooxygénase

CpG : dinucléotide composé d'une cytosine suivi d'une guanine

CTNNB1 : catenin (cadherin-associated protein) beta 1

DS : déviation standard

E : estrogènes

EGF : epidermal growth factor

EIC : endometrial intraepithelial carcinoma

EIN : endometrial intraepithelial neoplasia

EMMPRIN : extracellular matrix metalloproteinase inducer

ERK : extracellular signal-regulated protein kinase

ET-1 : endothéline-1

Ets : E26 transformation specific

ETV5 : ets variant gene 5

FasL : Fas-Ligand

Fig. : figure

FIGO : fédération internationale de gynécologie-obstétrique

FISH : hybridation in situ en fluorescence (Fluorescence In Situ Hybridization)
GADD : growth arrest and DNA damage
GPI : glycosylphosphatidyl inositol
GSK : glycogène synthétase kinase
HA : hyperplasie atypique
HB-EGF : heparin binding-epidermal growth factor
HE : hyperplasie endométriale
HER2-neu : human epidermal growth factor receptor 2
HES : hématoxyline éosine safran (coloration histologique)
HNPCC : hereditary non-polyposis colorectal cancer
HS : hyperplasie simple
IFN : interféron
IGF : insulin growth factor
IHC : immunohistochimie
IL : interleukine
IRM : imagerie par résonance magnétique
JNK : c-jun N-terminal kinase
kDa : kiloDalton
LIF : leukemia inhibitory factor
LOH : perte d'hétérozygotie (loss of heterozygosity)
Ls : locus spécifique
MAPK : mitogen-activated protein kinase
Mdm-2 : murine double minute 2
MEC : matrice extracellulaire
MLH1 : mutL homolog 1(DNA mismatch repair protein Mlh1)
MMP : métalloprotéinases ou métalloprotéases matricielles
MMR : mismatch repair
MSH2 : mutS homolog 2
MSI : microsatellite instability
MT-MMP : membrane-type matrix-metalloproteinase
NC1 : non collagenous
NS : non significatif
P : progestérone
t-PA : activateur du plasminogène de type tissulaire
u-PA : activateur du plasminogène de type urokinase

PCR : polymerase chain reaction
PDGF : platelet derived growth factor
PEA-3 : polyoma enhancer A binding protein-3
PEP : phosphoénolpyruvate
PG : prostaglandines
PK : protéine kinase
PTEN : phosphatase and tensin homolog
Rb : gène du rétinoblastome
Rc : récepteur
RE : récepteurs aux estrogènes
RECK : reversion inducing cysteine rich protein with Kazal motifs
RP : récepteurs à la progestérone
RPA : isoforme A du récepteur à la progestérone
RPB : isoforme B du récepteur à la progestérone
SSCP : single strand conformation polymorphism
RUNX1 : runt-related transcription factor 1
hTERT : human telomerase reverse transcriptase
TGF- β : transforming growth factor β
TIMP : inhibiteur tissulaire des métalloprotéinases
TNF- α : tumor necrosis factor α
VEGF : vascular endothelial growth factor
Wnt : voie de signalisation intracellulaire (homologue de Wingless chez la drosophile)
wt : wild type
Zn : ion zinc

Introduction.

INTRODUCTION.

Le cancer de l'endomètre (CE) est le cancer gynécologique le plus fréquemment diagnostiqué chez les femmes en Europe, aux USA et au Japon [1].

L'ensemble des données épidémiologiques et cliniques suggère le rôle des œstrogènes dans l'étiologie de ces cancers [2, 3]. La carcinogenèse est un processus progressif s'accompagnant de modifications génétiques, biochimiques et morphologiques. Le CE fait suite à des lésions d'hyperplasie glandulaire atypique du fait d'une hyperstimulation de l'endomètre par les œstrogènes mais certains types de cancers de l'endomètre, plus rares, sont œstrogène-indépendants et sans hyperplasie précessive [4, 5]. Bien que certains mécanismes de carcinogenèse dans les cancers gynécologiques soient mieux compris, en partie grâce à la biologie moléculaire, il est nécessaire de poursuivre ces investigations [6]. Certains résultats publiés sont encore fragmentaires et contradictoires ne permettant pas de tirer des conclusions formelles [7].

Le risque d'extension et de récurrence des CE est directement corrélé au grade histologique, au stade chirurgical, à l'extension cervicale, au degré d'invasion myométriale, à l'existence de métastases en incluant les sites ganglionnaires (métastases ganglionnaires dans 10 à 15% des cas), et à la positivité de la cytologie péritonéale [2]. Néanmoins, ces paramètres histopronostiques semblent se révéler insuffisants pour prédire de façon pertinente le risque de récurrence et/ou de décès parmi les patientes atteintes de CE, en particulier dans les stades précoces [8]. Le stade clinique est mal corrélé à l'évolution de la pathologie dans près d'un tiers des cas [8]. Malgré les progrès de l'imagerie et en particulier de l'IRM, l'évaluation de ces facteurs pronostiques du CE, histologiques et biologiques, se fait en période per- et post-opératoire. Cette évaluation est importante dans le bilan préthérapeutique des CE pour ne pas surtraiter les formes de bon pronostic et à l'inverse, ne pas sous-traiter les formes de mauvais pronostic.

Des progrès récents en matière d'histopathologie et de biologie moléculaire ont montré l'intérêt de certains marqueurs biologiques dans l'évaluation pronostique et thérapeutique de ces cancers, et ont permis une redéfinition de la classification anatomopathologique [9] en mettant en évidence des lésions endométriales intra-épithéliales, précurseurs de certains CE.

Le but du travail que nous avons mené est double. Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés au processus de carcinogenèse endométriale en comparant le profil moléculaire de l'endomètre normal, hyperplasique et tumoral en s'intéressant

spécialement aux métalloprotéinases matricielles qui ont été peu étudiées dans la pathologie endométriale. L'amélioration des connaissances biologiques de ces CE et en particulier de leur profil moléculaire devrait permettre de mieux comprendre le développement et le comportement de ces tumeurs. Dans un second temps, nous nous sommes intéressés à la corrélation entre le profil moléculaire et le comportement clinique de ces CE, en comparant l'expression des différents paramètres biologiques étudiés et les données cliniques et histologiques recueillies pour chaque patiente présentant un CE.

Nous avons donc étudié, grâce à des techniques d'immunohistochimie, le profil d'expression des métalloprotéinases et des inhibiteurs tissulaires (MMP-2, -7, et -9, TIMP-1 et -2), des protéines impliquées dans l'apoptose (p53 et bcl-2), du facteur de prolifération (Ki67), des récepteurs hormonaux (RE et RP) dans l'endomètre tumoral et hyperplasique par comparaison à l'endomètre sain. Nous avons également étudié la ploïdie en utilisant une technique de cytométrie par analyse d'images et recherché des anomalies cytogénétiques dans les CE, par hybridation in situ en fluorescence en étudiant le gène TP53.

**Métalloprotéases et apoptose, de
l'endomètre normal au cancer.**

II. Métalloprotéases et apoptose, de l'endomètre normal au cancer.

L'endomètre humain est un tissu unique, remarquable par son remodelage chez l'adulte. En effet, ce tissu se renouvelle complètement en un mois tout au long de la vie reproductive de la femme sous l'action de la production cyclique des hormones stéroïdes sexuelles synthétisées par l'ovaire. Prolifération, différenciation et menstruation impliquent surtout les deux tiers supérieurs de la muqueuse qui correspondent à la partie fonctionnelle de la muqueuse. En l'absence de grossesse, la couche fonctionnelle de l'endomètre est éliminée au cours de la phase menstruelle du cycle et remplacée par un tissu développé à partir de la couche basale où les modifications morphologiques sont minimales. A l'exception de quelques rares mammifères, ce mécanisme cyclique particulier est spécifique des hominidés et des singes dont il a assuré la pérennité au cours de l'évolution. Au moment de la ménopause, l'absence d'estrogènes conduit à une involution progressive de l'endomètre pour aboutir à un endomètre atrophique.

1. De l'endomètre normal au cancer, aspects physiologiques et anatomopathologiques.

1.1. Le cycle menstruel : aspects physiologiques et anatomopathologiques.

1.1.1. Physiologie.

La muqueuse utérine est un tissu qui n'a d'existence fonctionnelle réelle que par les hormones sexuelles [10]. En l'absence de celles-ci avant la puberté, après la ménopause ou chez la femme castrée c'est un tissu au repos, presque atrophique, de un ou deux millimètres d'épaisseur, fait de quelques glandes éparses dans un stroma de cellules allongées et sans mitoses.

Tout au long de la vie génitale au contraire, l'endomètre va évoluer constamment sous l'action permanente des estrogènes que module la présence intermittente de progestérone. Les deux hormones exercent des effets très différents sur la muqueuse utérine, par l'intermédiaire de récepteurs hormonaux spécifiques (RE et RP) [11]. En l'absence de grossesse, l'endomètre va s'éliminer au cours des menstruations.

Les estrogènes, hormones de prolifération, sont capables d'agir sur un endomètre, même au repos, car c'est sous l'influence du 17 β estradiol qu'apparaissent ses propres sites récepteurs [12]. Ils font proliférer cette muqueuse qui augmente ainsi d'épaisseur et l'intensité de ce phénomène ainsi que le stade final atteint sont fonction de la quantité d'estrogènes circulants. *La progestérone*, au contraire, n'a aucun effet sur une muqueuse au repos. Pour que son action puisse se manifester, il faut que l'endomètre soit déjà sous influence estrogénique. C'est en effet le 17 β œstradiol qui, au cours de la phase pré-ovulatoire, détermine l'apparition puis l'augmentation des sites récepteurs à la progestérone. Les estrogènes étant également sécrétés pendant la phase lutéale, l'action de la progestérone sur l'endomètre est le résultat d'une action combinée, estro-progestative. L'apparition de progestérone postovulatoire entraîne une réduction des sites récepteurs aux deux hormones.

La chute du taux de progestérone en fin de cycle va déclencher la menstruation en induisant la vasoconstriction des artères spiralées qui est modulée par des prostaglandines telles que PGF2 α et ET-1, sécrétées localement et de façon abondante en phase prémenstruelle au niveau de l'endomètre et du myomètre superficiel [13]. D'autres prostaglandines vasodilatatrices (PGI2 et PGE2) sont présentes au niveau stromal et myométrial au cours de cette phase. C'est le ratio entre ces prostaglandines vasoconstrictrices et dilatatrices qui conditionne en partie le bon déroulement de cette phase. De nombreux systèmes enzymatiques interviennent dans ce processus complexe du contrôle de l'hémorragie menstruelle, et en particulier des enzymes protéolytiques dont les métalloprotéases matricielles (MMPs) et les inhibiteurs tissulaires des métalloprotéases (TIMPs) qui dégradent la matrice extracellulaire et participent ainsi activement à ce phénomène [14]. L'activité des MMPs est médiée par des cytokines et régulée par les hormones stéroïdes sexuelles [15]. Le rôle des facteurs des prostaglandines et des facteurs angiogéniques (VEGF) semble également très important dans le processus de la menstruation [16].

1.1.2. Anatomo-pathologie.

1.1.2.1. Endomètre normal.

L'endomètre tapisse la cavité utérine, renfermant des glandes endométriales qui se distribuent dans le chorion cytogène. L'aspect histomorphométrique de l'endomètre varie selon le moment du cycle menstruel où on l'observe [17].

La **phase proliférative** correspond aux 14 premiers jours du cycle et est sous la dépendance des œstrogènes. Les modifications histologiques qui caractérisent la phase proliférative (Fig. 1 et 2) sont les suivantes : le stroma, les glandes et les vaisseaux prolifèrent pendant toute cette phase avec un pic autour du 10^e jour du cycle, aboutissant à une augmentation du volume de la muqueuse endométriale. Cette prolifération se traduit par une augmentation des mitoses et de la synthèse de l'acide désoxyribonucléique (ADN) et de l'acide ribonucléique (ARN) cytoplasmique [18]. Les glandes sont droites et perpendiculaires à la surface au début de la phase proliférative puis deviennent volumineuses et tortueuses durant la phase proliférative intermédiaire et tardive. Elles sont bordées par un épithélium pseudostratifié, fait de cellules cylindriques aux noyaux en forme de cigare avec de nombreuses figures de mitoses et un petit cytoplasme éosinophile. Durant la phase œstrogénique ou proliférante, les glandes se multiplient, bordées par un revêtement pluristratifié fait de cellules basophiles. Le chorion cytogène est dense, œdémateux et les vaisseaux sont fins.

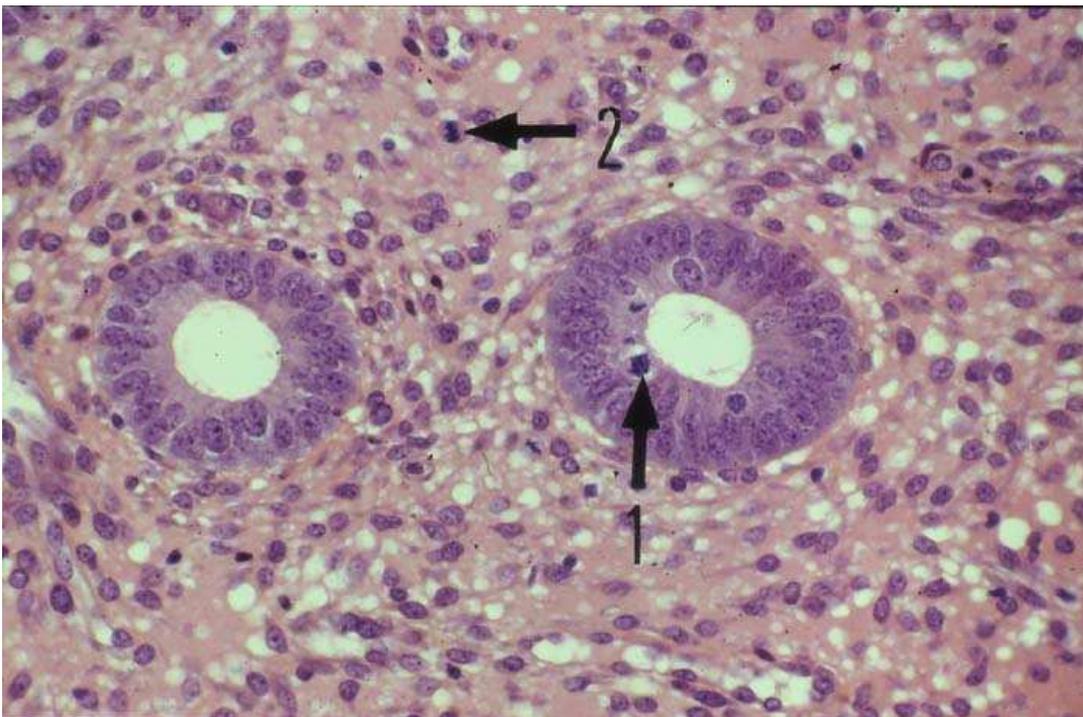


Figure 1 : endomètre en phase proliférative débutante (HES, x 400)
(d'après Atlas d'Histologie Humaine et Animale, FUNDP, consulté à partir de <http://webapps.fundp.ac.be/umdb/histohuma>). Les flèches indiquent les mitoses.

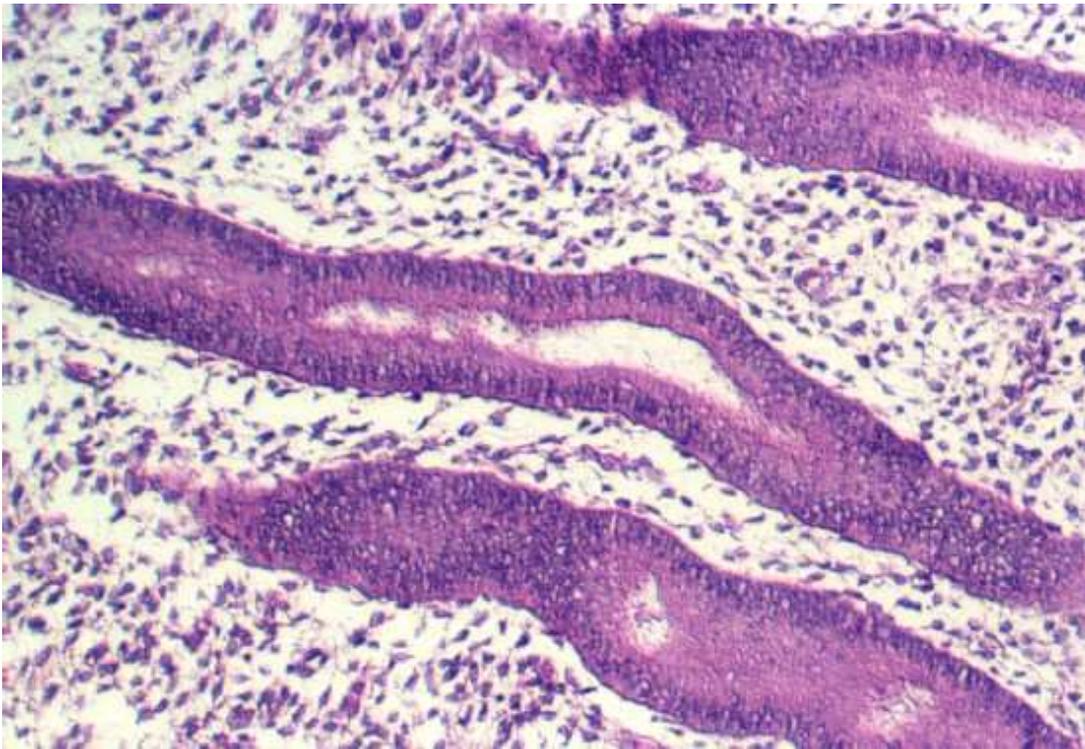


Figure 2 : endomètre en phase proliférative intermédiaire (HES, x 40)
(d'après Atlas d'Histologie, University of Texas Medical Branch, consulté à partir de http://cellbio.utmb.edu/microanatomy/female_reproductive/uterus.htm).

La *phase sécrétoire* (Fig. 3) débute après l'ovulation et dure du 14^{ème} au 28^{ème} jour du cycle. Cette phase sécrétoire est sous l'influence de la progestérone. La progestérone inhibe l'action des estrogènes et cette action antiestrogénique de la progestérone s'exerce de deux façons :

- en inhibant la synthèse des récepteurs des estrogènes et par voie de conséquence des récepteurs de la progestérone, avec une action antiproliférative, qui se manifeste tant sur les glandes que sur le stroma, avec arrêt de la multiplication cellulaire à tous les niveaux, et disparition des mitoses
- en synthétisant la 17 β -hydroxydésydrogénase au niveau des glandes qui convertit l'estradiol en estrone ayant une faible affinité pour les récepteurs des estrogènes.

La progestérone a aussi une action spécifique qui se manifeste au niveau des trois compartiments: glandulaire avec apparition de phénomènes sécrétoires, stromal avec transformation déciduiforme et vasculaire avec un épaissement des parois des artérioles qui se disposent en hélices (artérioles spiralées).

Après l'ovulation, les changements morphologiques permettent de dater l'endomètre au jour le jour. Les premières modifications se voient au niveau des glandes où la synthèse de l'ADN et des mitoses diminue puis disparaît. Les glandes acquièrent des vacuoles

sous-nucléaires dans chaque cellule au 17^{ème} jour du cycle avec des noyaux qui prennent un aspect palissadique. Ces caractères permettent d'affirmer la survenue de l'ovulation. À partir du 19^{ème} jour, les vacuoles ne sont plus que supranucléaires et il existe une sécrétion apocrine du cytoplasme riche en glycoprotéines maximale au 21^{ème} jour du cycle qui coïncide avec la date de l'implantation du blastocyste s'il y a eu fécondation. Cette période a été dénommée fenêtre d'implantation car elle correspond à la courte période pendant laquelle l'implantation est possible. Après cette période, l'endomètre devient réfractaire. L'apoptose qui correspond à une mort cellulaire programmée n'est pas mise en évidence dans les glandes pendant la phase proliférative grâce à l'action de bcl-2 et elle va permettre la diminution progressive du volume des glandes pendant le reste de la phase sécrétoire aux dépens du stroma qui se décidualise [19].

Cette période est aussi associée à la sécrétion d'un certain nombre de protéines qui sont synthétisées par la progestérone (LIF, PEP, crystalloglobuline, intégrines ...).

Le stroma de l'endomètre est composé de fibroblastes spécialisés. Ces fibroblastes répondent aux stimulations hormonales par l'intermédiaire des récepteurs. Le stroma présente peu de modifications avant le 20^{ème} jour. À partir du 20^{ème} jour, les premières modifications qui impliquent le stroma de la muqueuse sont l'apparition d'un œdème qui se fait sous l'action des prostaglandines (PG) E2 et F2 sécrétées par les cellules du stroma et synthétisées par la progestérone [20]. La prolifération endothéliale conduit à un enroulement du système artériel de l'endomètre qui se manifeste sous la forme d'artères spiralées dans la partie fonctionnelle de la muqueuse. Les cellules fibroblastiques se transforment en cellules décidualisées.

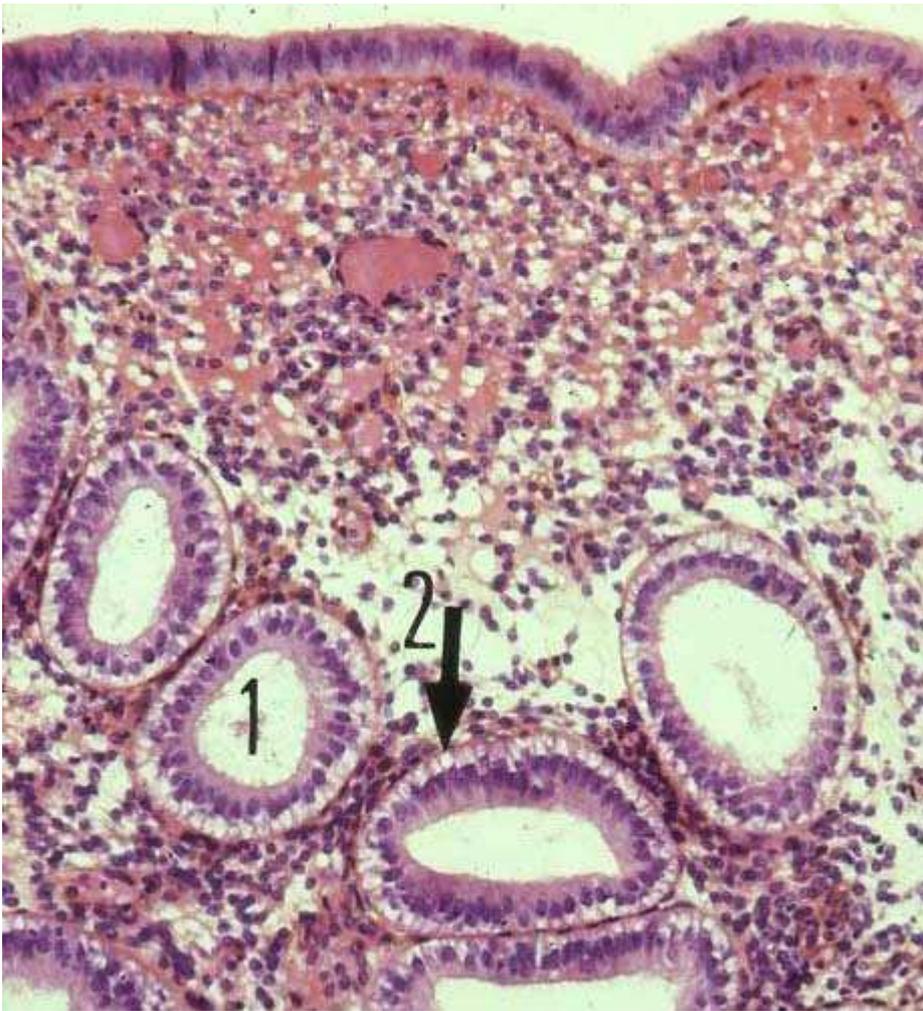


Figure 3 : endomètre en phase sécrétoire débutante (HES, x 400) (d'après Atlas d'Histologie Humaine et Animale, consulté à partir de FUNDP, <http://webapps.fundp.ac.be/umdb/histohuma>). Les flèches indiquent 1) la lumière des glandes, 2) l'accumulation des gouttelettes de glycogène au niveau basal des cellules glandulaires.

La survenue d'une **phase menstruelle** confirme que l'ovulation a eu lieu. La durée de la phase lutéale étant constante, elle permet de prédire la date de l'ovulation. La menstruation est le résultat d'une autodigestion enzymatique et d'une nécrose ischémique liées aux prostaglandines. Durant la deuxième partie de la phase sécrétoire, l'intégrité des membranes lysosomiales est altérée et les enzymes sont déchargées dans la substance cytoplasmique et les espaces intercellulaires. Les enzymes lytiques digèrent les éléments cellulaires, incluant les ponts intercellulaires et les desmosomes. Le rôle des métalloprotéases matricielles est particulièrement important car elles sont à l'origine de la destruction de la matrice extracellulaire et des membranes basales [21]. Leur action localisée permet l'exfoliation limitée de la couche fonctionnelle. Les membranes basales des vaisseaux sont altérées par ces mêmes métalloprotéases matricielles et par la plasmine, ce qui entraîne une dissociation des cellules endothéliales et des phénomènes d'extravasation des globules rouges. Il existe au niveau de l'endothélium vasculaire des

thromboses vasculaires qui conduisent à une nécrose tissulaire. Les PGF et PGE augmentent durant la phase sécrétoire et sont à leur niveau maximal durant la phase menstruelle.

Le tissu menstruel correspond à des cellules du stroma en agrégats sous forme de morules, des glandes rompues et un fond hémorragique et inflammatoire (Fig. 4). La menstruation est stoppée par la vasoconstriction des artères de la partie basale de la muqueuse qui est mise à nu et des artères radiaires et arquées présentes dans le myomètre. La phase régénérative débute au moment de la menstruation et correspond aux premiers jours de la phase proliférative.

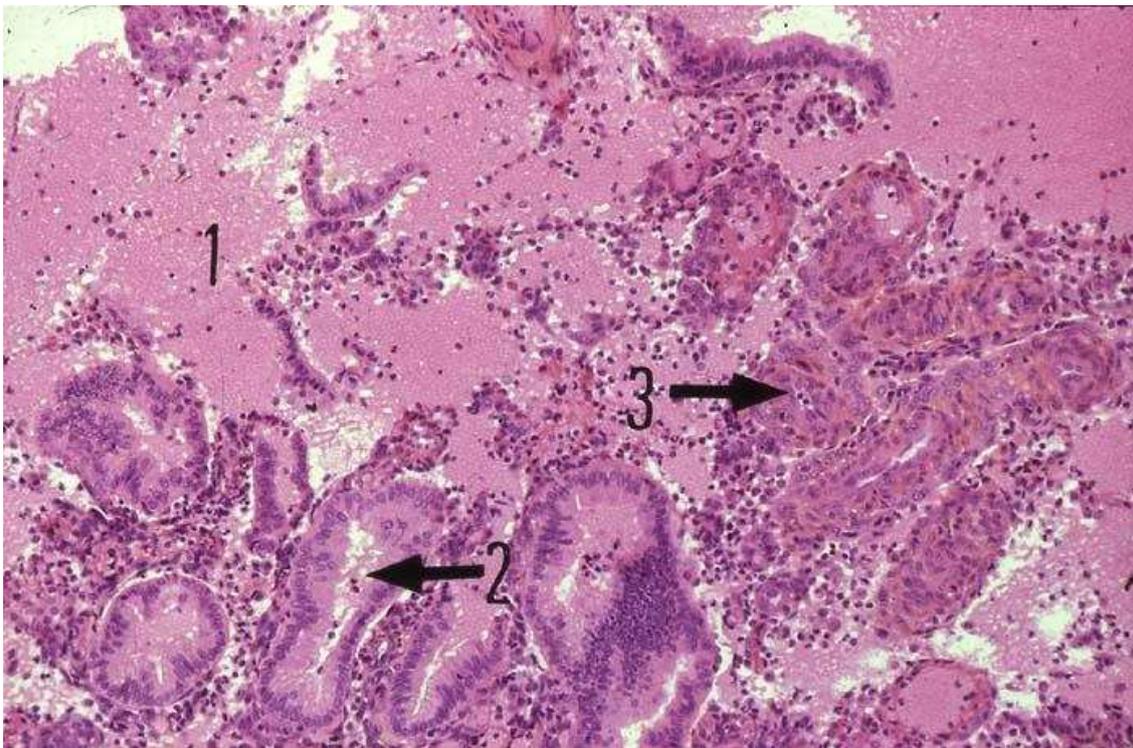


Figure 4 : endomètre en phase menstruelle (HES, x 40)
(d'après Atlas d'Histologie Humaine et Animale, FUNDP, consulté à partir de <http://webapps.fundp.ac.be/umdb/histohuma>). Les flèches indiquent 1) les globules rouges, 2) les tubes glandulaires déformés, 3) fragments d'artérioles spiralées.

1.1.2.2. Endomètre à la ménopause.

En l'absence d'estrogènes endogènes ou exogènes, l'endomètre devient progressivement inactif puis atrophique. Il est composé de glandes comparables à des petites glandes en phase proliférative mais qui deviennent parallèles à la surface de l'épithélium plutôt que perpendiculaires et qui ne contiennent plus de mitoses. Le stroma devient plus compact sans séparation nette entre la partie fonctionnelle et la partie basale. Au début de l'installation de la ménopause, la synthèse de l'ADN est

maintenue ainsi que celle des récepteurs des œstrogènes. En l'absence de progestérone, une stimulation œstrogénique exogène peut induire une hyperplasie qui régresse sous l'action de la progestérone. La muqueuse d'un endomètre atrophique est de faible épaisseur et correspond à la moitié de l'épaisseur de la partie basale d'une muqueuse en période préménopausique. Dans un endomètre atrophique, le stroma est fibreux, comparable au stroma de l'isthme, et les vaisseaux sont oblitérés par la fibrose.

1.2. Lésions précancéreuses de l'endomètre.

Deux types de carcinomes endométriaux sont décrits : les types I, œstrogénodépendants et se développant dans un contexte d'hyper-œstrogénie selon une séquence hyperplasie et cancer et les types II, non œstrogéno-dépendants se développant indépendamment d'une hyperplasie et survenant souvent chez des femmes plus âgées [22].

Les hyperplasies de l'endomètre ont fait l'objet de nombreux travaux et sont toujours l'objet de controverses en particulier concernant leur classification [23].

La classification des hyperplasies glandulaires de l'endomètre est basée sur l'architecture (simple ou complexe) et sur les atypies cellulaires (avec ou sans atypies).

L'**hyperplasie glandulaire simple** correspond à l'augmentation homogène du nombre des glandes endométriales mais sans modification trop importante du rapport Glande/Stroma (rapport G/S), et à la lumière tantôt ectasique tantôt rectiligne ou «angulaire», mais toujours séparées par un stroma abondant et cellulaire (Fig. 5). L'hyperplasie simple est en rapport, initialement, avec une stimulation œstrogénique prolongée non contrebalancée par la progestérone.

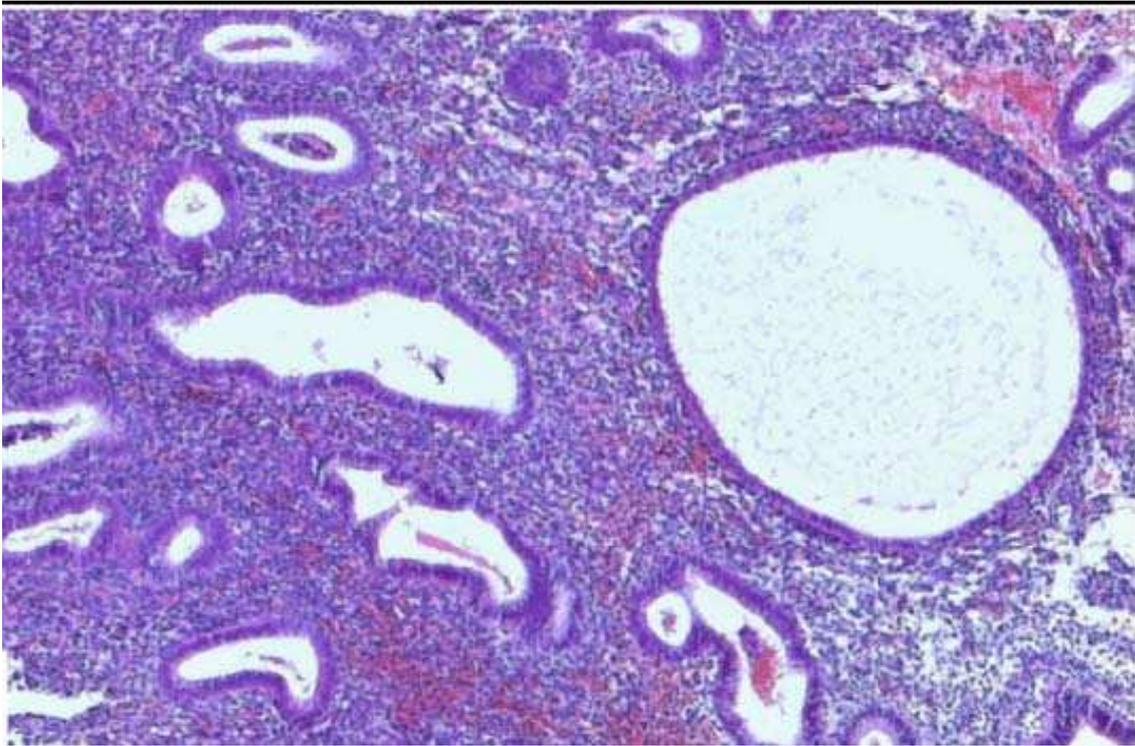


Figure 5 : hyperplasie glandulaire simple (HES, x40) (d'après Horn) [24].

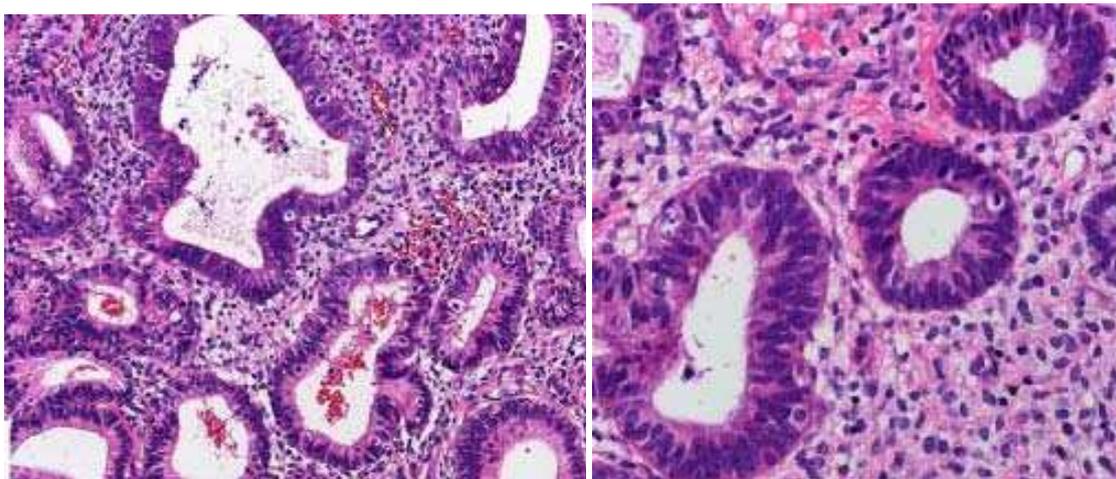
L'hyperplasie glandulaire complexe correspond à l'augmentation du nombre de glandes, disposées de façon anarchique et tassées, laissant souvent persister une faible quantité de stroma entre elles. En effet, le stroma est réduit et le rapport G/S peut aller jusqu'à 3/1.

Les glandes sont bordées soit par des cellules régulières (hyperplasie glandulaire sans atypie) ou par des cellules irrégulières au noyau augmenté de volume hyperchromatique (hyperplasie glandulaire avec atypie).

L'hyperplasie endométriale avec atypies peut être difficile à distinguer des hyperplasies simples mais le rapport G/S est nettement en faveur des glandes, les lésions architecturales sont diffuses (aspect de papilles) et le stroma contient volontiers des histiocytes spumeux (Fig. 6). Cette distinction est importante à faire car seule l'hyperplasie glandulaire avec atypie, qui est une lésion peu ou pas hormonosensible, est considérée comme une lésion précancéreuse des adénocarcinomes de type endométrioïde et nécessite dans ces conditions un traitement adapté.

Certaines études montrent en effet que moins de 2 % des hyperplasies glandulaires sans atypie évoluent vers un cancer, tandis qu'environ 30 % des hyperplasies glandulaires avec atypies évoluent vers un adénocarcinome de type endométrioïde [25]. La

découverte d'une hyperplasie endométriale atypique sur biopsie fait également craindre la coexistence de lésions carcinomateuses [26].



Figures 6 : hyperplasie glandulaire avec atypies (HES, x40 et x 400) (d'après Horn) [24].

Les lésions les plus à risques de progression sont donc les hyperplasies atypiques mais leur diagnostic n'est pas toujours aisé et il y a un défaut de reproductibilité entre histologistes [27]. La classification de ces lésions hyperplasiques tend à évoluer en individualisant les lésions non précancéreuses (non atypiques) et les lésions préinvasives (atypiques) regroupées sous le terme EIN (*Endometrial Intraepithelial Neoplasia*) (Tableau 1).

OMS (2003)	MUTTER
Hyperplasie non atypique : - simple - complexe (adénomateuse)	Hyperplasie endométriale
Hyperplasie atypique : - simple - complexe (adénomateuse)	EIN (Endometrial Intraepithelial Neoplasia)
Adénocarcinome infiltrant	Adénocarcinome infiltrant

Tableau 1 : classification des lésions endométriales selon Mutter et l'OMS (d'après Horn) [24].

La modification du concept de lésions préinvasives introduite par Mutter est liée à la monoclonalité de ces lésions d'EIN pour lesquelles l'expression de PTEN est diminuée voire absente (Fig. 7) [28]. Il est cependant nécessaire de trouver des critères précis et reproductibles pour distinguer ces 2 formes d'hyperplasie dont le potentiel évolutif est différent. Les hyperplasies avec atypies s'accompagnent de modifications génétiques

proches de celles observées dans les cancers alors que les hyperplasies sans atypies correspondent à des cellules proliférantes répondant à un stimulus estrogénique [29, 30].

Les deux gènes clés de la carcinogenèse endométriale seraient deux gènes suppresseurs de tumeurs : PTEN (*Phosphatase and TENsin homolog*), pour les tumeurs de type I (endométrioides) qui agit en maintenant l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1 et permet l'apoptose par un mécanisme AKT-dépendant, et P53 pour les tumeurs de type II non endométrioides. D'autres anomalies génétiques semblent également impliquées à des degrés variables dans le développement des carcinomes endométriaux comme K-Ras (molécule appartenant à la superfamille des GTPase), bêta-caténine (molécule d'adhésion intercellulaire impliquée dans la voie de signalisation Wnt intervenant dans la croissance cellulaire et l'apoptose), l'instabilité des microsatellites (anomalies des gènes MMR, une des 4 voie majeure impliquée dans la réparation de l'ADN)[31].

Ces données sont corroborées par les anomalies mises en évidence par l'analyse en CGH (hybridation génomique comparative) de lésions d'hyperplasie atypique rapportant le même type d'anomalies génétiques [29].

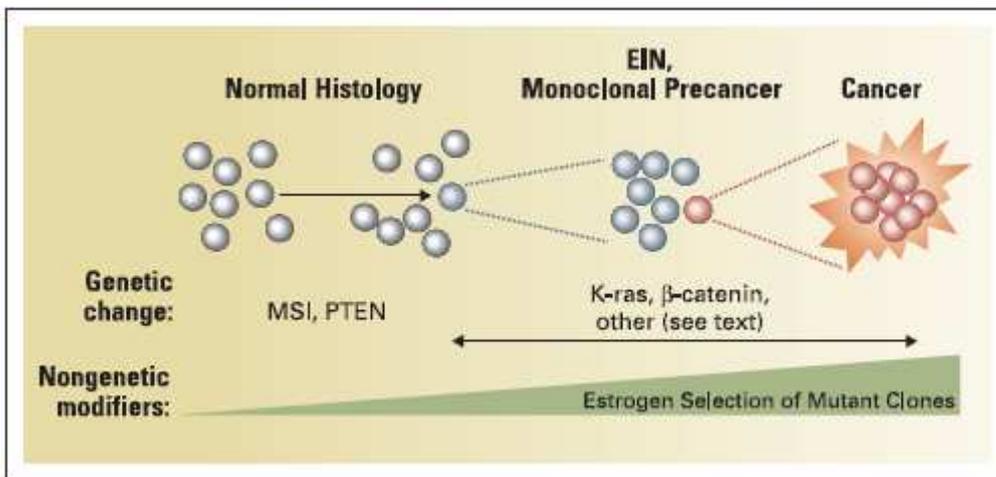


Figure 7 : la néoplasie endométriale intraépithéliale se développe à partir d'un clone mutant et est caractérisée par des modifications architecturales et cellulaires. La combinaison et l'ordre des mutations additionnelles conduisant au développement d'un cancer endométrial invasif varient d'une patiente à l'autre mais incluent de façon générale des anomalies au niveau de K-Ras et de la β-caténine. Des facteurs exogènes comme l'exposition aux hormones sexuelles peuvent agir positivement (estrogènes) ou négativement (progestérone) sur la sélection des clones mutants (d'après Hecht et Mutter) [31].

1.3. Adénocarcinome de l'endomètre.

1.3.1. Epidémiologie.

Le cancer de l'endomètre est le cancer gynécologique le plus fréquent ; en terme d'incidence, il se situe au 4^{ème} rang des cancers chez les femmes. Il est rare avant 40 ans et survient le plus souvent chez des femmes entre 55 et 65 ans, en période post-ménopausique [1]. L'incidence est plus élevée chez les femmes d'origine caucasienne que chez les femmes d'origine africaine ou asiatique et dans les populations urbaines par rapport aux populations rurales [32].

Le pronostic de ce cancer est réputé favorable car il est le plus souvent limité à l'utérus. La survie globale à 5 ans est estimée à 80% pour les stades I, 60% pour les stades II, 30% pour les stades III et 5% pour les stades IV [32]. Néanmoins, il s'agit d'une pathologie hétérogène et la survie globale à 5 ans peut varier de 92% à 42% dans les stades I selon le type histologique et le grade de la tumeur [33].

Les facteurs de risque de cette pathologie sont relativement bien connus : prédisposition génétique de type HNPCC (*hereditary non-polyposis colorectal cancer*), ménarche précoce et ménopause tardive augmentant la fenêtre d'exposition aux hormones sexuelles, nulliparité, infertilité et en particulier les femmes présentant un syndrome des ovaires polykystiques (PCO ou *polycystic ovary syndrome*) du fait d'un niveau élevé d'estrogènes endogènes, traitement hormonal substitutif à base d'estrogènes seuls, obésité (induisant une hyperestrogénie du fait de la conversion périphérique des androgènes en estrogènes par aromatisation dans le tissu adipeux), traitement par tamoxifène et existence d'une hyperplasie endométriale avec atypies [1].

1.3.2. Anatomie pathologique.

Durant les 20 dernières années, les études clinicopathologiques, immunohistochimiques et moléculaires ont permis de différencier 2 types de cancers de l'endomètre que sont les types I et II précédemment évoqués (Fig. 8).

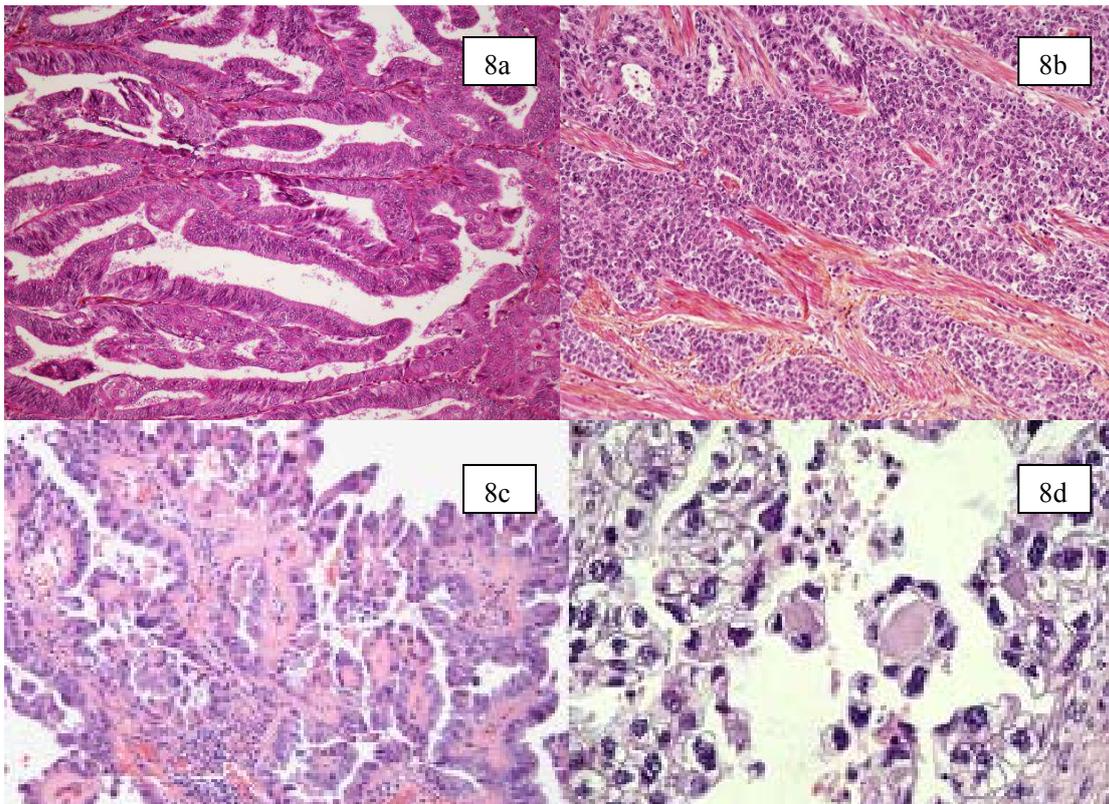
Le cancer endométrioïde est la forme la plus fréquente (80% des cancers de l'endomètre) et ressemble sur le plan morphologique à un endomètre en phase proliférative [4]. Dans cette forme, il est possible d'observer une différenciation épidermoïde, séreuse, mucineuse ou à cellules claires mais qui ne doit pas occuper plus de 10% du volume tumoral. Le grade est évalué de 1 à 3 selon l'architecture de la tumeur (grade 1 si les zones solides occupant moins de 5% de la tumeur, grade 2 si les

zones solides occupent de 6 à 50% de la surface tumorale et grade 3 si elles excèdent plus de 50% de la surface tumorale) et selon les anomalies nucléaires.

Les autres types histologiques de cancer de l'endomètre sont plus rares et figurent dans le tableau rappelant la classification anatomopathologique proposée par l'OMS (2003) (tableau 2).

Carcinome endométrial endométrioïde	Carcinome endométrial non endométrioïde
Variante commune : - carcinome endométrioïde avec/sans différenciation épidermoïde Variantes rares : - adénocarcinome villoglandulaire - adénocarcinome sécrétoire - adénocarcinome à cellules ciliées	- carcinome séreux papillaire - carcinome à cellules claires - carcinome épidermoïde - carcinome mucineux - carcinome mixte - carcinome transitionnel - carcinome à petites cellules - carcinome indifférencié

Tableau 2 : classification des carcinomes de l'endomètre (selon OMS, 2003).



Figures 8 : adénocarcinomes (adk) de l'endomètre, aspects anatomopathologiques : adk endométrioïde bien différencié de grade 1 (8a) et peu différencié de grade 3 (8b), adk séreux papillaire (8c) et adk à cellules claires (8d) (coloration HES, photos 8c et 8d d'après Doll) [34].

Les facteurs pronostiques histopathologiques classiques du cancer de l'endomètre peuvent être divisés en 2 groupes [2]:

- des facteurs utérins qui comprennent :
 - type histologique (le pronostic des cancers de type II étant plus péjoratif)
 - le grade
 - la profondeur d'invasion myométriale
 - la présence d'emboles lymphovasculaires
 - l'atteinte de l'isthme ou du col utérins
- des facteurs extra-utérins (permettant de définir le stade de la pathologie) :
 - âge de la patiente
 - atteinte des annexes, du vagin
 - métastases intrapéritonéales
 - cytologie péritonéale positive
 - atteinte ganglionnaire pelvienne ou paraaortique (nombre de ganglions métastatiques avec/sans rupture capsulaire).

Pourtant, malgré la connaissance du stade de la maladie (tableau 3) et des facteurs histopronostiques évoqués, l'évolution de la pathologie est mal corrélée à ces paramètres dans près de 25 à 30% des cas [8], suggérant que d'autres paramètres biologiques seraient utiles pour rendre plus pertinente l'analyse pronostique en permettant ainsi d'adapter les stratégies thérapeutiques. Il n'y a pas à l'heure actuelle de recommandations concernant l'utilisation en pratique clinique de paramètres moléculaires permettant d'affiner ce point.

Stade I I A I B I C	Tumeur limitée à l'endomètre Invasion ≤ 50% du myomètre Invasion > 50% du myomètre
Stade II II A II B	Extension limitée aux glandes de l'endocol Invasion du stroma cervical
Stade III III A III B III C	Invasion de la séreuse et/ou des annexes et/ou cytologie péritonéale + Métastases vaginales Métastases ganglionnaires pelviennes et/ou paraaortiques
<i>Stade IV</i> IV A IV B	Invasion vésicale ou extension digestive Métastases à distance

Tableau 3 : Classification FIGO des cancers de l'endomètre (d'après Benedet) [35].

2. Les métalloprotéases et leurs inhibiteurs.

Les métalloprotéinases matricielles (MMPs) et leurs inhibiteurs tissulaires (TIMPs) sont impliqués dans le remodelage de la matrice extra-cellulaire [21, 36-39]. Les MMPs comptent plus de 28 membres et 4 pour les TIMPs. Ils interviennent dans de nombreux processus biologiques et sont très impliqués dans les modifications endométriales survenant au cours du cycle menstruel. Ces enzymes appartiennent à la famille des endopeptidases zinc-dépendantes et sont classés selon la spécificité de leur substrat ou selon leur structure (collagénases, stromélysines, matrilysines, gélatinases, MMPs membranaires ou MT-MMPs) [40-42]. Ces MMPs ont en commun la présence de zinc dans le site catalytique, une synthèse sous forme inactive (pro-enzyme), l'activation du zymogène dans le compartiment extracellulaire, la reconnaissance et le clivage de la MEC par le site catalytique, et l'inactivation par des inhibiteurs présents dans le milieu extracellulaire (Fig. 9).



Figure 9 : structure schématique des MMPs.

Les MMPs synthétisées sous forme inactive par les cellules vont être activées par différents stimuli intra- ou extra-cellulaires : cytokines sécrétées par les lymphocytes, protéinases (urokinase plasminogène activator (uPA), autres MMPs comme la MMP-7 est capable d'activer la MMP-9). Une fois activées, les MMPs peuvent être inhibées par une famille d'inhibiteurs tissulaires spécifiques (TIMPs) dont 4 ont été identifiés. Ces TIMPs partagent une importante homologie de séquence. Il existe aussi des inhibiteurs plasmatiques de ces MMPs (macroglobulines).

La régulation de ces MMPs est complexe, se fait aux niveaux transcriptionnel et post-transcriptionnel, et fait intervenir différents facteurs. Cette régulation peut aussi s'exercer par l'intermédiaire des hormones stéroïdes [15, 21]. Les TIMPs semblent avoir

d'autres rôles biologiques n'impliquant pas leur activité anti-protéasique : stimulation de la croissance cellulaire, facteur apoptotique, facteur de transcription, activité angiogénique [43].

L'augmentation de l'expression des MMPs est corrélée au phénotype malin des cancers humains [44]. Il a déjà été montré que l'expression des MMPs était corrélée au grade et à l'agressivité des cancers du sein, de la thyroïde et de l'ovaire [45-47]. MMP-2, MMP-7 et MMP-9 seraient des enzymes clés dans le cancer de l'endomètre comme dans d'autres tumeurs solides bien que les résultats de la littérature ne soient pas univoques [48, 49].

Plusieurs travaux établissent la corrélation entre le degré d'expression et d'activité de ces MMPs et l'agressivité des CE en altérant le micro-environnement qui induit l'invasion tumorale et le processus métastatique [50-52]. L'action de ces enzymes réside essentiellement dans la dégradation de la matrice extracellulaire, mais ils interagissent également avec les cytokines, les facteurs de croissance, les molécules d'adhésion (cell-cell ou cell-matrix) participant également par ce biais aux phénomènes d'invasion. Par ailleurs, la dégradation de macromolécules de la MEC et de molécules impliquées dans l'adhésion intercellulaire peut libérer des sites cryptiques pouvant aboutir à la modification du comportement cellulaire.

2.1. La famille des MMPs.

Les Métalloprotéases (MMPs) de la Matrice Extra Cellulaire (MEC) forment une famille de 28 endopeptidases qui présentent des homologies de structure. L'une de leurs principales caractéristiques est d'être constituées d'une séquence polypeptidique comprenant un résidu cystéine qui contient un atome de Zinc (Zn) d'où leur nom générique de métalloprotéases. Sous forme activée, elles peuvent dégrader la plupart des composants de la matrice extracellulaire. Leur activation est responsable de l'induction de chimiotactisme et de migration cellulaire, d'apoptose et d'inflammation. Les MMPs jouent un rôle fondamental au cours de l'embryogenèse, du remodelage des tissus normaux, des mécanismes de cicatrisation et de l'angiogenèse. La dérégulation de leur activité peut être responsable de l'apparition ou du développement de lésions endovasculaires, d'arthrite, de néphropathies, d'anévrismes, d'ulcérations tissulaires et ont un effet facilitateur sur le développement de nombreux cancers. En 1962, Gross et Lapierre [53] décrivent pour la première fois l'activité d'une MMP. Il s'agissait d'une collagénase interstitielle présente dans la queue d'un amphibien en métamorphose.

Depuis, près d'une trentaine d'enzymes ont été rattachées à cette famille de protéases [54, 55]. L'homogénéité de cette famille de protéases tient à cinq caractéristiques communes : chacune d'elle dégrade au moins un des composants de la MEC, elles ont une activité au pH physiologique, elles nécessitent la présence d'un ion Zn par molécule pour être actives, elles sont inactivées par des chélateurs de métaux et par les Inhibiteurs Tissulaires des MMPs (TIMP), et enfin elles sont synthétisées dans le réticulum endoplasmique et sécrétées par exocytose vers le milieu extracellulaire dans les grains de zymogène sous la forme d'un propeptide inactif qui nécessite une protéolyse extracellulaire spécifique pour son activation. Les MMPs sont soit sécrétées (MMP-1–13, MMP-18–23, MMP-26–28) soit fixées à la membrane cellulaire par un domaine transmembranaire (membrane-type MMP ou MT-MMP) (MMP-14–17 et MMP-24–25).

2.1.1. Structure en domaine des MMPs.

Les MMPs ont une structure composée de plusieurs domaines (Fig. 10 et 11). Toutes les MMPs ont 3 domaines en commun. Le *prédomaine*, qui sert à leur transport intracellulaire vers le milieu extra cellulaire, le *prodomaine* qui maintient la MMP sous forme inactive par une séquence peptidique comprenant un résidu cystéine qui interagit comme quatrième ligand de l'ion Zn (les trois autres étant 3 résidus histidine faisant partie de la structure tridimensionnelle du site catalytique en forme de poche), et le *domaine catalytique* proprement dit [56].

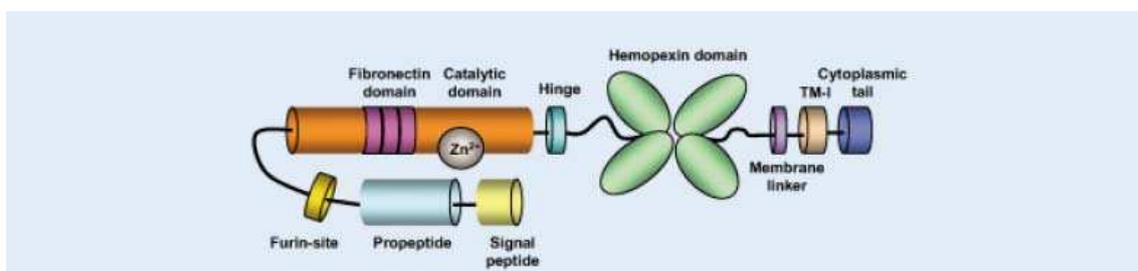


Figure 10 : structure en domaine des MMPs (d'après Folgueras) [56].

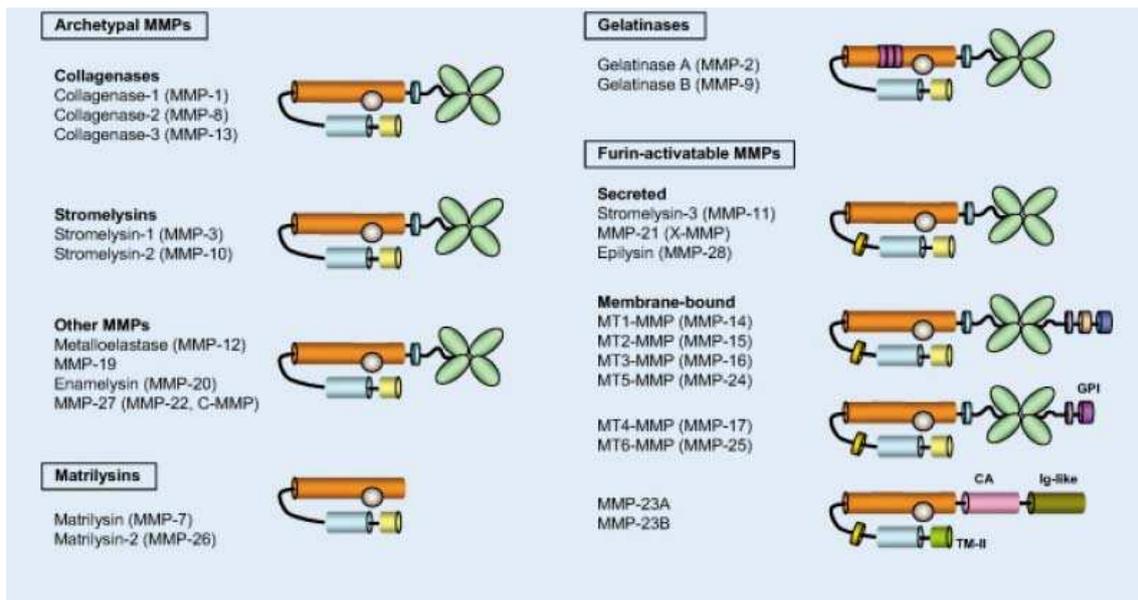


Figure 11 : classification structurale des MMPs basée sur leur organisation en domaines (d'après Folgueras) [56].

2.1.2. Classification des MMPs.

On compte actuellement 28 MMPs réparties en 6 sous-familles en fonction de leur structure et de leur fonction.

La première sous-famille comprend les collagénases interstitielles, la seconde les gélatinases (A et B ou MMP-2 et MMP-9), la troisième les stromélysines, la quatrième les matrilysines, la cinquième les MMPs de type membranaire (MT-MMP) et la sixième les autres MMPs qui forment un groupe hétérogène car elles sont inclassables dans les 5 sous-familles précédentes (Fig. 12). Parmi ces MMPs, MMP-18 et MMP-21 ne sont connues que chez le xénope. Il faut remarquer qu'en dehors de la séquence portant l'ion Zn, les MMPs ont des structures moléculaires parfois très différentes. Elles acceptent souvent plusieurs substrats et peuvent être activatrices les unes des autres, ce qui rend artificielle la classification précédente qui prend en compte des homologies de structure ou les substrats communs. C'est l'une des raisons pour lesquelles tous les auteurs ne donnent pas strictement la même classification dans les différentes sous-familles. Les classifications et informations sur les MMPs sont rapportées dans le tableau 4 ; des informations complémentaires sont disponibles sur le site <http://genome.ucsc.edu/index.html>.

A l'exception des matrilysines (MMP-7 et MMP-26), toutes les MMPs ont un domaine hématopexine intervenant dans la spécificité du substrat [57, 58]. Les gélatinases A et B

contiennent un domaine fibronectine-like de liaison aux gélatines. MMP-9 possède également un domaine collagen-like type V. Les MT-MMPs ont un domaine transmembranaire et une courte « queue » intracytoplasmique (MMP-14-16, MMP-24) ou un domaine glycoposphatidyl-inositol d'ancrage (MMP-17, MMP-25).

No.	MMP No.	Class	Enzyme
1	MMP-1	Collagenases	Collagenase-1
2	MMP-8		Neutrophil collagenase
3	MMP-13		Collagenase-3
4	MMP-18		Collagenase-4
5	MMP-2	Gelatinases	Gelatinase-A
6	MMP-9		Gelatinases-B
7	MMP-3	Stromelysins	Stromelysin-1
8	MMP-10		Stromelysin-2
9	MMP-11		Stromelysin-3
10	MMP-27		Homology to stromelysin-2 (51.6%)
11	MMP-7	Matrilysins	Matrilysin (PUMP)
12	MMP-26		Matrilysin-2
13	MMP-14	MT-MMP (membrane type)	MT1-MMP
14	MMP-15		MT2-MMP
15	MMP-16		MT3-MMP
16	MMP-17		MT4-MMP
17	MMP-24		MT5-MMP
18	MMP-25		MT6-MMP
19	MMP-12		Other enzymes
20	MMP-19	RASI 1	
21	MMP-20	Enamelysin	
22	MMP-21	MMP identified on chromosome 1	
23	MMP-22	MMP identified on chromosome 1	
24	MMP-23	From human ovary cDNA	
25	MMP-28	Epilysin	
26	MMP-29	Unnamed	

Figure 12 : classification des différentes familles de MMPs (d'après Verma) [54].

Nom de fonction	MMPs	Localisation du gène	Substrat	Poids moléculaire
Collagénases				
Collagénase-1 (interstitielle)	MMP-1	11q22.3	Collagènes III > I > II	52 kDa
Collagénase-2 (de neutrophile)	MMP-8	11q22.2	Collagènes I > III, II	73 kDa
Collagénase-3 (de type rongeur)	MMP-13	11q22.2	Collagènes II > I = III, pro-MMP-9	48 kDa
Gélatinases				
Gélatinase A	MMP-2	16q12.2	Gélatines, collagènes I, IV, V, VII, X, XI, élastine, fibronectine, laminine, aggrecane	72 kDa
Gélatinase B	MMP-9	20q13.12	Gélatines, collagène IV, V, élastine	92 kDa
Stromélysines				
Stromélysine-1	MMP-3	16q12.2	Aggrecane, fibronectine, laminine, gélatines, collagène IV, pro-MMP-8 et -9	52 kDa
Stromélysine -2	MMP-10	16q12.2	Aggrecane, fibronectine, collagène IV, pro-MMP-8	47 kDa
Stromélysine-3	MMP-11	22q11.23	IGFBP-1	60 kDa
Matrilysines				
Matrilysine-1	MMP-7	16q12.2	Aggrecane, fibronectine, laminine, gélatines, collagène IV, élastine, pro-MMP -9	23 kDa
Matrilysine-2	MMP-26	11p15.4	Collagène IV, gélatines, fibronectine, IGFBP-1, pro-MMP-9	30 kDa
MMPs membranaires				
MT1-MMP	MMP-14	14q11.2	Pro-MMP-2, pro-MMP-13, pro-TNF α , collagènes I, II, III, fibronectine, laminine	66 kDa
MT2-MMP	MMP-15	16q13	Pro-MMP-2, pro-TNF α	68 kDa
MT3-MMP	MMP-16	8q21.3	Pro-MMP-2, pro-TNF α	69 kDa
MT4-MMP	MMP-17	12q24.33	Pro-MMP-2, pro-TNF α	68 kDa
MT5-MMP	MMP-24	20q11.22	Pro-MMP-2	39 kDa
MT6-MMP	MMP-25	16p13.3	Pro-MMP-2, pro-MMP-9, α -1 proteinase inhibitor	62 kDa
Autres MMPs				
Métalloélastase	MMP-12	16q12.2	Elastine, fibronectine, laminine, gélatines, collagène IV	54 kDa
Stromélysine-4	MMP-19	12q13.2	Collagène IV, gélatines, fibronectine, laminine	57 kDa
Enamélysine	MMP-20	16q12.2	Amélogénine	54 kDa
CA-MMP	MMP-23	1p36.3	Gélatine	53 kDa
Homologue de la CMMP	MMP-27	11q22.2	-	-
Epilysine	MMP-28	17q12	Caséine	59 kDa

Tableau 4 : métalloprotéases matricielles humaines (adapté de Galant) [59].

2.1.3. Les gènes des métalloprotéases.

La localisation des gènes des métalloprotéases humaines est maintenant connue (tableau 3). Les différentes MMPs ont une structure génomique similaire, ce qui suggère que leurs gènes proviennent d'un gène ancestral commun. Il existe un groupement de gènes dans la région 11q21-23 qui porte 9 des gènes des MMPs présentes dans l'espèce humaine (gènes des MMPs-1, -3,-7,-8,-10,-12,-13,-20 et -27) ; les autres gènes sont situés sur les chromosomes 1, 8, 10, 12, 14, 16, 17, 20 et 22.

2.1.4. Les systèmes de régulation des MMPs.

De nombreux mécanismes de régulation peuvent influencer l'activation des MMPs et donc la dégradation de la MEC [60, 61]. En dépit de la complexité des mécanismes de régulation, il est possible d'identifier trois niveaux majeurs : la régulation transcriptionnelle, l'activation des proenzymes et l'inhibition de leur activité enzymatique. Ces mécanismes devraient permettre de confiner l'activité enzymatique aux endroits et situations biologiquement nécessaires. Cependant, les cellules tumorales développent des stratégies permettant d'échapper à ces points de contrôle de l'activité protéolytique des MMPs, leur permettant d'acquérir de nouvelles propriétés aboutissant à un phénotype de croissance et d'invasion tumorales.

2.1.4.1. La régulation transcriptionnelle.

Il semble que, pour la plupart des MMPs, l'étape clé de la régulation de l'activité soit la transcription puisque les gènes des MMPs sont presque uniquement exprimés lorsqu'il existe un important renouvellement tissulaire, qu'il soit physiologique ou pathologique [61, 62]. De nombreux composés sont des inducteurs parmi lesquels on peut citer les phorbolés [63] et des cytokines comme l'IL-1 ou le TNF- α [64-66] alors que le TGF- β réprime habituellement la transcription des MMPs. MMP-2 qui est aussi exprimée dans des tissus au repos fait exception à ce mécanisme de régulation de l'expression.

Les séquences promotrices de nombreuses MMPs contiennent un élément de réponse AP-1 commun en position -70 et un ou deux éléments de réponse PEA-3 entre 140 et

200 kb. Le premier interagit avec les facteurs transcriptionnels des familles Fos et Jun, et le second avec ceux de la famille Ets. Il a été montré que ces deux éléments jouaient un rôle important dans la régulation au niveau basal et en réponse à des stimuli tels que des cytokines et des facteurs de croissance [67, 68]. D'autres éléments de réponse importants, dont certains peuvent être situés très à distance du début du site d'initiation de la transcription, ont été mis en évidence comme le stromelysine-1 PDGF responsive element en position -1573 du gène de MMP-3 [69, 70]. L'influence des polymorphismes nucléotidiques des régions promotrices des gènes des MMPs commence à être étudiée, ces modifications étant parfois à l'origine d'une différence d'affinité de la région promotrice pour des facteurs de transcription pouvant ainsi avoir un rôle fonctionnel en modifiant le niveau d'expression du gène.

2.1.4.2. La régulation post-transcriptionnelle.

Régulation de la traduction

Les mécanismes de régulation de cette étape sont encore mal connus. Il semble qu'il y ait des mécanismes de modulation de la stabilité des ARNm des stromélysines, des collagénases et de la gélatinase A sous l'action de facteurs de croissance et de certaines cytokines [71, 72].

Régulation post traductionnelle positive ou activation du pro-enzyme.

Une fois sécrétées sous la forme de préMMP le polypeptide doit être activé. Il perd sa sous-unité S (peptide signal) et devient une proMMP. La proMMP peut ensuite être clivée *in vivo* par des protéases [73] ou *in vitro* [74] par des composés chimiques, dans un milieu acide ou sous l'action de la chaleur et devenir alors une MMP activée. Ces agents agissent en modifiant la conformation de la MMP, et ainsi les interactions cystéine-zinc (« *cystein switch model* ») avec pour conséquence de démasquer le site actif [75, 76]. Le clivage protéolytique du prodomaine permet au site catalytique, dont la quatrième valence du Zn est libérée après la pénétration d'une molécule d'eau, de se lier au substrat. *In vivo*, la voie d'activation des MMPs médiée par la plasmine est qualitativement importante du fait de son rôle clé au cours de l'angiogenèse [77]. Elle est produite à partir du plasminogène par le *plasminogen activator* lié à la fibrine et l'*urokinase plasminogen activator* lié à un récepteur membranaire spécifique. Tous deux sont présents dans les membranes cellulaires et sont libérés lors des remaniements

de la MEC. Une fois sous forme activée, outre leur interaction avec leurs substrats, les MMPs peuvent aussi être activatrices les unes des autres comme les MT-MMPs par exemple peuvent activer certaines pro-MMPs [78] : c'est le cas pour la MMP-2. La pro-MMP-2 doit former, avec MT1-MMP (qui est fixée sur la membrane cellulaire) et TIMP-2, un complexe intermédiaire qui par auto-catalyse va donner la forme active de MMP-2. Le niveau de TIMP-2 détermine l'activation ou l'inhibition de MMP-2 (Fig. 13) [79].

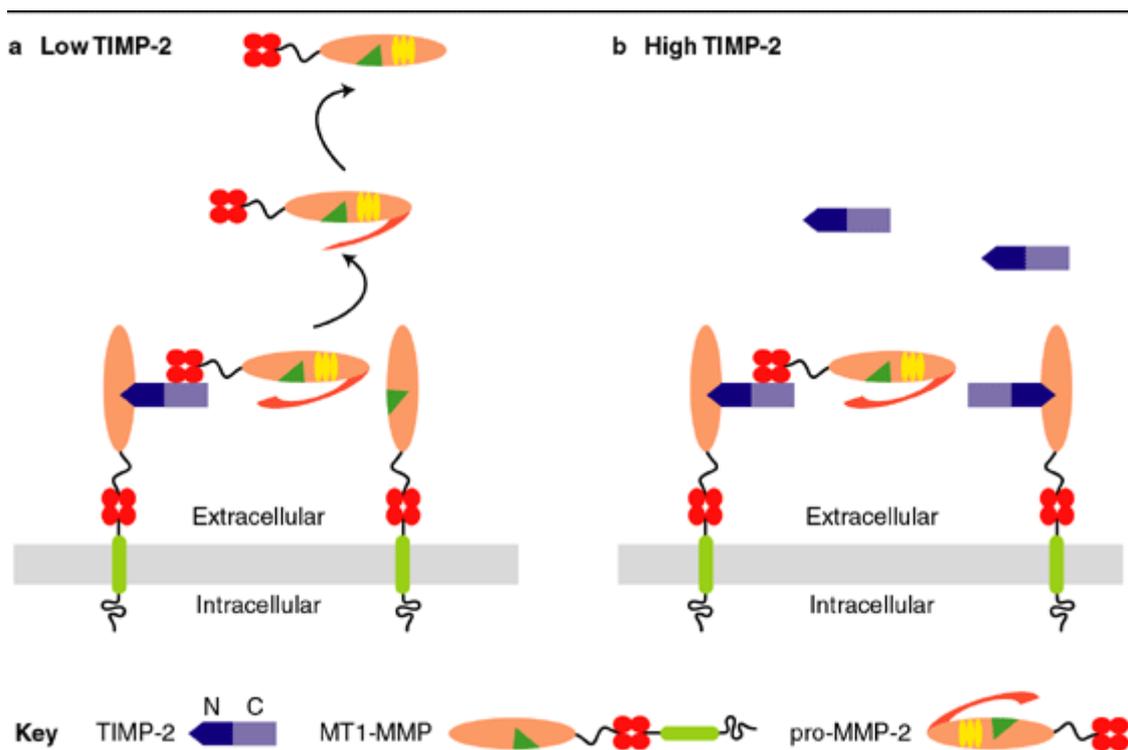


Figure 13 : schéma de l'activation de la pro-MMP-2 en fonction du taux de TIMP-2 (d'après Lafleur) [79].

MT1-MMP à la surface de la cellule agit comme un récepteur de TIMP-2 qui se lie par son extrémité N-terminale au site actif de MT1-MMP. Ce complexe binaire se comporte comme un récepteur à la pro-MMP2 qui vient se fixer par son extrémité C-terminale à TIMP-2. Une molécule de MT1-MMP libre à proximité de ce complexe néoformé va permettre le clivage du propeptide de la pro-MMP2 aboutissant à la libération de MMP-2 après la fin du processus de protéolyse du propeptide. Si toutes les molécules de MT1-MMP sont saturées par un haut niveau de concentration de TIMP-2, le complexe trimoléculaire MT1-MMP, TIMP-2 et pro-MMP2 ne peut libérer MMP-2 du fait de l'impossibilité de cliver son propeptide.

Régulation hormonale.

La plupart des MMPs et des TIMPs sont exprimés dans l'endomètre humain mais leur profil d'expression varie au cours du cycle menstruel [21]. Les pro-MMPs sont produites par les cellules stromales de l'endomètre, sauf la pro-MMP-7 et la pro-MMP-26 qui sont exprimées par les cellules épithéliales. Certaines pro-MMPs sont

également exprimées par divers types de leucocytes, notamment les pro-MMP-8, -9 et -25 par les polynucléaires neutrophiles. L'expression et l'activation péri-menstruelles des MMPs semblent induites par la chute de la concentration plasmatique de la progestérone [80]. En effet, la progestérone est un inhibiteur puissant de l'expression et/ou de l'activation des pro-MMPs-1,-3,-7 et -9 dans les explants d'endomètre en culture [81]. La progestérone agit également par le biais de cytokines et de TIMPs pour contrôler l'expression de certaines MMPs [59] (Fig. 14).

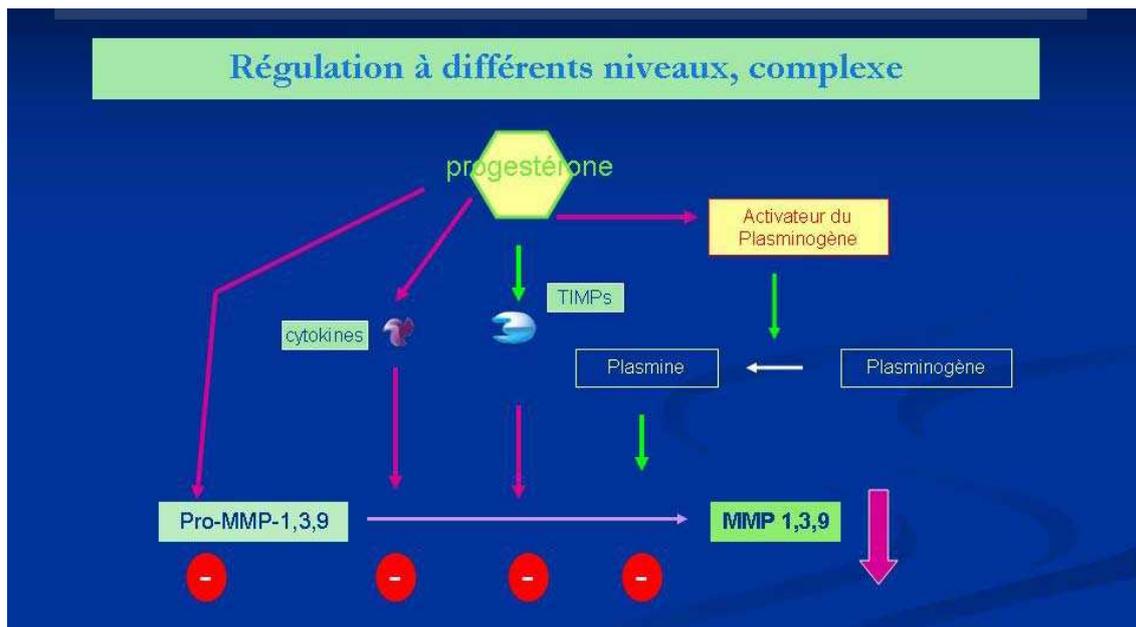


Figure 14 : régulation hormonale de l'activation des pro-MMPs par la progestérone (d'après Goffin) [21].

Régulation post traductionnelle négative ou inhibiteurs endogènes.

L'activité des MMPs peut également être contrôlée par une série d'inhibiteurs endogènes. Certains de ces inhibiteurs endogènes sont des inhibiteurs non spécifiques de protéases (tels que l' α -2 macroglobuline qui bloque l'activité des MMPs dans le plasma et les fluides tissulaires) alors que certains inhibiteurs sont plus spécifiques.

Les TIMPs sont des inhibiteurs spécifiques des MMPs [82] (Fig. 15). Il y en a 4 actuellement connus chez les vertébrés (TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3, TIMP-4). TIMP-1,-2 et -4 sont des protéines sécrétées alors que TIMP-3 est ancrée au niveau de la matrice extra-cellulaire. Ces protéines ont une structure composée d'un domaine N-terminal et C-terminal avec 3 ponts disulfure. Leur expression est régulée parallèlement à celle des MMPs lors des phases du développement embryonnaire ou du remodelage tissulaire. L'étude de TIMP-1 puis celle de TIMP-2 a permis de comprendre leurs mécanismes

d'action [83, 84]. Les TIMPs inhibent les MMPs de façon réversible et stœchiométrique par le biais d'une liaison par leur extrémité N-terminale au site catalytique des MMPs et mimant ainsi leur substrat. Les 4 TIMPs connus peuvent inhiber les formes actives de toutes les MMPs bien que TIMP-1 soit un inhibiteur faible de MMP-19 et de certaines MT-MMPs [85]. Les TIMPs ont par ailleurs des activités biologiques qui activent des cytokines et des facteurs de croissance qui ont eux même une action inhibitrice sur les MMPs [86-88]. Les TIMPs négativent les *A Disintegrin And Metalloproteinase* (ADAM), qui ont une action coopérative positive avec les MMPs qui complète leur action inhibitrice des MMPs [89-91].

La balance entre MMPs et TIMPs au sein d'un tissu tumoral est un facteur essentiel quant à son activité protéolytique. Ce concept est validé par plusieurs études montrant qu'une surproduction de TIMPs réduit le potentiel métastatique expérimental de certaines tumeurs alors que de faibles taux sont corrélés au potentiel évolutif de ces tumeurs [92]. TIMP-2 a par ailleurs une action inhibitrice sur la prolifération des cellules endothéliales *in vitro* et sur l'angiogenèse *in vivo* par un mécanisme indépendant des MMPs [93]. De la même façon, TIMP-3 peut bloquer la liaison entre VEGF et son récepteur.

Des travaux récents ont permis la découverte de nouvelles protéines impliquées dans le blocage des MMPs telles que le *procollagen C-terminal proteinase enhancer*, le *NC1 domain of type IV collagen*, le *tissue factor pathway inhibitor-2* et la protéine RECK (*reversion-inducing cystein rich protein with kazal motifs*) [56].

Néanmoins, le rôle des TIMPs, à l'instar de celui des MMPs, ne se limite pas à l'inhibition des MMPs, ce qui montre une fois de plus la complexité du fonctionnement et de la régulation de ce système enzymatique aussi bien dans les situations physiologiques que pathologiques (Fig. 16). TIMP-1 a d'abord été identifié comme potentialisateur de l'activité érythroïde et comme facteur de croissance de certaines lignées cellulaires [82]. TIMP-2 possède le même type de propriétés. Certains TIMPs ont une activité antiproliférative alors que d'autres ont un effet positif sur la progression tumorale ; ce comportement paradoxal est également observé vis-à-vis de l'apoptose [94, 95].

L'utilisation des TIMPs dans des essais thérapeutiques sur le cancer est un axe de recherche [96, 97]. Néanmoins, avant d'aborder cette phase thérapeutique en tirant profit de leurs effets biologiques, il semble important d'améliorer la compréhension des mécanismes impliqués dans le contrôle de ces effets phénotypiques opposés des TIMPs.

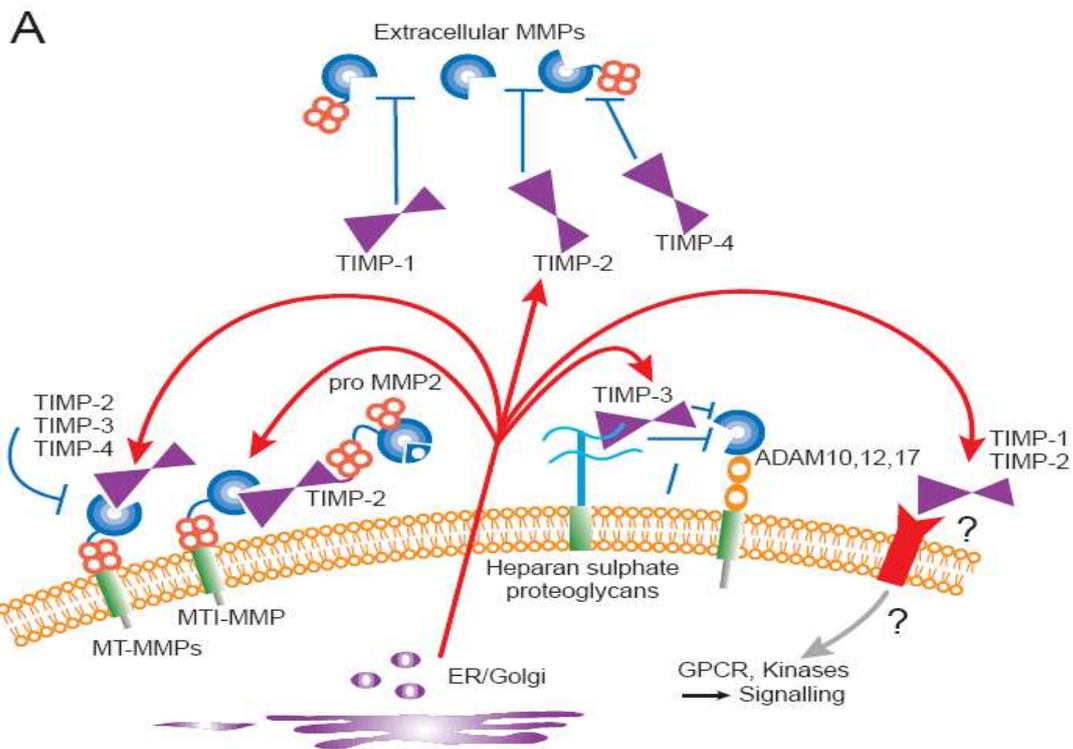


Figure 15 : les inhibiteurs de MMPs dans l'environnement péricellulaire (d'après Baker) [82]. TIMPS-1 à -4 sont des inhibiteurs modulant l'activité des MMPs solubles et membranaires. TIMP-3 est une protéine extracellulaire liée à des protéoglycans à la membrane cellulaire et est un inhibiteur potentiel de certaines ADAMs (*A Disintegrin And a Metalloproteinase*). TIMP-2 agit en conjonction avec MT1-MMP pour former un récepteur pour la pro-MMP2 à la surface de la cellule. Dans certains types cellulaires, TIMP-1 et -2 ont des récepteurs membranaires leur permettant d'agir sur des voies de signalisation intracellulaire régulant le comportement cellulaire.

	TIMP-1	TIMP-2	TIMP-3	TIMP-4
Protein kDa	28	21	24/27	22
N-glycosylation sites	2	0	1	0
Protein localization	Soluble	Soluble/cell surface	ECM	Soluble/cell surface
Pro-MMP association	pro-MMP-9	pro-MMP-2	pro-MMP-2/-9	pro-MMP-2
MMPs poorly inhibited	MT1-MMP MT2-MMP MT3-MMP MT5-MMP MMP-19	None	None	None
ADAM inhibition	ADAM 10	None	ADAM 12 ADAM 17 ADAM 19 (ADAM 10) ADAMTS-4, TS-5	None
Cell proliferation	↑ Erythroid precursors ↑ Tumour cells	↑ Erythroid precursors ↑ Tumour cells ↑ Fibroblasts ↑ Smooth muscle cells ↓ Endothelial cells	↑ Smooth muscle cells and cancer cells*	↑ Mammary tumour cells ↓ Wilm's tumour cells
Apoptosis	↓ Burkitt's lymphoma cells	↑ Colorectal cancer cells ↓ Melanoma	↑ Smooth muscle cells ↑ Tumour cells ↑ Retinal pigmented epithelial cells	↑ Cardiac fibroblasts
Tumour angiogenesis	↑ Mammary ↓ Liver	↓ Melanoma ↓ Mammary	↓ Melanoma	
Angiogenesis in 3D collagen/fibrin gels	No effect	Inhibits	Inhibits	Inhibits
Tumourigenesis effects	Inhibits	Inhibits	Inhibits	Inhibits
Metastasis effects	Stimulates			Stimulates

Figure 16 : fonctions biologiques des TIMPS (d'après Baker) [82].

2.2. Rôles et activités biologiques des MMPs.

La diversité structurale des MMPs est le reflet du nombre et de la complexité des processus biologiques dans lesquels ces enzymes interviennent. L'identification de nouveaux substrats et le développement d'animaux génétiquement modifiés avec des gains ou des pertes de fonction de certaines MMPs ont permis de montrer le rôle essentiel de ces protéases dans de multiples phénomènes physiologiques.

La fonction majeure des MMPs est de permettre le remodelage de la MEC, mais au-delà de leur action protéolytique sur les constituants de la MEC, elles ont de nombreux autres substrats responsables d'activités biologiques très variées [55, 98]. Elles produisent un grand nombre de molécules actives qui interagissent à leur tour avec des facteurs de croissance [99, 100], de l'inflammation, de l'apoptose [101, 102] et de l'angiogenèse [103, 104].

2.2.1. Les MMPs au cours du cancer.

Les MMPs interviennent dans chacune des étapes du processus tumoral conduisant la cellule normale ou simplement dysplasique jusqu'au cancer et à sa diffusion métastatique (Fig. 17). Ces étapes sont successivement l'initiation, la promotion puis la transformation avec comme conséquence la perte d'inhibition de contact et la perte d'adhérence qui conduisent à l'apparition de cellules migratrices. La croissance de la tumeur primitive est dépendante de son potentiel angiogénique et invasif au sein du tissu hôte. Le chimiotactisme et la migration cellulaire coopérative conduisent à l'intravasation des cellules tumorales qui est l'initiation de leur migration. Après avoir survécu dans le flux sanguin ou lymphatique, la cellule tumorale se fixe aux parois vasculaires grâce à des molécules d'adhésion. Après son extravasation elle migre dans les tissus avoisinants pour former un nouveau clone cellulaire sous la forme d'une métastase dont la croissance dépend de son aptitude à reproduire à son tour la séquence des étapes précédentes. A cela s'ajoute la destruction locale de la MEC et des phénomènes d'angiogenèse au cours desquelles les MMPs sont des acteurs importants.

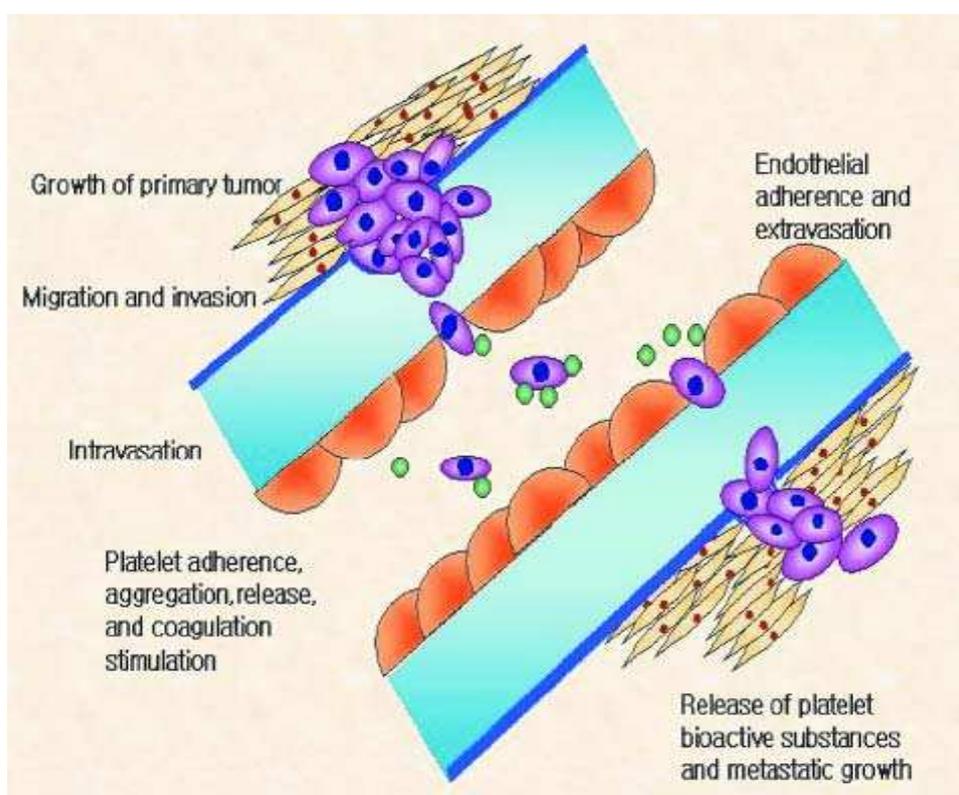


Figure 17 : schématisation du processus métastatique qui est un processus multi-étapes incluant invasion, migration, échappement aux mécanismes immunitaires, extravasation, angiogenèse et croissance tumorale (d'après Yoon) [105].

Modification de l'architecture de la MEC par les MMPs au cours des phases d'invasion et de croissance.

Le rôle des MMPs dans les différentes étapes du développement d'un cancer et leur sécrétion au sein du tissu tumoral a été étudié dès le début des années 1980 après que Liotta eut montré que la protéolyse était l'une des étapes clé de l'invasion tumorale au cours du mélanome [106]. Bien qu'initialement on ait supposé que les MMPs étaient synthétisées exclusivement par les cellules tumorales, il a été montré depuis que ce sont les cellules du stroma qui sont à l'origine de la majeure partie de cette sécrétion [107] et plus particulièrement les fibroblastes, les macrophages et les cellules endothéliales [108]. Dans le cancer du sein par exemple, la sécrétion de MMP-3 est un exemple de la coopération entre les cellules du stroma et les cellules cancéreuses [109]. Bien que la production principale de MMPs se fasse au niveau du compartiment stromal, les cellules tumorales peuvent dans certaines circonstances les sécréter elles-mêmes. Cette production s'accompagne souvent de l'expression d'autres marqueurs et de la perte de plusieurs caractéristiques cellulaires épithéliales, phénomène appelé « transition épithélio-mésenchymateuse » [110]. Cette transition, qui peut être réversible comme ce qui est observé par exemple au niveau de sites métastatiques où les cellules retrouvent leur différenciation épithéliale, reflète la plasticité des cellules cancéreuses durant les processus d'invasion et de migration. La sécrétion des MMPs par les cellules tumorales elles-mêmes pourrait être un marqueur d'agressivité.

Il existe aussi dans certains cas une corrélation entre le stade tumoral et le niveau d'expression des MMPs. Dans le mélanome, l'expression de MMP-2 augmente avec le grade tumoral [111] et l'apparition de MMP-9 correspond au passage d'une croissance horizontale à une croissance en profondeur, et à l'apparition de métastases [112]. Par ailleurs, le stroma des tumeurs bénignes précurseurs de cancer produit une moindre variété de MMPs en comparaison de celui des tumeurs malignes correspondantes. Ainsi, dans les polypes bénins seule MMP-7 est exprimée, alors que dans les adénocarcinomes coliques MMP-1, 2, 3, 7 et 11 sont exprimées [113, 114]. Les MT-MMPs, par leur disposition sur les membranes cellulaires jouent elles aussi un rôle important. Ainsi, MT1-MMP se trouve en plus forte concentration sur le front d'invasion tumoral. Elle y forme un complexe avec CD44, dégrade des composants de la MEC tels que le collagène de type I et coopère avec d'autres MMPs en activant la proMMP-2 qui à son tour dégrade le collagène de type IV [115]. Ce rôle positif des MMPs dans les mécanismes de prolifération et d'invasion des tissus péri-tumoraux a pu être conforté par

des études *in vivo* sur des souris invalidées pour différents gènes des MMPs. Ces mutants étaient moins exposés à la prolifération de tumeurs que leurs témoins non invalidés [116, 117].

Coopération entre cellules stromales et cellules tumorales.

De nombreux facteurs sont impliqués dans la coopération entre cellules tumorales et cellules de l'hôte. Parmi eux, EMMPRIN (*Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer*) qui appartient à la famille des immunoglobulines est produit par les cellules tumorales et est capable de stimuler l'expression de certaines MMPs par les fibroblastes [118] et jouerait un rôle dans l'invasion et la progression tumorales. D'autres facteurs interviennent dans la communication entre les compartiments stromal et tumoral, comme par exemple le TGF β qui joue un rôle important dans la transformation des fibroblastes en myofibroblastes et dans la stimulation de leur production de macromolécules et enzymes protéolytiques au niveau de la matrice extracellulaire [119]. Bien d'autres facteurs solubles intervenant dans cette coopération ont été identifiés et rappellent à quel point les relations entre l'hôte et la tumeur sont complexes et essentielles dans le développement de ce processus pathologique qu'est le cancer.

Implication des MMPs dans la modification du morphotype cellulaire et la perte d'adhérence des cellules tumorales.

Dans les tumeurs cancéreuses, la perte et/ou la redistribution de molécules d'adhésion telles que les cadhérines ou les caténines sont fréquentes. Ces modifications ont plusieurs conséquences majeures comme la perte de cohésion des cellules tumorales entre elles favorisant leur dissémination ou encore la translocation de la β -caténine dans le noyau agissant comme cofacteur dans la transcription de nombreux gènes (c-myc, cyclineD1, CD44, fibronectine ...). MMP-3 et MMP-7 sont plus particulièrement impliquées dans la perte d'adhérence cellulaire et la modification du phénotype cellulaire. En empêchant l'interaction entre la β -caténine et la E-cadhérine, MMP-7 favorise l'activation de la voie Wnt. Elle augmente le pool intracellulaire de β -caténine qui peut ainsi être transloquée dans le noyau et favoriser l'expression de gènes promoteurs du cancer [120]. MMP-3 dégrade la E-cadhérine et rompt ainsi les liaisons intercellulaires [121]. Le complexe E-cadhérine/caténine intervient directement dans la régulation des MMPs.

Rôle des MMPs dans la prolifération cellulaire.

Il s'agit d'un effet collatéral des MMPs [122]. En effet, plusieurs MMPs dont la stromélysine sont capables de digérer des protéines extra-cellulaires qui séquestrent les facteurs de croissance (Fig. 18). C'est le cas par exemple de l'*Insuline-like Growth factor binding protein* (IGF-BP) qui séquestre l'*Insulin Growth Factor* et le libère après dégradation par les MMPs ou de la libération de bFGF (*bound basic fibroblast growth factor*) [123, 124]. Certaines MMPs, dont MMP-11, diminueraient l'apoptose des cellules tumorales en favorisant la libération de l'IGF1 à partir du complexe IGF1-IGF1BP [100, 125]. A l'opposé, MMP-7 par son activité protéolytique génère la forme active soluble Fas-Ligand et potentialise ainsi l'apoptose [102].

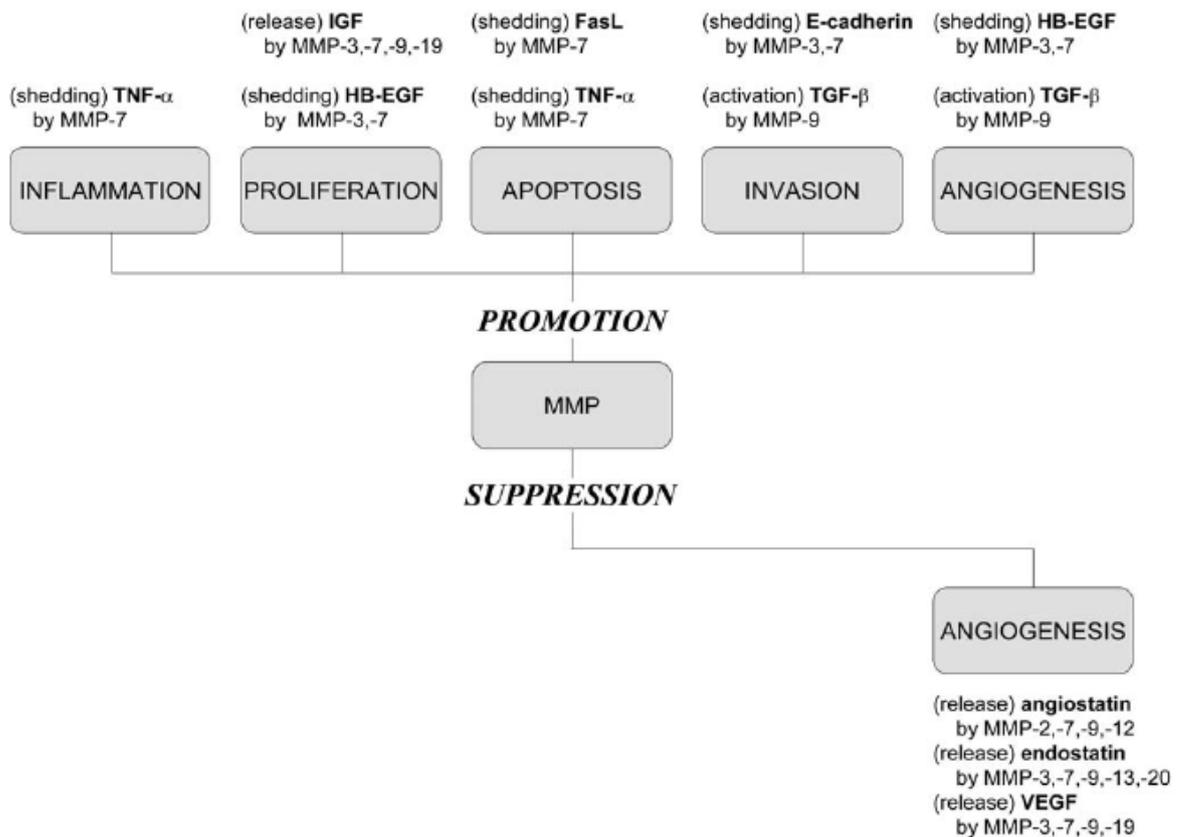


Figure 18 : régulation par les MMPs de l'activité de certaines molécules bioactives (d'après Li) [123].

Rôles des MMPs dans l'angiogénèse.

La formation de néo-vaisseaux est l'un des éléments majeurs de la croissance tumorale et le processus métastatique est fortement dépendant de cette voie de dissémination [126]. Les MMPs jouent un rôle important dans la néoangiogénèse [105].

Au cours de la dégradation de la MEC, le rôle combiné de l'activation du système de transformation du plasminogène en plasmine est essentiel car la plasmine est une protéase à large spectre qui coopère directement et indirectement avec les MMPs pour hydrolyser la fibrine. Le système d'activation de la plasmine est principalement composé de l'activateur du plasminogène de type tissulaire (t-PA) et l'activateur du plasminogène de type urokinase (u-PA) [127, 128]. Ces composés sont trouvés en grande quantité lors des remodelages de la MEC sous l'action des MMPs. Dans les tumeurs, il a été montré que MMP-2, MMP-7 et MMP-9 jouent un rôle promoteur de l'angiogenèse [116, 129]. MMP-2 et MMP-9 sont majoritairement exprimées par les cellules endothéliales situées à l'intérieur et autour de la tumeur ainsi que par les fibroblastes du stroma péri-tumoral. En revanche, les souris invalidées pour MMP-2 ont une angiogenèse tumorale réduite et celles qui sont invalidées pour MMP-9 développent des anomalies vasculaires corrigées par la greffe de moelle de souris non invalidées. Les MT-MMPs jouent elles aussi un rôle important [130]. Enfin, le VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) augmente les taux de MMP-2 et de MT1-MMP, et abaisse ceux de TIMP-1 et TIMP-2 dans des cultures de cellules endothéliales humaines [131]. Ainsi, plusieurs membres de la famille des MMPs exhibent à la fois un effet pro-angiogénique et un effet anti-angiogénique [56].

Rôles des MMPs dans le processus métastatique.

Les MMPs jouent un rôle dans le processus métastatique qui est le résultat des différentes étapes déjà décrites (Fig. 19). En effet, les enzymes protéolytiques permettent l'accès des cellules tumorales aux compartiments lymphatiques et vasculaires, assurant ainsi la croissance cellulaire et l'extension à distance [132]. Dans plusieurs études la preuve de leur implication a été apportée par la mise en évidence d'un effet protecteur soit lors de l'utilisation de TIMPs soit chez des souris invalidées pour le gène de certaines MMPs. Après injection par voie intraveineuse de cellules de mélanome chez des souris traitées par TIMP-2 on observe moins de métastases que chez les souris témoins [133]. L'injection de cellules cancéreuses chez des souris invalidées pour différentes MMPs diminue le nombre de tumeurs [122, 134].

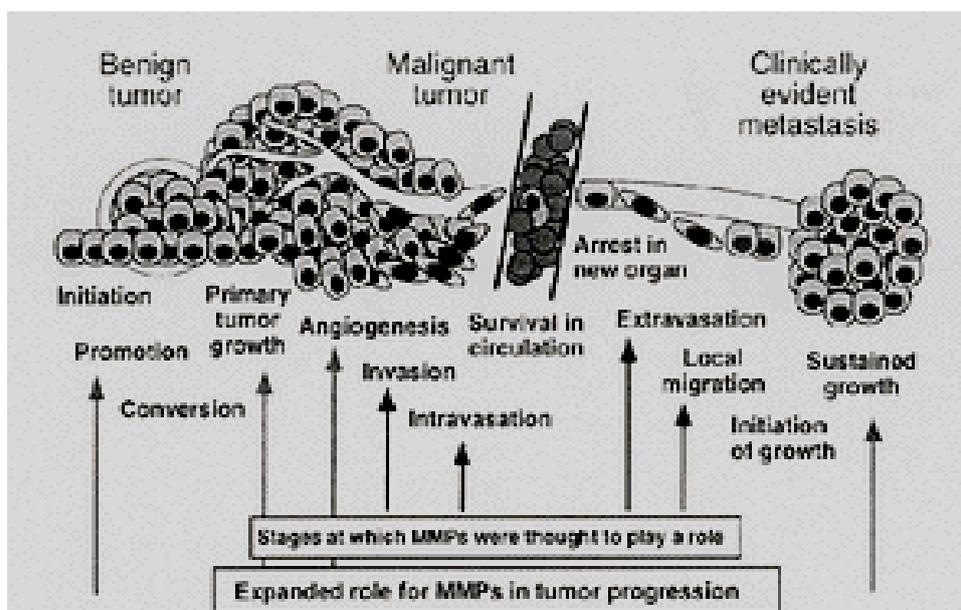


Figure 19 : rôle des metalloproteinases dans la progression tumorale (d'après Nelson) [98].

2.2.2. Nouvelles fonctions des MMPs.

Les MMPs semblent paradoxalement avoir aussi un rôle protecteur vis-à-vis de la progression tumorale [56, 135]. Le rôle des MMPs dans la progression tumorale est en effet bien plus compliqué que ne laisse supposer leur action directe sur la dégradation de la matrice extra-cellulaire. Leurs multiples cibles et le nombre de processus biologiques dans lesquelles elles sont impliquées montrent la complexité fonctionnelle de cette famille d'enzymes protéolytiques [136].

La protéolyse de la matrice extracellulaire permet de découvrir ou de libérer des sites cryptiques de macromolécules modulant la réponse cellulaire (sites matricryptiques ou matrikines).

Les MMPs participent à la croissance tumorale par les mécanismes déjà invoqués précédemment. Néanmoins, leur influence sur les mécanismes de l'apoptose est variable. Ainsi, MMP-3 a des effets pro-apoptotiques au voisinage des cellules épithéliales alors que MMP-7, qui peut libérer Fas-ligand (FasL) fixé à la membrane cellulaire induit l'apoptose de ces mêmes cellules épithéliales [102, 137].

De la même façon, les MMPs modulent de façon variable les réactions immunes anti-tumorales de l'hôte. Ainsi, MMP-9 peut supprimer la prolifération des lymphocytes T par l'intermédiaire d'une voie de signalisation faisant intervenir les interleukines (IL-2R α) [138]. D'autres MMPs peuvent néanmoins stimuler la réponse immune protectrice de l'hôte comme MMP-8 qui pourrait intervenir par le biais de l'inactivation de

cytokines ou chemokines proinflammatoires contribuant ainsi à la résolution de la réponse inflammatoire induite par certains carcinogènes [56].

On peut observer la même dualité quant au rôle des MMPs dans l'angiogenèse. Ainsi, plusieurs facteurs pro-angiogéniques comme le VEGF (*vascular endothelial growth factor*), le bFGF (*basic fibroblast growth factor*) et le TGF- β (*transforming growth factor β*) sont induits ou activés par ces enzymes, facilitant ainsi le remodelage vasculaire et la néovascularisation [122, 139]. Cependant, certaines MMPs sont capables de cliver les précurseurs de l'angiostatine et de l'endostatine et génèrent ainsi les formes actives de ces inhibiteurs endogènes de l'angiogenèse [140]. Hamano a montré que la tumstatin, produit de dégradation du collagène de type IV par MMP-9 intervenait dans la suppression de l'angiogenèse [141].

L'ensemble de ces données illustre la diversité des fonctions des MMPs et met l'accent sur la dualité fonctionnelle de ces enzymes (Fig. 20). Ainsi, il semble indispensable d'identifier le rôle physiologique précis de chacune de ces MMPs et de définir leur participation spécifique dans les multiples étapes de la progression tumorale.

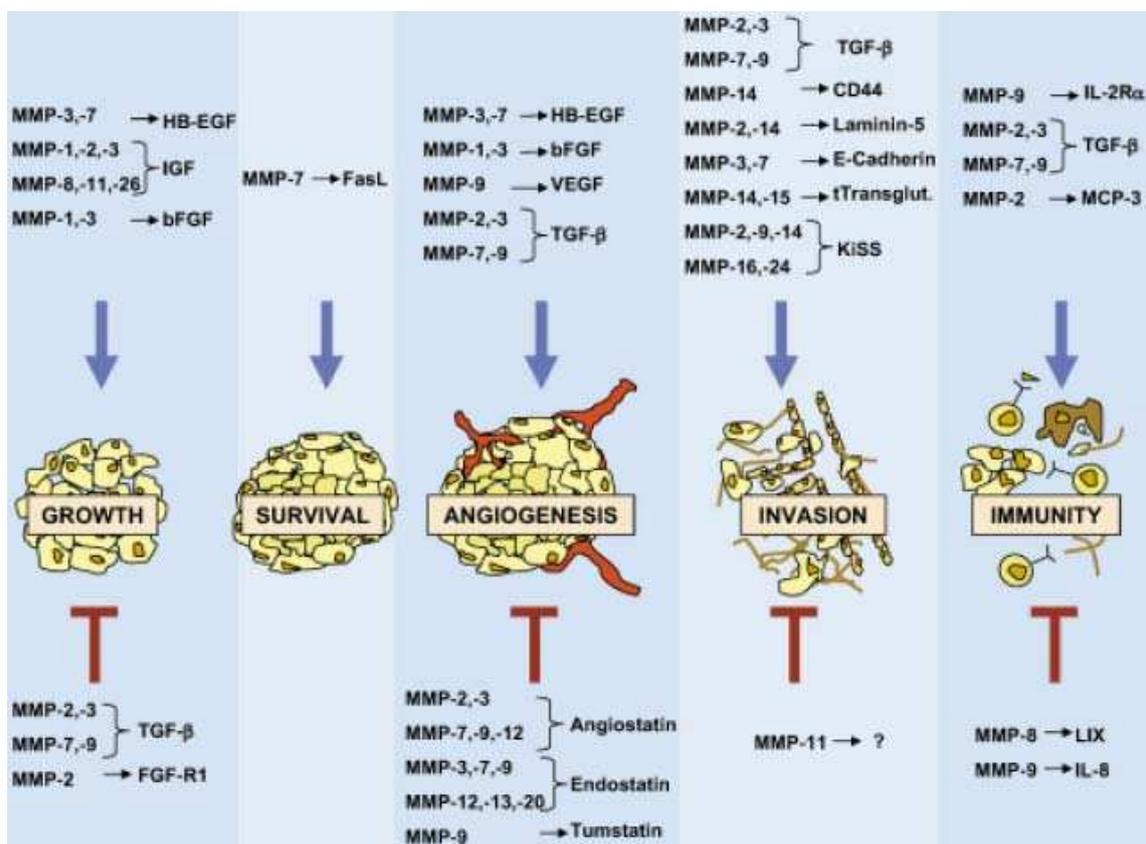


Figure 20 : dualité des fonctions des MMPs dans la progression tumorale (d'après Folgueras) [56].

3. Cycle cellulaire, apoptose et p53.

3.1. Le cycle cellulaire.

Le cycle cellulaire est un mécanisme par lequel les cellules eucaryotes se dupliquent. L'homéostasie tissulaire résulte de l'équilibre entre les cellules mortes et les cellules nouvellement formées et ce phénomène biologique est régulé grâce à la connexion entre le cycle cellulaire et la mort cellulaire programmée (ou apoptose).

3.1.1. Les différentes phases du cycle cellulaire.

Différents événements se succèdent au cours du cycle cellulaire pour permettre à la cellule de se dupliquer. La transmission de l'information génétique d'une cellule à une cellule fille nécessite la réplication du génome pendant la phase S et sa séparation en 2 nouvelles cellules filles pendant la mitose ou phase M. Les phases S et M sont cruciales dans le cycle et sont rigoureusement ordonnées afin de permettre une duplication correcte de la cellule sans accumulation d'anomalies génétiques.

Lors d'un cycle cellulaire normal, on observe une pause entre la synthèse d'ADN (phase S) et la division cellulaire (phase M). Une seconde pause est observée après la mitose et avant la phase S suivante. Le cycle cellulaire comprend donc la phase M, une phase G1, la phase S, une phase G2 avant le retour à la phase M. L'ensemble des périodes G1, S et G2 séparant 2 mitoses est appelé interphase. Dans les tissus, certaines cellules suspendent leur cycle pour sortir de la phase G1, dont la durée est caractéristique du type cellulaire, et entrer en phase quiescente G0.

Le contenu relatif en ADN des cellules au cours du cycle cellulaire varie et passe d'une quantité donnée n en phase G1 à une quantité $2n$ en phase S après réplication. Cette quantité $2n$ est maintenue pendant les phases G2 et M et il est donc facile différencier ces stades par l'analyse du contenu en ADN en utilisant un trieur de cellules (FACS). Pendant l'interphase, la cellule synthétise les ARNs et les protéines et répare les anomalies dans l'ADN qui ont pu apparaître au cours de la phase S correspondant aux erreurs de copie. Pendant la phase M, les synthèses d'ARNs et de protéines sont interrompues en raison de la condensation extrême de l'ADN dans les chromosomes mitotiques.

3.1.2. La régulation du cycle cellulaire.

La durée du cycle cellulaire ainsi que son déroulement sont contrôlés aux différents points de transition G1/S et G2/M mais aussi dans la phase S par des complexes protéiques appelés cyclines, cyclines dépendantes des kinases (CDK) et inhibiteurs des CDK (Fig. 21) [142]. En cas de lésions au niveau de l'ADN ou d'alignement défectueux des chromosomes sur le fuseau mitotique, le cycle est arrêté au niveau de ces points de contrôle pour permettre la réparation des dommages. Après réparation, la cellule poursuit son cycle mais si les lésions sont trop importantes pour être réparées, la cellule entre en apoptose.

La progression de la cellule dans les différentes phases du cycle cellulaire est médiée par l'activation transitoire de complexes cyclines/CDK. Les CDK appartiennent à la famille des sérine/thréonine kinases et leur activité kinase est dépendante de la présence des cyclines. Les cyclines requises pour le déroulement de chacune des phases du cycle cellulaire sont fortement induites lors de la phase concernée puis leur expression est diminuée au cours des phases où elles n'interviennent pas.

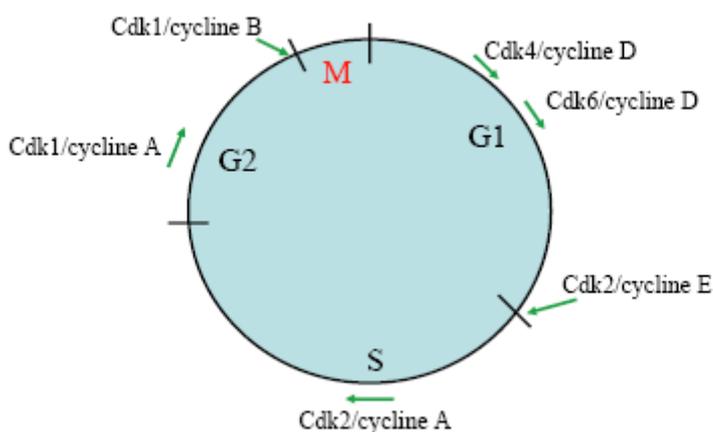


Figure 21 : schématisation du cycle cellulaire et de sa régulation par les cyclines.

3.2. L'apoptose.

L'apoptose, également appelée mort cellulaire programmée est un processus impliqué dans l'homéostasie cellulaire, permettant de maintenir une balance entre la prolifération cellulaire et la mort cellulaire. La notion d'apoptose a été introduite en 1972 par Kerr pour désigner une forme de mort cellulaire totalement différente de la

nécrose, tant d'un point de vue morphologique que biochimique [143]. Néanmoins, en dépit des différences fondamentales entre apoptose et nécrose, des travaux récents remettent en cause la vision réductrice de la dichotomie entre ces 2 mécanismes qui pourraient en fait partager une ou plusieurs voies biochimiques [144].

Il existe plusieurs voies de signalisation aboutissant à la mort cellulaire par apoptose. La voie intrinsèque met en jeu la mitochondrie qui occupe une place centrale dans les mécanismes de l'apoptose. Une seconde voie, la voie extrinsèque ou voie des récepteurs de mort, est initiée à la surface de la cellule par des récepteurs membranaires. Ces 2 voies de signalisation aboutissent toutes 2 à l'activation des caspases, famille de protéases ayant elles aussi un rôle clé dans l'apoptose. D'autres voies de signalisation s'ajoutent à celles décrites et notamment la voie indépendante des caspases qui met en jeu une protéine mitochondriale appelée AIF (*Apoptosis Inducing Factor*) [145].

Une dérégulation de la mort cellulaire programmée peut-être à l'origine de nombreuses pathologies. Certaines sont liées à une inhibition de l'apoptose (cancer, syndromes lymphoprolifératifs) alors que d'autres sont associées à une stimulation de ce phénomène (SIDA, maladies neurodégénératives, maladies auto-immunes) [146]. L'apoptose peut être modifiée par des protéines oncogènes pro- ou anti-apoptotiques mutées telles p53 et bcl-2.

Au cours de l'apoptose, les cellules mettent en place un "**mécanisme de suicide**" qui se traduit par de nombreux changements morphologiques : la membrane plasmique se désorganise et exprime des signaux pro-phagocytaires, formation de corps apoptotiques, la chromatine se condense avant d'être dégradée en un profil caractéristique dit en "barreaux d'échelle". Les corps apoptotiques formés sont ensuite rapidement éliminés par les cellules adjacentes. Cette élimination est primordiale car elle permet de ne laisser aucune trace dans le tissu où survient l'apoptose, en particulier, elle prévient toute nécrose secondaire qui aurait pour conséquence la libération aléatoire du contenu cellulaire. L'apoptose permettrait ainsi de limiter la réaction inflammatoire.

3.2.1 Déroulement général de l'apoptose.

L'apoptose est un phénomène moléculaire consommateur d'énergie qui est déclenché par certains stimuli (Fig. 22). Il se déroule selon 4 phases qui peuvent se chevaucher dans le temps.

1. déclenchement de l'apoptose par certains signaux (interactions ligand-récepteur, agents physico-chimiques)

2. contrôle et intégration du signal : il s'agit de protéines spécifiques établissant une connexion entre les signaux de mort cellulaire et le programme d'exécution qui comporte 2 grandes voies : la voie membranaire et la voie mitochondriale.

3. la phase d'exécution : cette phase est sous la dépendance de la famille des caspases qui comprend de nombreux membres. Ces caspases vont, au terme d'une cascade enzymatique, dégrader les protéines du cytosquelette et de la matrice nucléaire.

4. élimination des cellules mortes par des modifications de molécules de la membrane plasmique permettant la reconnaissance précoce des cellules altérées par des macrophages et les cellules adjacentes.

Les membres des familles de protéines bcl-2 et p53 jouent un rôle clé dans la régulation des voies de signalisation de l'apoptose.

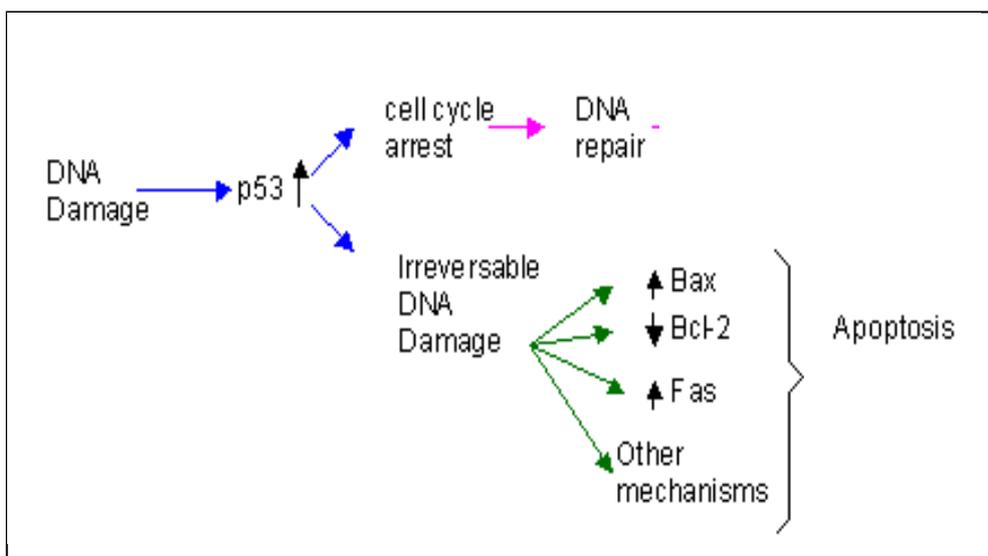


Figure 22 : schéma simplifié des voies de l'apoptose.

3.2.2. Famille Bcl-2.

La translocation t(14;18) retrouvée dans les lymphomes folliculaires de type B a conduit à l'identification de Bcl-2 chez l'homme [147]. Le gène Bcl-2 se trouve sur le bras long du chromosome 18. Les homologies de séquence et de fonctions entre Ced-9 (gène anti-apoptotique de nématodes) et Bcl-2 semblent indiquer que les protéines de la famille Bcl-2 jouent un rôle majeur dans la régulation des caspases (la protéine bcl-2 bloque la sortie du cytochrome C de la mitochondrie qui est nécessaire à l'activation de la caspase 9) et plus généralement de l'apoptose. La surexpression de bcl-2 permet de bloquer l'apoptose induite par de nombreux stimuli (dommages de l'ADN, irradiations, expression d'oncogènes, glucocorticoïdes).

Si l'on se réfère à leur fonctions biologiques, on peut classer les membres de la famille Bcl-2 en deux sous-familles, des membres **anti-apoptotiques** tel que Bcl-2, mais aussi Bcl-XL, Bcl-w, Mcl-1, A1 /Bfl1 et Boo et des membres **pro-apoptotiques** comme Bax, Bak, Bcl-XS, Bad, Bik, Bid, Bim.

La protéine bcl-2 est présente au niveau de la membrane mitochondriale, du réticulum endoplasmique et de la membrane nucléaire. Pour des raisons structurales, il semble que des homodimères bcl-2 ne pourraient pas se former et que bcl-2 jouerait son rôle anti-apoptotique sous forme monomérique. Sa fonction est régulée par d'autres membres de la famille (bcl-x, bax) qui vont se lier de façon sélective à bcl-2 en formant des hétérodimères qui vont promouvoir (bcl-2/bax) ou inhiber l'apoptose (bcl-2/bcl-x). Les homodimères bax/bax vont quant eux induire l'apoptose. Le ratio des hétérodimères de bcl-2 et des homodimères bax/bax pourrait jouer un rôle de rhéostat intracellulaire de contrôle de l'apoptose. La protéine p53 interfère dans ce cycle : c'est un activateur transcriptionnel de Bax et un transrégulateur négatif de Bcl-2 [148].

3.2.3. Famille p53.

L'altération des fonctions p53 dans différents cancers a permis de constater son rôle aussi bien dans le contrôle de la croissance cellulaire, dans l'apoptose, dans le contrôle de l'intégrité du génome que dans la réparation de l'ADN [149]. Plusieurs stimuli (lésions sur l'ADN, hypoxie, activation d'oncogènes, déplétion en facteurs de

croissance, chocs thermiques) entraînent son activation en augmentant le taux de transcription du messenger ou en augmentant sa durée de demi-vie [150]. En réponse à ces stimuli, p53 peut induire un arrêt de cycle cellulaire afin de permettre la réparation de l'ADN avant la division cellulaire ou l'initiation de l'apoptose. En effet, la protéine p53 peut conduire à un arrêt du cycle cellulaire en activant la CKIp21, la cycline D, Gadd45, le cofacteur 14-3-3. Elle peut également réguler des gènes comme Bax, Bcl-x, TGF α , Fas, FasL, Dr5 impliqués dans l'apoptose ou le gène Gadd145 impliqué dans la réparation de l'ADN. Enfin, elle peut moduler sa propre activité en induisant le gène MDM2 (« murine double minute 2 ») [151]. La protéine p53 peut réguler cette grande variété de gènes en s'associant de façon sélective à différents facteurs de transcription (Fig. 23).

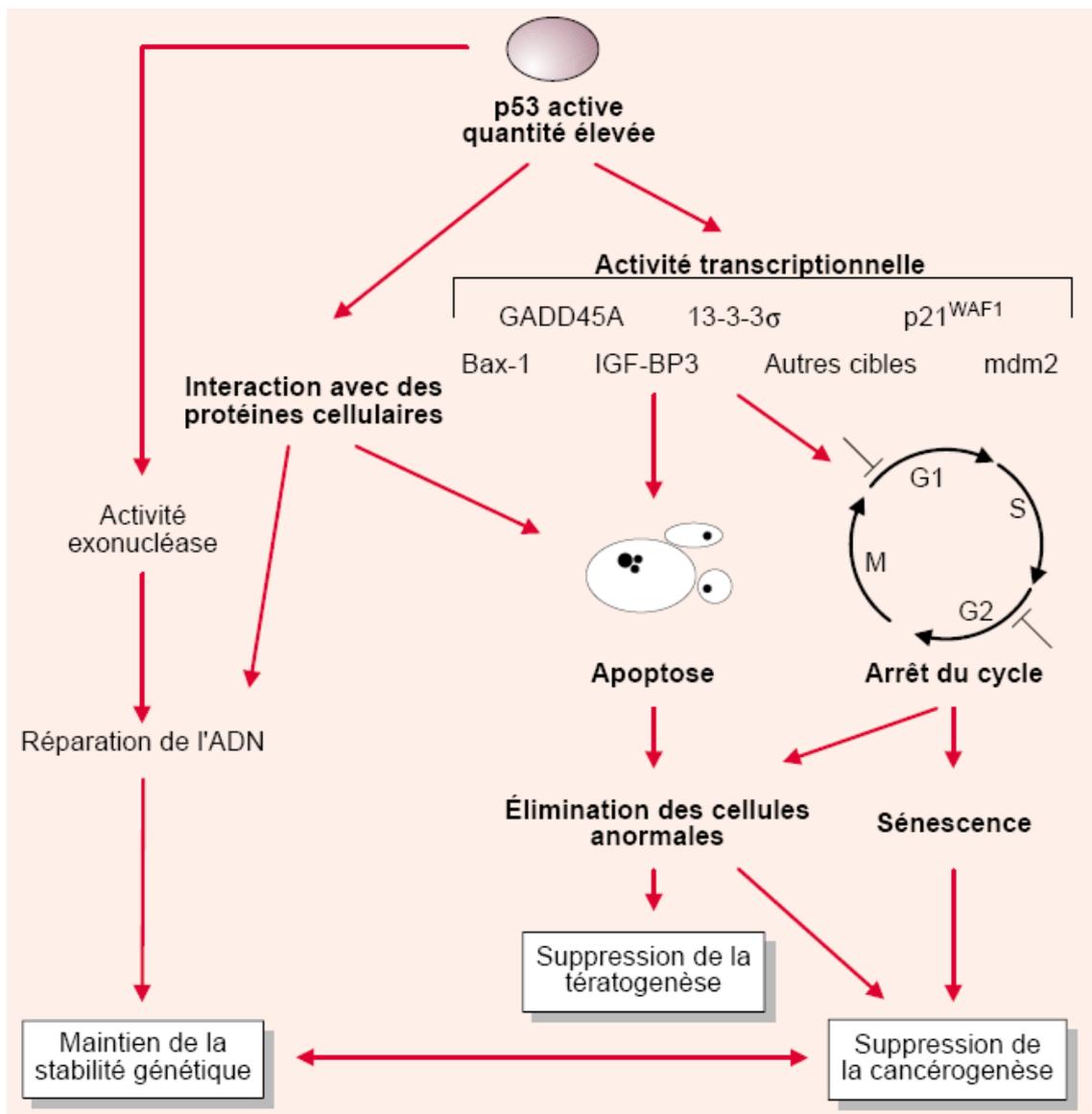


Figure 23 : hétérogénéité des voies de signalisation utilisées par la protéine p53 pour jouer son rôle de gardien du génome (d'après Soussi) [152, 153].

3.2.3.1. La protéine p53.

La protéine p53 est une phosphoprotéine nucléaire de 393 acides aminés d'une masse moléculaire de 53 kDa et qui induit la transcription de certains gènes lorsqu'elle est sous forme de tétramère. Elle est constituée de trois domaines principaux : un domaine de transactivation en amino-terminal, un domaine de liaison à l'ADN et un domaine responsable de son oligomérisation en carboxy-terminal (Fig. 24) [154]. Deux dimères interagissent grâce à leurs hélices α pour former le tétramère qui peut ainsi se fixer sur des séquences précises de l'ADN pour exercer son activité transcriptionnelle. Les séquences sur lesquelles se fixe p53 contiennent 2 copies du motif 5'-Pu-Pu-Pu-C-(A/T)-(T/A)-G-Py-Py-Py-3' (Pu = base purique, Py = base pyrimidique) et il existe environ 200 à 300 éléments de réponse à p53 dans le génome [155].

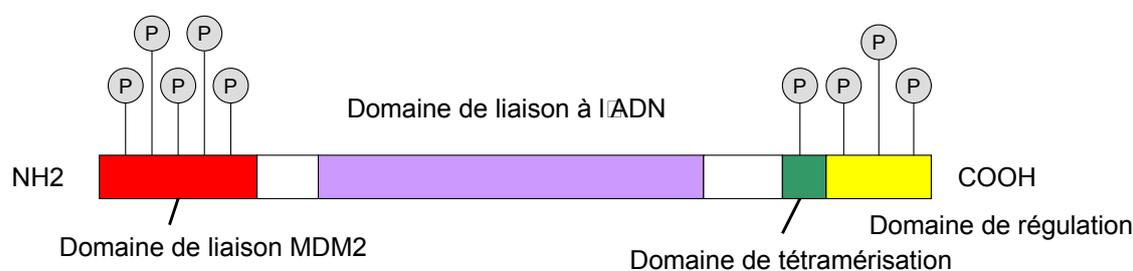


Figure 24 : structure schématique de la protéine p53 (d'après Pietenpol et Stewart) [154].

3.2.3.2. Rôle de p53 dans l'arrêt du cycle cellulaire.

p53 peut induire un arrêt dans la progression du cycle cellulaire, soit en G1, soit en G2/M (Fig. 25). L'arrêt du cycle en G1 empêche l'ADN endommagé d'être répliqué et l'arrêt en G2 permet la suspension du cycle avant la ségrégation des chromosomes [156]. L'activation de la transition G1/S est caractérisée par l'accumulation et l'activation de la protéine p53 dans le noyau. Le rôle de p53 dans la prolifération se fait principalement au niveau de la phase G1 du cycle cellulaire par l'induction de l'expression de p21 qui inhibe l'expression des complexes cyclineD/CDK ou cycline E/cdk2 impliqués dans l'initiation de la phase S. Dans ces conditions, pRb (protéine du rétinoblastome, produit du gène *rb1* suppresseur de tumeurs) ne peut être phosphorylée ce qui empêche la cellule de progresser en phase S. D'autres études montrent également le rôle de p53 dans l'arrêt du cycle cellulaire au niveau du point de transition G2/M. Il

s'agit le plus souvent d'une inhibition au niveau de l'entrée en mitose lors d'anomalies de la synthèse d'ADN ou dans la répartition des chromosomes [157]. La protéine p53 est aussi impliquée dans le blocage des cellules en phase S de réplication lorsque le fuseau mitotique est altéré et cette protéine régule également la duplication du centrosome.

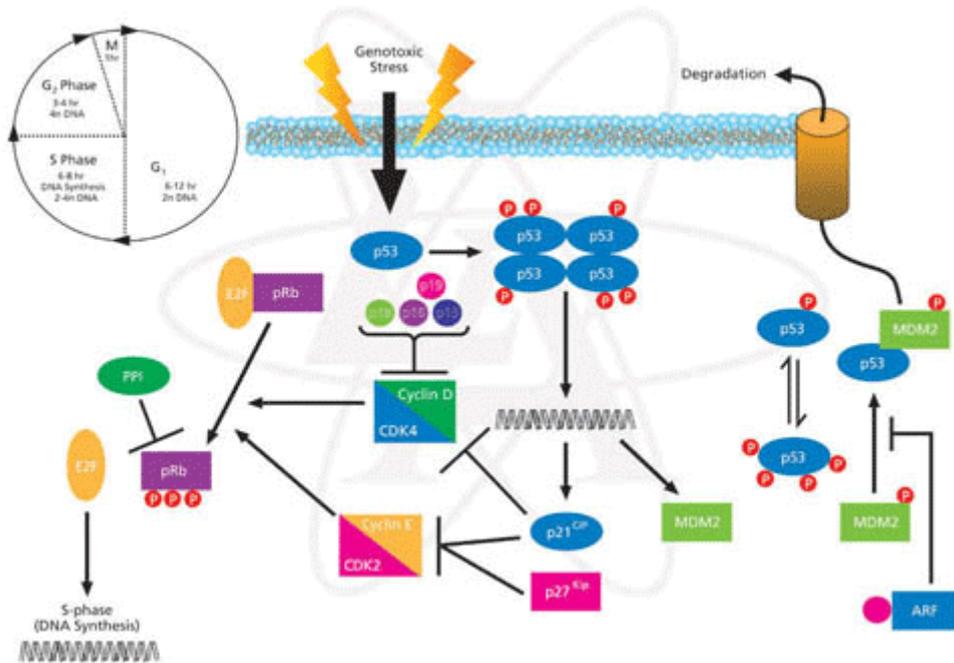


Figure 25 : p53 et régulation du cycle cellulaire (d'après Sigma-Aldrich, consulté à partir de http://www.sigmaaldrich.com/Area_of_interest/Life_Science/Cell_Signaling/Scientific_Resources/Pathway_Slides_Charts.html).

Le cycle cellulaire est régulé par la famille des cyclines. Plusieurs protéines peuvent inhiber le cycle cellulaire en phase G1. En cas de lésion de l'ADN, p53 s'accumule dans la cellule et induit l'inhibition du complexe cyclin D/cdk par l'intermédiaire de p21. Mdm2, en facilitant l'inhibition de p53, peut ainsi agir dans cette boucle de régulation qui stoppe le cycle cellulaire. De la même façon, l'activation des récepteurs TGF- β induit l'inhibition du complexe cyclin D/cdk par l'intermédiaire de p15, alors que l'AMP-cyclique inhibe ce même complexe par l'intermédiaire de p27. Si le complexe cyclin D/cdk est inhibé, la protéine pRb est faiblement phosphorylée et est étroitement liée au facteur de transcription E2F, inhibant son activité. La transition vers la phase S est déclenchée par l'activation du complexe cyclin D/cdk qui phosphoryle Rb se dissociant de E2F qui devient disponible pour initier la réplication de l'ADN.

3.2.3.3. Rôle de p53 dans l'apoptose.

L'apoptose médiée par p53 est induite par des lésions sur l'ADN, l'hypoxie ou le déficit de facteurs de croissance. La protéine p53 peut inhiber la transcription de gènes anti-apoptotiques comme Bcl-2 ou induire des gènes pro-apoptotiques comme

Bax, Fas ou Dr-5 (Fig. 26) [158-160]. D'autres gènes pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 ont une expression activée par p53 : Puma et Noxa [161, 162]. Cependant, dans la plupart des cas, son implication dans l'apoptose semble être indépendante de son activité transcriptionnelle. Cette activité est le plus souvent permise par son interaction avec d'autres protéines agissant au niveau de la réparation de l'ADN, l'apoptose médiée par p53 étant également induite lorsque la transcription des gènes ou leur traduction sont inhibées [163]. La protéine p53 peut également induire l'apoptose en augmentant la production de radicaux libres au niveau de la mitochondrie, et elle peut induire la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe en formant un complexe avec les protéines anti-apoptotiques bcl-2 et bcl-xl.

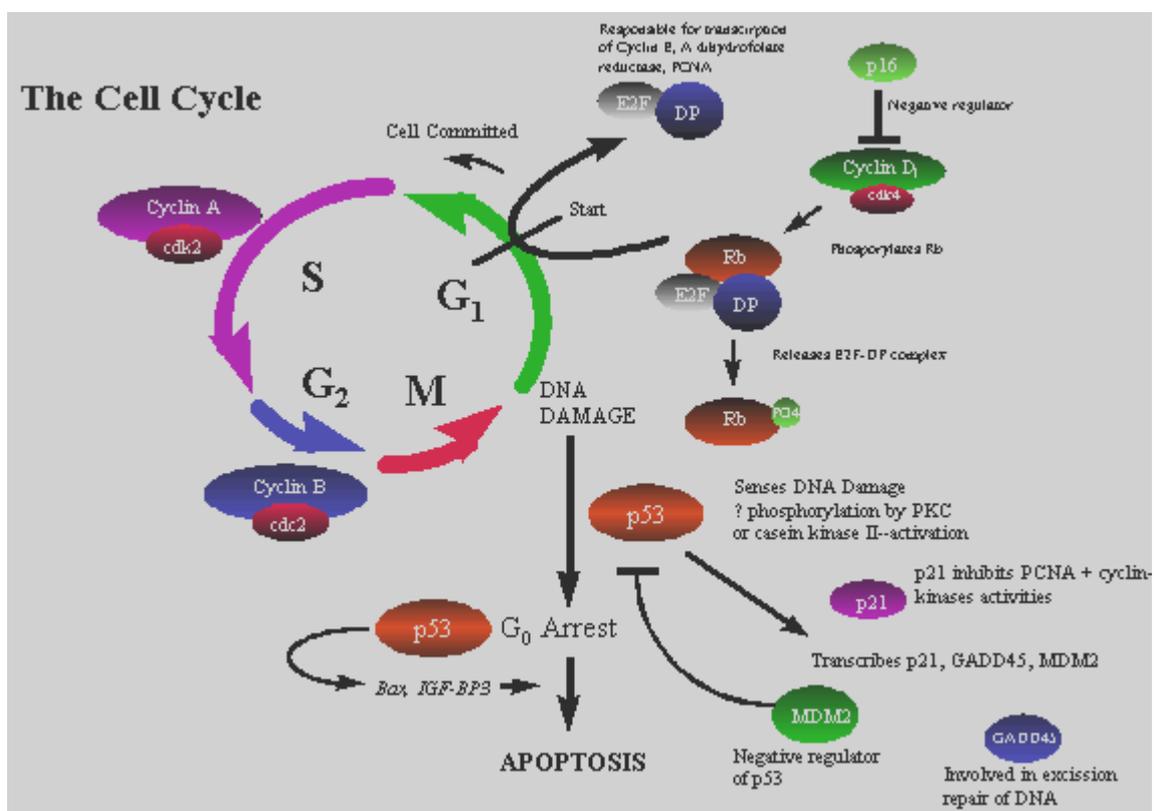


Figure 26 : rôle de p53 dans le cycle cellulaire et l'apoptose (d'après Pietenpol) [154].

3.2.3.4. Régulation de p53.

Le niveau d'expression des gènes dépend de la quantité de p53 dans la cellule et du type de stress conduisant à l'induction de p53 [151]. En effet, selon le type de lésions sur l'ADN, différentes kinases sont activées et phosphorylent p53 sur des résidus sérine ou thréonine.

Dans les cellules normales, l'expression de p53 est maintenue à un taux faible par l'interaction avec son régulateur, mdm2. Le gène MDM2 est induit par p53 et la protéine mdm2 inhibe l'activité transcriptionnelle de p53 en diminuant sa stabilité et en favorisant sa dégradation. Elle favorise le passage de p53 du noyau vers le cytoplasme et facilite également la dégradation de p53 par le protéasome dans le cytoplasme [164]. Mdm2 est également capable de s'auto-ubiquitinyler et peut provoquer sa propre dégradation dans certaines conditions.

3.3. P53, cancers et carcinogénèse.

La mutation somatique du gène TP53 (le gène est situé sur le bras court du chromosome 17, 17p13) est un événement très fréquent dans le développement des néoplasies humaines et parce que les protéines p53 mutantes sont souvent plus stables que la protéine de type sauvage, la protéine p53 mutante s'accumule à un haut niveau. La protéine p53 de type sauvage est présente dans un grand nombre de cellules normales, mais la protéine a une demi-vie très courte rendant difficile sa détection par des méthodes immunocytochimiques classiques [165].

La protéine p53 de type sauvage (wt ou *wild type*) fonctionne comme un facteur de transcription, comme un modulateur capable de « mettre en marche ou d'arrêter » des gènes cruciaux (Fig. 27). Lorsqu'il y a une agression du matériel génétique (irradiations, oncogènes, agents chimiques mutagènes), le taux de p53 augmente rapidement et active la transcription d'autres gènes qui modulent les effets de p53 : arrêt du cycle cellulaire et réparation de l'ADN ou apoptose. L'arrêt du cycle cellulaire se produit à une phase tardive de G1 et est secondaire à la production augmentée de l'inhibiteur CDKp21. Cette pause permet aux cellules de réparer les lésions infligées à l'ADN et p53 participe à ce processus en induisant GADD45 (*Growth Arrest and DNA Damage*) qui est une protéine impliquée dans la réparation de l'ADN.

Les mutations de TP53 inactivent sa fonction ; diverses observations ont permis de montrer qu'il s'agissait de mutations acquises : mutations présentes dans le tissu tumoral mais non dans le tissu sain d'un même patient ; analyse de la séquence du gène TP53 humain révélant très peu de polymorphismes ; les mutations ne sont retrouvées que dans des régions hautement conservées de TP53 (régions fonctionnellement importantes de la protéine) ; analyse des propriétés des p53 mutantes impliquées dans des cancers humains montrant souvent une perte de la fonction biologique [153]. Dans

les expériences de transfection, la p53 de type sauvage se comporte comme un suppresseur de tumeur, alors que la p53 mutante se comporte comme un oncogène transformateur dominant [166, 167].

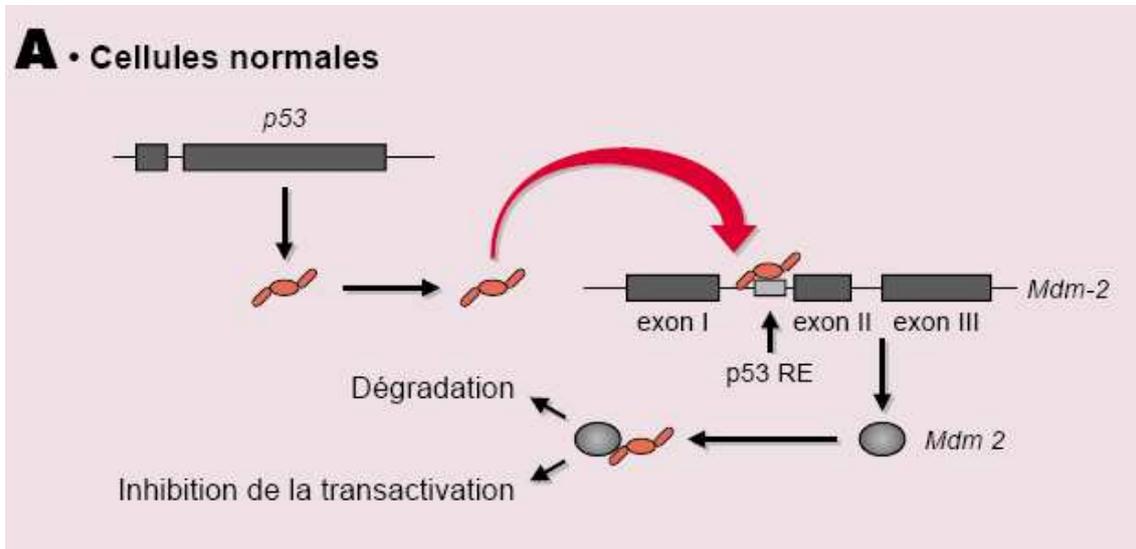
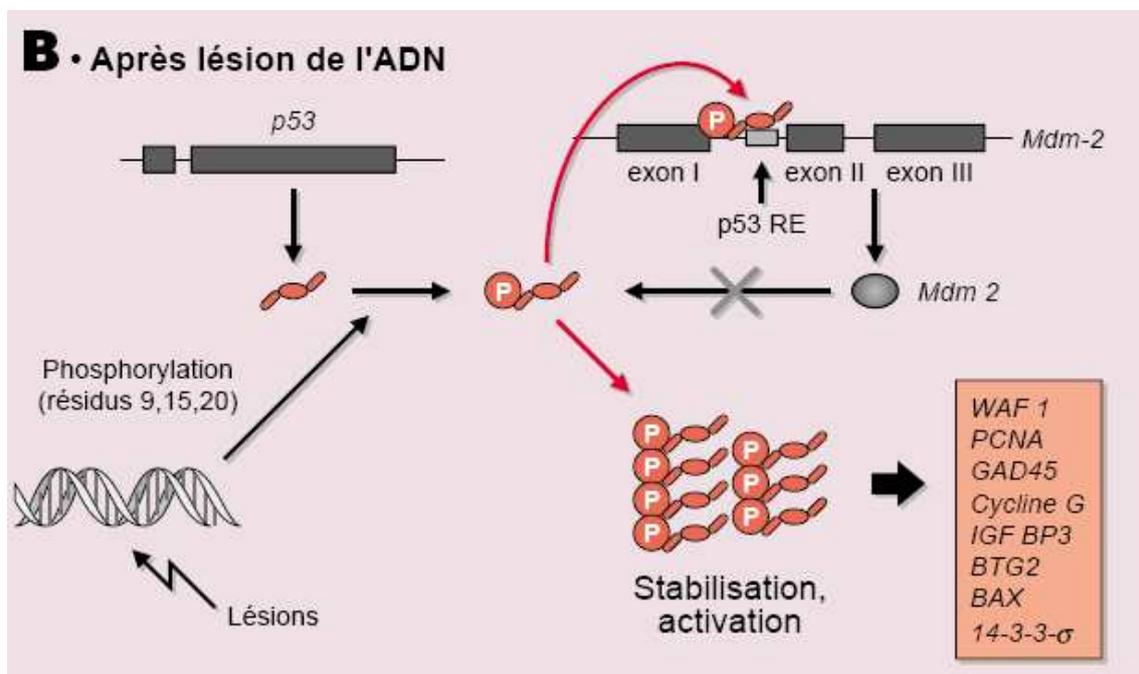
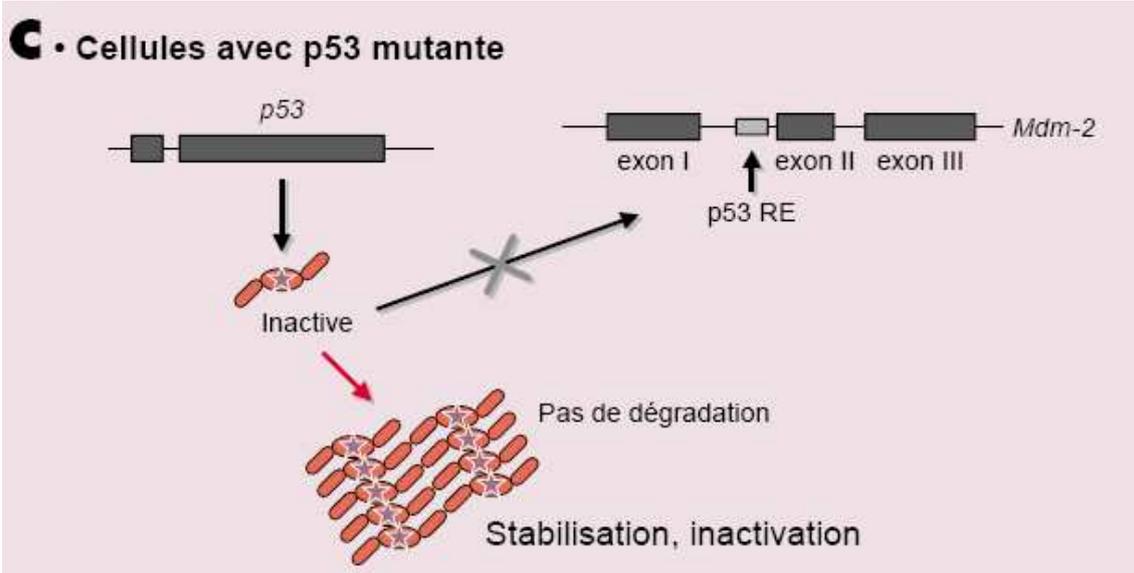


Figure 27 : interactions de p53 et Mdm2 (d'après Soussi) [152].

Dans des cellules normales, non stressées, une très faible quantité de p53 est suffisante pour transactiver le gène Mdm2. En se fixant sur la p53, la protéine Mdm2 induit son inactivation en masquant le domaine de transactivation et induit également la dégradation de p53.



Lors d'un stress génotoxique, la région amino-terminale de la p53 est phosphorylée. Cette modification conduit à la dissociation du complexe p53/Mdm2 et donc à l'accumulation d'une p53 stable qui va pouvoir transactiver les gènes cibles contrôlant les points de contrôle du cycle cellulaire.



Dans des cellules tumorales, la p53 est totalement inactive et ne serait plus capable d'induire la synthèse de protéine Mdm2 pour assurer sa dégradation. Il y a donc une accumulation de p53 nucléaire inactive. p53RE : séquence d'ADN reconnue par la p53 sauvage.

Le processus qui conduit à la sélection d'une mutation dans un clone tumoral suit schématiquement les 4 étapes suivantes : 1) introduction de lésions au niveau de l'ADN, 2) réparation de ces lésions, 3) erreur de réplication d'une lésion non réparée, 4) sélection d'un mutant associé à un phénotype dominant. Pour qu'une cellule normale puisse passer à l'état de cancer, il faut que plusieurs voies de signalisation soient altérées : insensibilité aux signaux d'inhibition de la croissance cellulaire, autosuffisance en signaux de croissance, échappement à la mort cellulaire programmée (apoptose), acquisition d'un potentiel illimité de croissance (immortalisation), capacité à susciter la néoangiogenèse et au caractère invasif ainsi qu'à la production de métastases [168].

Le gène TP53 est transcrit dans tous les types cellulaires et tissus, mais les niveaux d'expression de son ARNm varient d'un tissu à un autre selon son niveau d'activité. La protéine p53 forme des complexes avec des sites de liaison à l'ADN entraînant une activité transcriptionnelle positive ou négative, activant ou inhibant la transcription de différents gènes dont certains d'entre eux sont tissus-spécifiques. Les altérations génétiques de TP53 inactivent principalement la fonction de fixation de p53 à l'ADN et perturbent ainsi cette activité transcriptionnelle ; ces altérations conduisent également à modifier les rapports de p53 mutée avec les autres protéines intracellulaires.

3.4. Détection de p53 par IHC, FISH et autres techniques de biologie moléculaire.

L'accumulation de la protéine p53 mutée, dont la durée de demi-vie est beaucoup plus importante que la wt p53 du fait de son absence de dégradation par mdm-2 (rupture de la boucle de feedback négatif), peut ainsi être mise en évidence par immunohistochimie (IHC) alors que la forme sauvage n'est pas détectable par des techniques classiques d'IHC.

Selon le modèle de Knudson (1971, théorie de l'inactivation bi-allélique), il est nécessaire que les 2 allèles d'un gène suppresseur de tumeur soient altérés pour que la fonction de régulation négative de la prolifération cellulaire soit perdue. Dans la plupart des cas, ce modèle est confirmé par les observations expérimentales, les tumeurs ne contenant plus qu'un allèle muté, le second allèle ayant été perdu lors d'un remaniement génétique qui a conduit à la délétion d'une partie plus ou moins importante du chromosome (perte d'hétérozygotie ou LOH). Pour la plupart des gènes suppresseurs de tumeurs, les altérations inactivant l'allèle restant sont des microlésions (délétions ou insertions) décalant le cadre de lecture ayant un effet qualitatif sur l'expression de la protéine qui est tronquée, instable ou absente [169]. Dans le cas du gène TP53, la situation est différente dans la mesure où plus de 90% des mutations de TP53 sont des mutations faux-sens.

Les activités fonctionnelles des protéines p53 mutées ont été classées en 5 catégories : maintien de l'activité p53 sauvage (conservation d'une activité de transactivation résiduelle), perte de fonction, gain de fonction, effet dominant négatif, thermosensibilité [170].

La surexpression de p53 observée en IHC est un marqueur des mutations faux-sens du gène mais cette surexpression ne correspond pas nécessairement à une mutation [171]. L'IHC est une technique simple qui peut cependant être affectée par de nombreux facteurs : type d'anticorps et technique de révélation antigénique utilisés, critères retenus pour déterminer la surexpression. Une mutation dominante négative de TP53, qui correspond à la capacité d'une protéine p53 mutante de former un complexe avec une protéine p53 sauvage produite par l'allèle non muté et de mener à l'inactivation totale de sa fonction, va conduire à une réduction de production de mdm-2 quelque soit le statut du second allèle. Les mutations de TP53 abolissant la production de la protéine

p53 aboutiront à la perte de la protéine lorsqu'elles seront associées à la perte d'hétérozygotie du second allèle (LOH). Dans le travail de Sakuragi sur l'analyse fonctionnelle des mutations TP53, 68% des mutations faux-sens de TP53 exerçaient une activité dominante négative corrélée à un pronostic plus défavorable [171]. Ainsi, la surexpression de p53 en IHC peut être liée à une mutation dominante négative mais aussi à une mutation faux-sens récessive avec LOH. En plus de la perte de fonction liée à une mutation dominante négative de p53 supprimant la wt p53, les mutations de TP53 peuvent conduire à des gains de fonction qui participent au phénotype transformé en accroissant le phénomène oncogénique [152].

Corrélation entre p53 détectée par IHC et mutations TP53.

La majorité des mutations de TP53 (évaluées par SSCP, DHPLC (*Denaturing High Performance Liquid Chromatography*) ou séquençage direct) conduisent à une stabilisation de la protéine la rendant détectable en immunohistochimie. Néanmoins, dans certaines tumeurs, l'analyse IHC de p53 n'est pas informative du fait d'un nombre significatif de faux positifs et de faux négatifs [172]. En effet, la protéine sauvage p53 est stabilisée par des stimuli physiologiques (hypoxie, lésions de l'ADN ...) en l'absence de mutations [173]. D'un autre côté, la détection de p53 en IHC est négative dans les tumeurs où TP53 est inactivé par la perte des 2 allèles ou par des mutations nulles, et toutes les mutations ne stabilisent pas la protéine [174]. Par ailleurs, les mutations de TP53 ne conduisent pas nécessairement à la perte de son activité transcriptionnelle, ce qui peut être exploré par une technique de type FASAY (*functional analysis of separated alleles of p53 on yeast*) [172]. La combinaison d'un marquage immunohistochimique p53 et mdm-2 permettrait d'évaluer l'activité fonctionnelle de p53 dans les tissus tumoraux en distinguant les mutations qui stabilisent la protéine (marquage positif de p53 et négatif de mdm-2) des situations où la protéine p53 sauvage est stabilisée (marquage positif de p53 et de mdm-2).

P53 évalué par IHC et perte d'hétérozygotie (LOH).

La découverte de p53 mutées ne montrant pas ou peu d'interférence avec la p53 sauvage souligne l'importance de déterminer si les cancers avec mutations de TP53 portent toujours l'allèle sauvage ou l'ont perdu (LOH) [175]. La persistance de l'allèle sauvage pourrait permettre la conservation de la fonctionnalité au moins partielle de la

voie p53, alors que la perte d'hétérozygotie pourrait altérer de façon importante le pronostic des cancers LOH+. La base de données TP53 de l'IARC (*International Agency Research on Cancer database*) contient des informations sur la perte d'hétérozygotie pour moins de 1% des mutations de TP53 connues. Dans le syndrome de Li-Fraumeni caractérisé par une mutation germinale de TP53, la perte d'hétérozygotie est retrouvée dans près de la moitié des cas [176]. La conduite de telles études sur la perte d'hétérozygotie de TP53 nécessite de surmonter un certain nombre de problèmes tels que l'hétérogénéité tumorale, la contamination des prélèvements par des cellules normales, et l'utilisation de témoins négatifs contrôles. Ce type d'analyse doit également tenir compte du fait que des délétions 17p peuvent conduire à la perte d'autres gènes suppresseurs de tumeurs [177].

C'est par la capacité de TP53 à réguler la transcription de nombreux gènes en réponse à différentes agressions cellulaires que ce gène fonctionne comme un suppresseur de tumeur (Fig. 28). Les nombreux travaux menés sur les gènes cibles de p53 ont montré à quel point les mécanismes de régulation par p53 étaient complexes et très étroitement interdépendants. Les rapports de p53 avec la machine transcriptionnelle ne sont pas encore totalement élucidés et le rôle précis des isoformes p63 et p73 doit encore être investigué [178].

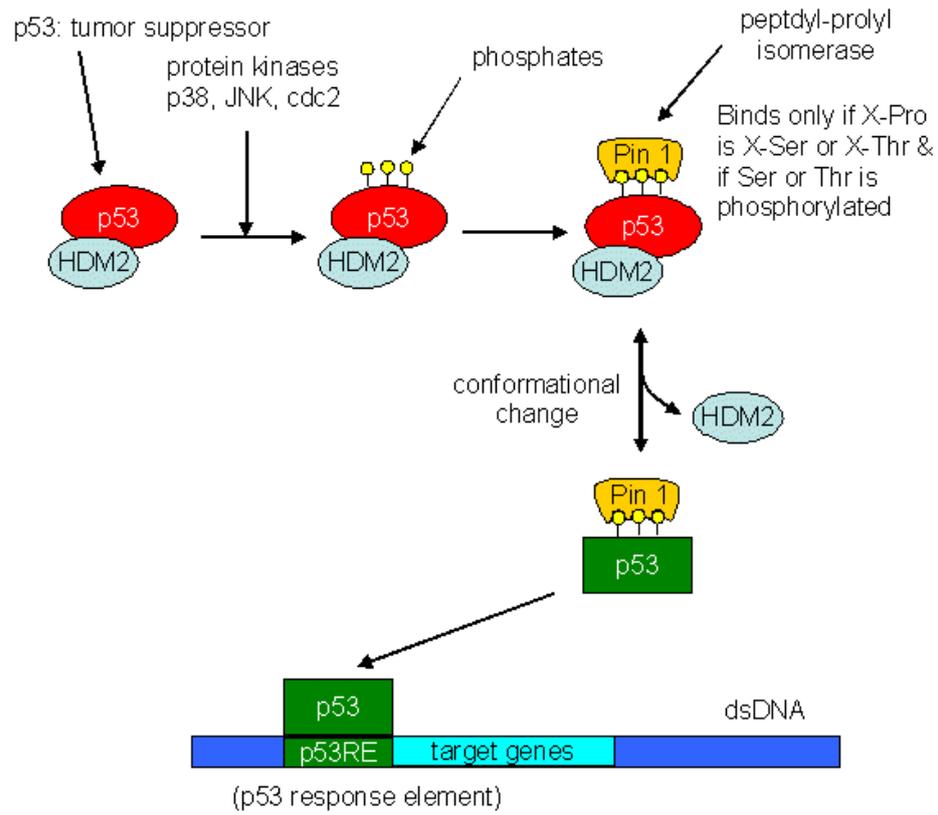


Figure 28 : p53, facteur de transcription (d'après Vousden) [167].

4. Les altérations génétiques dans les cancers de l'endomètre.

Les tumeurs dérivent d'un processus génétique pathologique somatique, multi-étapes, où des altérations génétiques successives contribuent à la tumorigenèse transformant la cellule normale en cellules cancéreuses.

Le processus de carcinogenèse résulte par ailleurs de deux phases consécutives :

- la phase dite « **pré-invasive** » au cours de laquelle la cellule tumorale perd ses contacts avec les autres cellules de la tumeur impliquant une diminution de l'expression des molécules de liaison intercellulaire.
- la phase « **invasive** » caractérisée par la séparation des cellules cancéreuses de la tumeur et le franchissement de la membrane basale.

Progression, invasion et métastases sont les étapes finales de la carcinogenèse dans lesquelles 5 processus au moins sont impliqués : prolifération, protéolyse, adhésion, migration et angiogénèse. La dégradation de la matrice extra-cellulaire est la première étape vers l'extension métastatique.

Les altérations génétiques qui contribuent à la pathogénie du CE et influencent son comportement biologique sont en cours d'exploration. Les types I et II diffèrent sur les plans clinique, histologique et génétique (tableau 5) [179].

Quatre anomalies génétiques différentes peuvent survenir dans les cancers endométrioïde (type I) de l'endomètre (instabilité des microsatellites par mutations des gènes MLH1, MSH2, MSH6, mutations des gènes PTEN, k-RAS et β -caténine) alors que les cancers non-endométrioïdes de l'endomètre (type II) montrent fréquemment des mutations de TP53 ou des pertes d'hétérozygotie (LOH) sur différents chromosomes ainsi qu'une amplification d'HER2-neu qui est associée à l'absence de récepteurs aux œstrogènes et pourrait être liée à l'évolution métastatique de la maladie (Fig. 29) [179-181]. La mutation du gène TP53 pourrait quant à elle représenter l'un des facteurs prédictifs de survie le plus important [182].

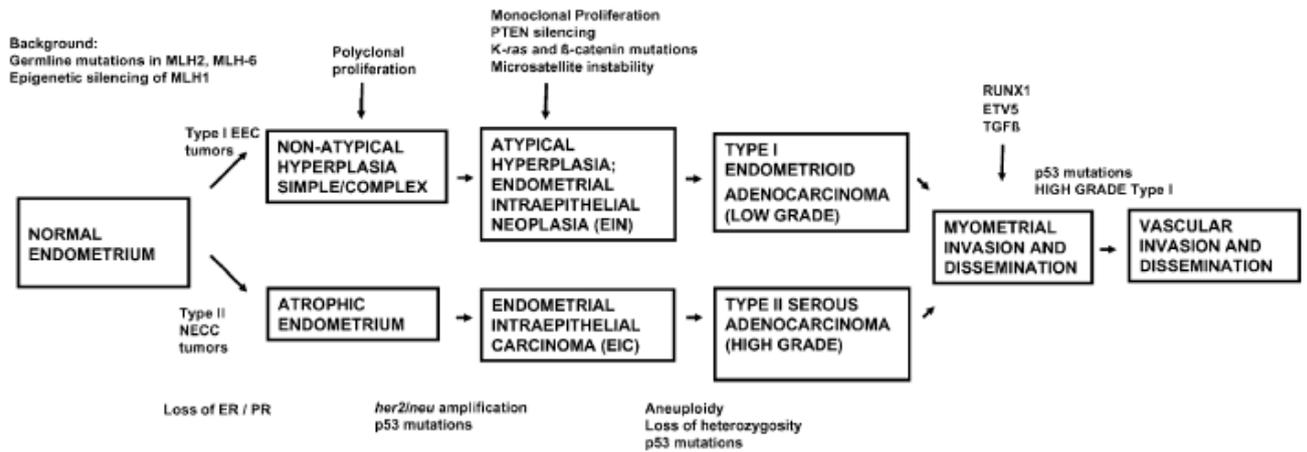


Figure 29 : modèle de carcinogenèse endométriale proposé par Doll [34].

Il y a de forts arguments épidémiologiques et moléculaires pour considérer les lésions d'hyperplasie épithéliale atypique comme de vraies lésions précurseurs des adénocarcinomes endométrioides du fait d'un continuum observé à la fois sur le plan histologique et sur le plan génétique alors que les adénocarcinomes non endométrioides sont fréquemment associées aux lésions de carcinome endométrial intraépithélial (EIC) décrites par Sherman en 1992 et se développant sur un endomètre atrophique [24]. Néanmoins, cette dichotomie ne saurait être envisagée de façon trop rigide car des adénocarcinomes non endométrioides semblent également pouvoir se développer sur des endomètres non atrophiques et être précédées de lésions décrites comme dysplasie glandulaire endométriale ou EmGD (*endometrial glandular dysplasia*) [183]. Il y a très peu de données moléculaires concernant les EIC qui semblent cependant surexprimer p53 [24].

4.1. Aspects de génétique moléculaire associés aux carcinomes endométrioides de l'endomètre.

4.1.1. PTEN.

L'anomalie génétique la plus fréquemment retrouvée dans les carcinomes de l'endomètre concerne PTEN dont le gène est situé sur le chromosome 10 et qui code pour une protéine à 403 acides aminés ayant une fonction tyrosine kinase et une activité phosphatasique lipidique et protéique [28]. Cette protéine est impliquée dans l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1/S par l'intermédiaire de l'inhibiteur de la cycline dépendante kinase p27. De plus, elle intervient sur le mécanisme de l'apoptose en

induisant la surexpression de facteurs anti-apoptotiques incluant certaines caspases et bid et en réduisant l'expression de facteurs pro-apoptotiques tels que bcl-2. L'activité phosphatasique de cette protéine est aussi impliquée dans les processus d'adhésion cellulaire et dans l'inhibition des voies de signalisation des facteurs de croissance MAPK dépendantes. Ainsi, la perte de l'activité PTEN aboutit à une croissance et une migration cellulaires anormales et à l'échappement aux mécanismes de l'apoptose [184]. Plus de 80% des adénocarcinomes endométrioïdes et plus de 55% des lésions précancéreuses de l'endomètre révèlent une perte d'expression de PTEN suggérant la précocité de survenue de cette anomalie dans le processus de carcinogenèse, cette perte d'expression étant par ailleurs le plus souvent liée à une mutation et plus rarement à une perte d'hétérozygotie (LOH) [28]. La méthylation du promoteur a été retrouvée dans 20% des tumeurs ayant une anomalie de PTEN, souvent associée à une instabilité des microsatellites et à un stade évolué [185], alors que l'inactivation de PTEN liée à une mutation est associée à un stade précoce et un pronostic plus favorable [186]. Il a été également montré que l'inactivation de PTEN augmentait la demi-vie de p53 [187].

4.1.2. Instabilité des microsatellites.

L'accumulation progressive d'altérations au niveau des microsatellites appelée instabilité des microsatellites (MSI ou *microsatellite instability*) au niveau de gènes régulateurs a un rôle promoteur au niveau de la carcinogenèse. MSI est retrouvée dans 17 à 25% des formes sporadiques de CE de type I et très rarement dans les CE de type II et surviendrait précocement dans le processus pathologique [188, 189]. Les anomalies des gènes impliqués dans la réparation de l'ADN (gènes MMR, *mismatch repair*) ont été détectés initialement chez les patients présentant des cancers colorectaux de type HNPCC (*hereditary non polyposis colorectal cancer* ou syndrome de Lynch) et pour lesquels le risque de cancer de l'endomètre est élevé. Les gènes essentiellement concernés sont les gènes hMLH-1, hMSH-2 et hMSH-6 qui codent pour des enzymes responsables de la réparation des anomalies survenant au cours de la réplication de l'ADN. Dans le cancer de l'endomètre, il s'agit le plus souvent d'anomalies conduisant à l'inactivation épigénétique ou à l'extinction de ces gènes et non pas de mutations, comme par exemple l'hyperméthylation des îlots CpG du promoteur de ces gènes [190]. Les cancers de l'endomètre avec MSI auraient un meilleur pronostic que ceux ayant un phénotype MSS (stable) [191].

4.1.3. K-ras.

Le proto-oncogène K-ras code pour une GTPase membranaire fonctionnant comme un interrupteur moléculaire durant la signalisation cellulaire et est impliqué dans la croissance et la différenciation tumorales. Les mutations de K-ras ont été mises en évidence dans 19 à 46% des cancers endométrioïdes de l'endomètre et concernent essentiellement l'exon 1 (codons 12 et 13) et plus rarement l'exon 2 (codon 61) [192]. La présence de mutations de K-ras dans 16% des hyperplasies endométriales suggère là aussi qu'il s'agit d'un évènement survenant précocement dans la carcinogenèse endométriale [193]. Les mutations de K-ras sont retrouvées plus fréquemment dans les tumeurs de phénotype MSI et ont une distribution topographique homogène, suggérant que ces 2 évènements surviennent simultanément avant l'expansion clonale alors que les mutations de PTEN ne coexistent pas avec celles de K-ras au sein d'une même tumeur [194, 195].

4.1.4. β -caténine.

Les caténines sont des protéines cytoplasmiques qui ont été classées selon leur mobilité électrophorétique. Le gène de la β -caténine (CTNNB1) est situé sur le chromosome 3 (3p21) et code pour une protéine de 88 kDa qui joue un rôle essentiel dans l'organisation du cytosquelette et l'adhésion inter-cellulaire médiée par l'E-cadhérine et agit sur la voie de signalisation Wnt. La concentration intracellulaire de β -caténine est très étroitement régulée par un complexe multiprotéique (associant la sérine/thréonine kinase GSK3 β (glycogène synthétase kinase), la protéine APC (*adenomatous polyposis coli*) et l'axine) qui facilite sa phosphorylation et sa dégradation [196]. Les mutations de la β -caténine sont présentes dans 30 à 40% des cancers endométrioïdes de l'endomètre et conduisent à l'accumulation de β -caténine dans le cytoplasme et à sa translocation dans le noyau de la cellule où elle active directement ou indirectement ses gènes cibles (c-myc, cycline D, MMP-7 ...), alors qu'on retrouve ces mutations de façon exceptionnelle dans les cancers non endométrioïdes [197-199]. L'accumulation nucléaire de β -caténine a été démontrée dans les hyperplasies atypiques, lésions précurseurs des adénocarcinomes de type I [200].

4.2. Altérations génétiques dans les carcinomes non endométrioïdes de l'endomètre.

L'altération génétique la plus fréquente dans les carcinomes séreux papillaires de l'endomètre est la mutation du gène TP53 situé sur le chromosome 17 (17p13.1) [201, 202]. Contrairement aux carcinomes endométrioïdes, le phénotype MSI et les mutations de K-ras et PTEN sont rares [181, 203]. La surexpression d'HER2-neu (c-erbB2) est la seconde anomalie la plus fréquemment rencontrée dans les cancers séreux papillaires. Le profil moléculaire des carcinomes à cellules claires de l'endomètre est plus mal connu du fait de sa fréquence faible.

4.2.1. TP53.

Le gène suppresseur de tumeur TP53 code pour une phosphoprotéine nucléaire dont la fonction est altérée dans plus de 50% des cancers humains et il s'agit de l'altération génétique la plus fréquemment observée, tous types de tumeurs confondus [153]. Ces anomalies sont surtout des mutations ponctuelles (faux-sens) introduisant des codons stop, qui intéressent les exons 5-8 correspondant à des domaines hautement conservés (régions fonctionnellement importantes de la protéine). Plus de 19000 mutations somatiques différentes ont été décrites dans les cancers humains [IARC TP53 database]. La mutation de TP53 conduit à la synthèse d'une protéine non fonctionnelle qui va s'accumuler agissant comme un inhibiteur dominant négatif de la protéine p53 sauvage (wt p53). Dans des cellules exprimant une p53 mutée, il n'y a ni arrêt cellulaire, ni apoptose. L'accumulation de la protéine p53 mutée, dont la durée de demi-vie est beaucoup plus importante que la wt p53 du fait de son absence de dégradation par mdm-2 au niveau du protéasome, peut ainsi être mise en évidence par immunohistochimie (IHC) alors que la forme sauvage n'est pas détectable par des techniques classiques d'IHC.

71 à 85% des tumeurs séreuses papillaires et 75% des carcinomes intraépithéliaux (EIC) de l'endomètre surexpriment p53, révélant la précocité des anomalies de ce gène dans le processus de carcinogenèse des formes non endométrioïdes [204, 205]. A l'opposé, une minorité des hyperplasies endométriales et moins d'un tiers des carcinomes endométrioïdes surexpriment p53, et plus souvent dans les formes de haut grade (grade 3) que dans les formes de bas grade (grades 1 et 2) [9, 179, 206]. Les altérations

moléculaires de TP53 surviennent tardivement dans les tumeurs de type I et sont souvent associées dans ce cas à une instabilité des microsatellites.

La surexpression de p53 est associée à un phénotype tumoral plus agressif et à un pronostic plus péjoratif [182].

4.2.2. HER2-neu.

Le gène HER2-neu (aussi appelé c-erbB2) code pour un récepteur transmembranaire tyrosine kinase similaire au récepteur à l'EGF (*epidermal growth factor*). Il agit comme partenaire préférentiel dans l'hétérodimérisation avec les membres de cette même famille de récepteurs à l'EGF et joue un rôle important dans la coordination de la signalisation du complexe ErbB responsable de la croissance et la différenciation cellulaires [207, 208]. La surexpression d'HER2-neu et l'amplification de ce gène ont été retrouvés dans respectivement 45 et 70% des tumeurs séreuses papillaires de l'endomètre [209, 210].

4.2.3. Récepteurs hormonaux.

Les fonctions des organes de la reproduction sont régulées par les hormones stéroïdes sexuelles et par leurs récepteurs. La progression des cellules carcinomateuses endométriales est influencée par les estrogènes et la progestérone qui agissent par l'intermédiaire de récepteurs intranucléaires, RE (récepteurs aux estrogènes) et RP (récepteurs à la progestérone), qui appartiennent à la superfamille des récepteurs nucléaires aux hormones stéroïdes : ils modulent la transcription de gènes cibles lorsqu'ils sont couplés à leur ligand [211]. L'activité transcriptionnelle des RE est médiée par AF1 et AF2 (*Activation Functions*). L'expression des RE et RP est liée car la transcription du gène RP est induite par les estrogènes et inhibée par les progestatifs. Ces récepteurs comportent plusieurs isoformes différents. Pour RE, les 2 isoformes α et β sont codés par des gènes différents (chromosome 6 pour RE α , chromosome 14 pour RE β) [212] alors que pour RP, 1 seul gène code pour les 2 isoformes A (RP-A correspond à une forme courte de RP-B avec un défaut de 164 acides aminés dans la région NH₂-terminale) et B (forme longue) transcrits par 2 promoteurs différents [213]. Ces récepteurs jouent un rôle important et ont des fonctions physiologiques différentes au niveau de l'endomètre. Les 2 isoformes α et β ont des parentés de structure et sont

des composants importants de voies de signalisation qui régulent spécifiquement le développement et la croissance de tissus cibles et de tumeurs. RE α est l'isoforme majoritaire dans l'endomètre mais la balance RE α / β semble importante pour la prolifération et la différenciation de l'endomètre. RE β est un répresseur transdominant de l'activité transcriptionnelle de RE α et a un effet antiprolifératif. Différents variants d'épissage de RE α ont été décrits mais l'on ne sait pas s'ils sont exprimés par des protéines ayant un rôle biologique [214].

La transcription de l'ARNm codant RE α et donc la protéine RE α diminuent avec l'augmentation du grade des tumeurs de l'endomètre alors que l'expression de RE β n'est pas modifiée conduisant à altérer le ratio RE α /RE β [215]. La signification précise de l'expression relative de ces 2 isoformes de RE dans les CE n'est pas connue.

La progestérone agissant par l'intermédiaire des RP est le régulateur physiologique négatif de l'action des estrogènes au niveau de l'endomètre. La progestérone se lie aux deux récepteurs A et B, mais les 2 récepteurs ont manifestement une action différentielle sur les gènes cibles comme le suggèrent les études récentes [213]. PR-A médie et réprime l'effet antiprolifératif de PR-B qui est activateur de la transcription. En effet, dans les études *in vitro*, PR-B apparaît comme l'activateur le plus puissant, PR-A ayant un effet dominant négatif sur PR-B. PR-A semble également pouvoir réprimer l'activité transcriptionnelle des récepteurs aux œstrogènes, aux androgènes, aux minéralo- et gluco-corticoïdes. Néanmoins, le rôle précis des 2 isoformes reste encore mal compris. Récemment, De Vivo et al. ont montré l'existence d'un polymorphisme fonctionnel du gène PR-B associé à un risque accru de cancer de l'endomètre en altérant la balance PR-A/PR-B et en surexprimant PR-B [216].

Différents niveaux de modulation de la réponse cellulaire dans les tissus cibles existent : ratio PR-A/PR-B, nature du ligand, cofacteurs associés (co-activateurs ou co-répresseurs).

L'évaluation de l'expression de ces récepteurs pourrait avoir, à l'instar du cancer du sein, un rôle pronostic pour les patientes atteintes de cancer de l'endomètre. La perte de l'expression des RP pourrait induire l'hyperrégulation de l'expression de gènes impliqués dans l'invasion tumorale [217].

4.3. Autres proto-oncogènes impliqués.

D'autres proto-oncogènes semblent impliqués dans la carcinogenèse endométriale et sont à l'étude tels c-myc, survivin (protéine inhibitrice de l'apoptose), RUNX1 (*runt-related transcription factor 1*), ETV5 et la *telomerase reverse transcriptase* humaine (hTERT) [34].

Il est probable que les mécanismes de carcinogenèse pour les carcinomes à cellules claires de l'endomètre soient différents de ceux évoqués pour les tumeurs endométrioïdes et séreuses papillaires car leur profil moléculaire est distinct de ces 2 formes.

Paramètres	Adénocarcinome Type 1	Adénocarcinome Type 2
Age	50-60 ans	60-70 ans
Obésité	Fréquente	Indifférente
Stimulation estrogénique	Fréquente	Indifférente
Endomètre	Hyperplasie	Atrophie
Précurseur	Hyperplasie atypique ou EIN (néoplasie endométriale intraépithéliale)	EIC (carcinome endométrial intraépithélial)
Evolution	Lente	Rapide
Type	Endométrioïde	Séreux papillaire ou cellules claires
Biologie moléculaire	MSI : 20 à 40% PTEN inactivation : 30 à 50% Mutations K-ras : 15 à 30% Mutations β -caténine : 31 à 47% Mutations TP53 : 10 à 20% HER2/neu : NR	MSI : 0 à 5% PTEN inactivation : 10% Mutations K-ras : 0 à 5% Mutations β -caténine : 0 à 3% Mutations TP53 : 90% HER2/neu : 18 à 80%
Familial	HNPC	
Extension	Ganglions lymphatiques	Péritoine
Métastases ovariennes	Fréquentes	Rares
Pronostic	Bon	Mauvais

Tableau 5 : profil clinique et moléculaire des cancers de l'endomètre de type I et II.

Matériel et Méthodes.

III. MATERIEL ET METHODES.

1. Matériel (origine des prélèvements).

De 1999 à 2004, 109 prélèvements incluant 20 endomètres normaux (10 en phase proliférative, 10 en phase sécrétoire), 39 hyperplasies endométriales (17 hyperplasies sans atypies, 22 hyperplasies avec atypies) et 50 cancers endométriaux (38 cancers endométrioïdes, 7 cancers sous tamoxifène, 5 cancers séreux ou à cellules claires) ont été étudiés à partir de spécimens chirurgicaux obtenus du service de Gynécologie-Obstétrique de l'hôpital Tenon à Paris et du service de gynécologie de l'Institut Mère Enfant Alix de Champagne de Reims. Deux anatomopathologistes ont effectué une relecture de toutes les lames histologiques pour confirmer le diagnostic et les caractéristiques histologiques. Aucune des patientes présentant un cancer de l'endomètre n'a reçu de chimiothérapie ou de radiothérapie avant la prise en charge chirurgicale qui a compris une cytologie péritonéale, une hystérectomie totale, une annexectomie bilatérale, un curage ganglionnaire pelvien et lomboaortique si nécessaire (conformément aux recommandations de la FIGO, les patientes avec un CE de stade I et de grade 1 n'ont pas eu de curage) [35].

109 prélèvements fixés au formol et inclus en paraffine ont été ainsi étudiés. Pour la simplicité du propos, nous avons regroupé les hyperplasies simples et complexes ne présentant pas d'atypies sous le terme d'hyperplasie simple (HS).

Les patientes présentant un CE ont été séparées en 3 groupes : cancers endométrioïdes, cancers sous Tamoxifène et cancers séreux ou à cellules claires ; le grade histologique a été évalué selon la classification de la FIGO [35]. Les facteurs pronostiques cliniques et histologiques incluant le grade histologique, la profondeur d'invasion myométriale, la présence d'embolies lymphatiques et vasculaires, l'existence de métastases ganglionnaires, le stade clinique, l'existence d'une récurrence ou le décès lié à la maladie ont été relevés pour chaque patiente. L'ensemble de ces données est résumé dans le tableau 6.

Cancers de l'endomètre	Nombre de patientes (%)
Cancers	
Endométrioides	38
Tamoxifène	7
Séreux, cellules claires	5
Stades	
I	29 (58%)
II	6 (12%)
II	13 (26%)
IV	2 (4%)
Grades	
1	20 (40%)
2	14 (28%)
3	16 (32%)
Profondeur de l'invasion myométriale	
M0 (no invasion)	6 (12%)
M1 (< 50%)	21 (42%)
M2 (> 50%)	23 (46%)
Métastase ganglionnaire	
N0	23 (67.6%)
N+	11 (32.4%)
Emboles lymphatiques/vasculaires	
oui	20 (40%)
non	30 (60%)
Récurrence	
oui	6 (12%)
non	44 (88%)
Décès (lié au cancer endométrial)	2 (4%)

Tableau 6: Caractéristiques cliniques et histologiques des 50 patientes présentant un cancer de l'endomètre (CE).

2. Méthodes.

2.1. Immunohistochimie.

L'analyse en immunohistochimie comporte l'étude de l'expression :

1. des métalloprotéinases (MMP-2, -7, et -9) et des inhibiteurs (TIMP-1 et -2)
2. de la prolifération (Ki67)
3. de certains facteurs de l'apoptose : p53, bcl-2
4. des récepteurs hormonaux aux estrogènes (RE) et à la progestérone (RP).

2.1.1. Technique d'immunohistochimie.

L'immunohistochimie a pour objet de révéler, in situ, des antigènes par l'intermédiaire d'anticorps spécifiquement dirigés contre ces antigènes. Nous avons utilisé une technique d'IHC indirecte utilisant des anticorps spécifiques des antigènes recherchés et une réaction enzymatique à la peroxydase permettant d'obtenir un précipité brun insoluble dans les zones où les anticorps sont fixés.

Préparation des coupes : des coupes de 3 μm ont été obtenues à l'aide d'un microtome à partir de blocs tissulaires fixés au formol et inclus en paraffine. Les coupes sont déposées avec quelques gouttes d'eau distillée sur des lames SuperFrost Plus® (Menzel Gläser, Allemagne) permettant une adhésion optimale des tissus prélevés. Elles sont placées sur une platine chauffante à 53°C pour permettre la fonte de la paraffine et l'étalement du prélèvement, puis laissées à sécher dans une étuve à 42°C pendant 12 heures.

Le déparaffinage des lames s'effectue par 3 bains successifs de xylène (Prolabo®, Paris) de 3 minutes chacun, puis elles sont réhydratées par 3 bains successifs de 2 minutes dans de l'éthanol à 70%, 85% et 100% (Merck®, Allemagne). Elles sont ensuite rincées à l'eau distillée.

La technique d'IHC nécessite un démasquage antigénique (le formol crée des liaisons tissulaires notamment membranaires masquant les sites antigéniques) permettant de rendre les sites antigéniques accessibles aux anticorps spécifiques. Ce prétraitement a été déterminé pour chaque anticorps (bain marie à 100°C pendant 30 minutes dans une

solution de DAKO® Target Retrieval Solution ou protéinase K). De la même façon, la concentration optimale de l'anticorps a été recherchée pour obtenir un marquage lisible sans bruit de fond. Comme témoin négatif, nous avons utilisé des immunoglobulines non spécifiques de souris IgG1, IgG2 et IgM (isotypes correspondant à nos anticorps). Comme témoin positif externe, nous avons utilisé différents tissus connus pour exprimer les anticorps testés. Les tests préliminaires effectués sur ces prélèvements ont permis de déterminer les conditions optimales d'utilisation de ces anticorps. L'ensemble de ces données sont résumées dans le tableau 7.

Le marquage IHC a été réalisé à l'aide d'un automate Ventana NEXES (Ventana Medical Systems®, Tucson, Arizona) qui réalise les étapes suivantes :

- inhibition de l'activité peroxydase endogène par application d'une solution de peroxyde d'hydrogène,
- rinçage par du tampon,
- incubation pendant 30 minutes avec l'anticorps primaire correspondant à la protéine à étudier,
- rinçage au tampon,
- incubation pendant 20 minutes avec l'anticorps biotinylé anti-souris,
- incubation avec le complexe streptavidine-biotine-peroxydase pendant 20 minutes,
- révélation à la diaminobenzidine + cuivre,
- contre-coloration à l'hématoxyline Harris

Pour les anticorps MMP-7, MMP-9, un kit d'amplification a été utilisé (Ventana Medical Systems®).

2.1.2. Anticorps.

Les différents renseignements concernant les anticorps qui ont été utilisés en IHC dans ce travail figurent dans le tableau 7 (laboratoire commercial, dilution et concentration utilisées, type de pré-traitement et de post-traitement, spécificité antigénique, tissu témoin).

Concernant les métalloprotéinases, nous avons utilisé des anticorps monoclonaux purifiés de souris ; les anticorps primaires sont les suivants : MMP-2 humaine (gelatinase-A, Ab-2, clone 17B11, Novocastra Laboratories Ltd, Newcastle,

United Kingdom), MMP-7 humaine (matrilysin, Ab-3, clone ID2, Calbiochem, Oncogene Research Products, Cambridge, United Kingdom), MMP-9 humaine (gelatinase-B, Ab-3, clone 56 2A4, Calbiochem, Oncogene Research Products), TIMP-1 humain (Ab-4, clone 3A4, Novocastra Laboratories Ltd) et TIMP-2 humain (Ab-2, clone 6F6a, Novocastra Laboratories Ltd). Les composants immunogéniques de ces anticorps sont : une protéine recombinante correspondant à 132 acides aminés de la région C-terminale pour MMP-2, une MMP-7 recombinante humaine, un peptide de synthèse correspondant aux acides aminés 626-644 de la MMP-9 humaine, une protéine recombinante procaryote correspondant à une région de 135 acides aminés pour TIMP-1, et un peptide de synthèse correspondant à une séquence spécifique de la région N-terminale de TIMP-2. Anti-MMP-2, anti-MMP-9 et anti MMP-7 reconnaissent à la fois les formes latentes et actives de ces MMPs. Il n'y a pas de réaction croisée entre MMP-9 et MMP-1, -2, -3 ou -13.

2.1.3. Analyse quantitative et semi-quantitative.

Pour les anticorps à marquage cytoplasmique (bcl-2, MMPs et TIMPs), l'évaluation a été semi-quantitative et déterminée par 2 observateurs indépendants. Le pourcentage de cellules positives a été estimé dans 10 champs des zones les plus caractéristiques au grossissement 40 (x 400).

Pour les MMPs et les TIMPs, le comptage a été effectué sur les cellules épithéliales et un score IHC (H-score) a été déterminé en multipliant le % de cellules positives par l'intensité du marquage évalué de 0 (pas de marquage) à 3 (intensité maximale). Pour l'endomètre normal et l'hyperplasie simple et atypique, le comptage a également porté sur le compartiment stromal ; celui-ci n'a pas été pris en considération dans le cas des cancers de l'endomètre du fait d'une grande hétérogénéité de la réaction stromale rendant ce comptage aléatoire. Néanmoins, pour les cancers, nous avons analysé les types cellulaires marqués pour les MMPs et TIMPs dans le stroma.

Les variations concernant les résultats exprimés par les 2 observateurs étaient inférieures à 5%.

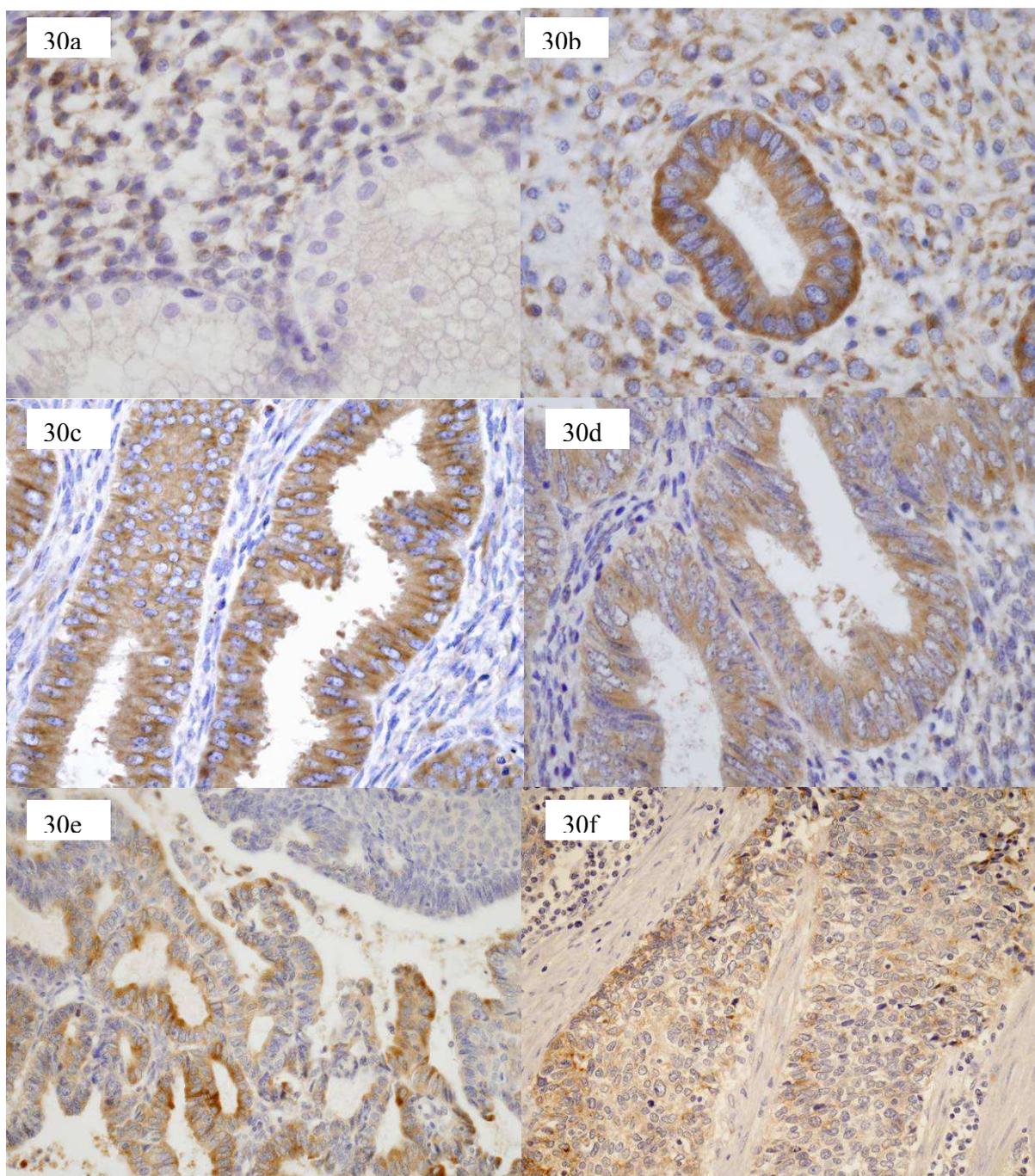
Pour les anticorps à marquage nucléaire (Ki67, p53, RE α et RP-A, RP-B), l'analyse quantitative a été réalisée par analyseur d'images ZEISS en utilisant le logiciel KS300. Le comptage a été effectué sur 10 champs (x 400) et n'a porté que sur les cellules épithéliales carcinomateuses. Pour la quantification en analyse d'image, le

chromogène et la contre-coloration utilisés doivent être choisis de façon à ce que la contre-coloration soit transparente à la longueur d'onde du chromogène. Cette condition est remplie en utilisant la diaminobenzidine comme chromogène (DAB) et l'hématoxyline Harris comme contre-coloration. L'analyseur d'images travaille à 2 longueurs d'ondes différentes et permet d'établir un rapport du nombre de noyaux marqués sur le nombre total de noyaux.

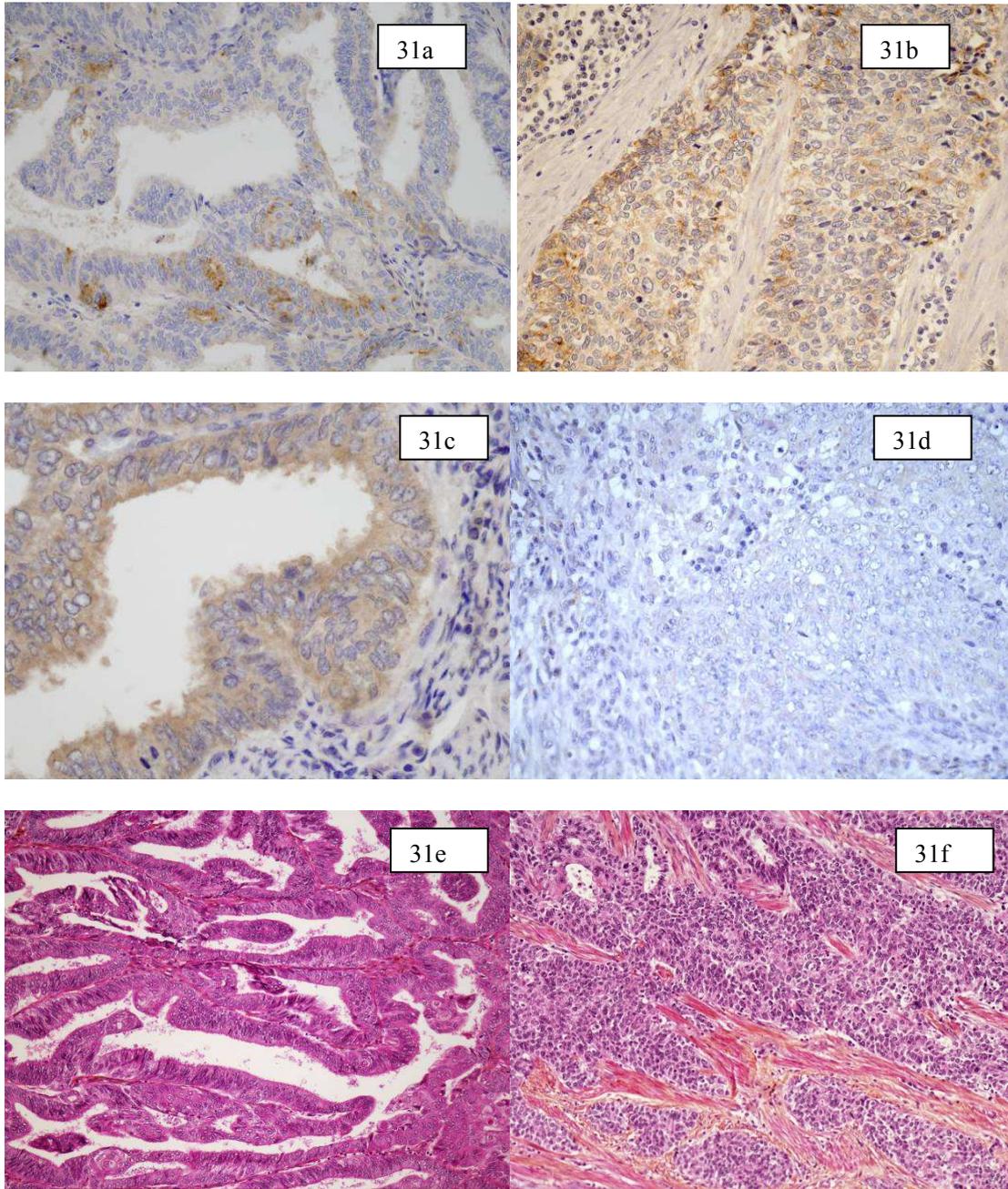
Les figures 30, 31 et 32 montrent les résultats obtenus à partir de ces immunomarquages sur coupes histologiques d'endomètre normal, d'hyperplasie et de cancers de l'endomètre.

Anticorps	Société	Dilution (et concentration)	Prétraitement (renaturation antigénique) et post-traitement	Spécificité	Témoin
p53 DO-7	Dakocytomation	1/75 ^{ème}	BM à 100°C 30 minutes	p53 sauvage, mutante	Cancer sein
bcl-2 clone 124	Dakocytomation	1/20 ^{ème}	BM à 100°C 30 minutes	Oncoprotéine bcl-2	Ganglion
Ki67-MIB1	Dakocytomation	1/100 ^{ème}	BM à 100°C 30 minutes	Protéine Ki67	Cancer sein
NCL-ER-6F11	Novocastra	1/25 ^{ème}	BM à 100°C 30 minutes, amplification	Récepteur alpha E	Endomètre, cancer sein
NCL PGR 312	Novocastra	1/200 ^{ème}	BM à 100°C 30 minutes	Récepteur A Prog	Endomètre
NCL PGR B	Novocastra	1/200 ^{ème}	BM à 100°C 30 minutes, amplification	Récepteur B Prog	Endomètre, cancer sein
NCL MMP2	Novocastra	1/10 ^{ème} (10 µg/ml)	BM à 100°C 30 minutes	MMP2 latente, activée	Bronche
MMP7 IML	Calbiochem	1/50 ^{ème} (4 µg/ml)	Protéinase K, amplification	MMP7 latente, activée	Cancer ovaire
MMP9 IML	Calbiochem	1/10 ^{ème} (10 µg/ml)	BM à 100°C 30 minutes, amplification	MMP9 latente, activée	Cancer sein
NCL TIMP1	Novocastra	1/50 ^{ème} (2 µg/ml)	BM à 100°C 30 minutes	TIMP1 humaine	Cancer sein
NCL TIMP2	Novocastra	1/15 ^{ème} (6.5 µg/ml)	BM à 100°C 30 minutes	TIMP2 humaine	Placenta

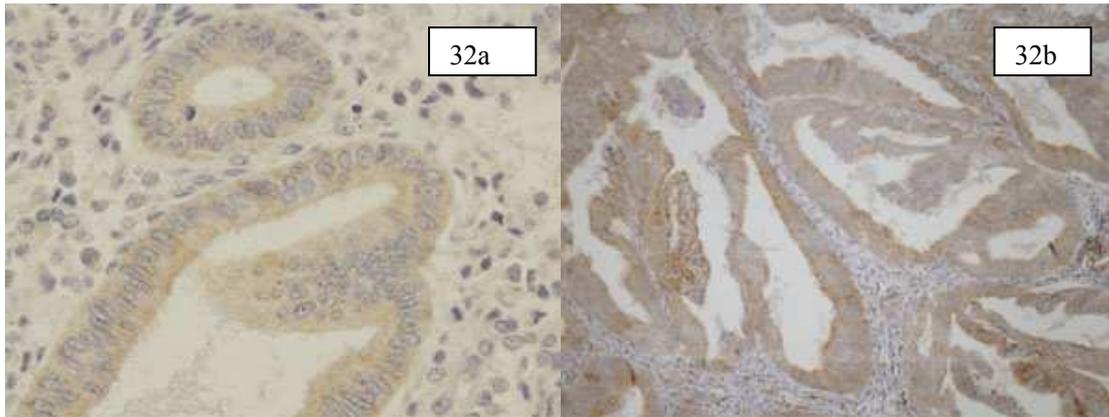
Tableau 7 : anticorps utilisés en immunohistochimie (BM : bain marie).



Figures 30 : endomètre normal en phase sécrétoire montrant un marquage IHC de MMP-2 dans le stroma (30a), et en phase proliférative montrant un marquage de TIMP-1 dans les cellules épithéliales et le stroma (30b). Immunomarquage de TIMP-1 dans les cellules épithéliales et stromales d'une hyperplasie simple (30c) et d'une hyperplasie atypique (30d). Immunomarquage faible de MMP-2 dans un cancer endométrioïde de grade 1 (30e) et plus important dans un cancer endométrioïde de grade 3 (30f).

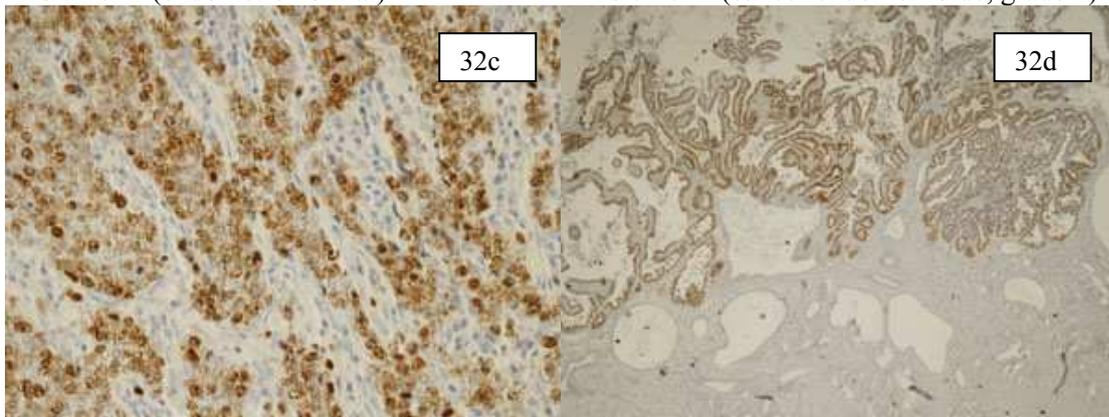


Figures 31 : Immunomarquage (IHC) de MMP-2 dans un cancer endométriöide de grade 1 (31a) et de grade 3 (31b) et immunomarquage de TIMP-2 dans un cancer endométriöide de grade 1 (31c) et de grade 3 (31d). Coloration à l'hémathoxyline-éösine (HES) dans un cancer endométriöide de grade 1 (31e) et de grade 3 (31f).



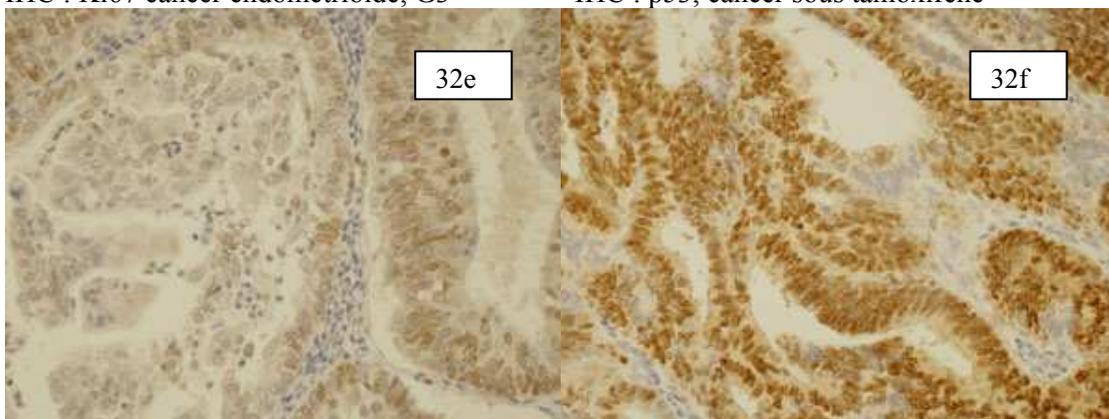
IHC : Bcl-2 (endomètre normal)

IHC : Bcl-2 (cancer endométrioïde, grade 1)



IHC : Ki67 cancer endométrioïde, G3

IHC : p53, cancer sous tamoxifène



IHC : RE alpha cancer endométrioïde, G1

IHC : RPB cancer endométrioïde, G2

Figures 32 : immunomarquage de bcl-2, Ki67, p53, RE alpha et RPB dans l'endomètre normal, hyperplasique et tumoral.

2.2. Quantification de l'ADN par analyse d'image (ploïdie).

Au cours du cycle cellulaire, le contenu en ADN d'une cellule passe de 2N en G0/G1 à 4N en phase G2. C'est au cours de la phase S que le contenu en ADN change (phase de synthèse). La mesure du contenu en ADN d'une cellule a pour but de connaître d'une part sa position dans le cycle cellulaire et d'autre part de dire si une population cellulaire a un contenu en ADN identique à celui d'une population de référence.

2.2.1. Principe de la quantification d'ADN.

Il s'agit d'un « dosage » par une mesure densitométrique, après étalonnage de l'appareil par une population cellulaire de référence.

Il faut disposer d'une coloration spécifique et stœchiométrique de l'ADN pour que l'intensité de la coloration soit directement proportionnelle à la quantité d'ADN. Cette condition est réalisée grâce à la coloration de **Feulgen**. Après numérisation et segmentation de l'image, la mesure de la quantité de lumière transmise, fonction de l'intensité de la coloration sera convertie en unités de densité optique. Cette mesure sera effectuée en tout point du noyau et la D.O. (densité optique) qui en résulte correspond à la quantité d'ADN présente dans le noyau.

2.2.2. Coloration de Feulgen.

C'est une coloration spécifique de l'ADN pour mesure de la ploïdie par cytométrie en images (Fig. 33a et 33b). Les blocs de paraffine sont coupés à 5 microns et étalés sur lames ordinaires avec de l'eau albuminée. Les lames sont séchées et mises à l'étuve pendant 24 heures. Les lames sont déparaffinées et réhydratées (bains de xylène et d'alcool) puis colorées en utilisant les réactifs spécifiques (HCl 12 N, azur A, métabisulfite de sodium, KHSO₄, alcool 100°). Les lames sont ensuite déshydratées (bains successifs d'alcool et de xylène) puis montées. L'ADN est coloré en bleu.

2.2.3. Etapes de la quantification.

Après réglage de l'intensité lumineuse, l'étape de calibration a pour but de déterminer la DO intégrée de cellules de référence. La nature de l'échantillon de référence varie en fonction des appareils mais il s'agit toujours de cellules dont le contenu en ADN est connu et

fixe (fibroblastes, cellules épithéliales, hépatocytes). Les lames de calibration ont été colorées dans les mêmes conditions que les lames à analyser et 20 noyaux au minimum ont été mesurés. Une seconde étape d'étalonnage est nécessaire (de façon interne, sur la lame à analyser) du fait qu'il s'agit de coupes histologiques et que les noyaux ne sont pas entiers. Les noyaux sont directement quantifiés sur les lames et 200 noyaux environ sont mesurés.

2.2.4. Expression et traitement des résultats.

Les résultats sont exprimés par des histogrammes comportant en abscisse la quantité d'ADN contenue dans les noyaux mesurés et le nombre de noyaux mesurés en ordonnée. Le pic principal correspond aux cellules en phase G0 et en phase G1. La population cellulaire étudiée sera caractérisée par son index d'ADN (ID) défini comme étant le rapport entre la quantité d'ADN en G0/G1 des cellules étudiées sur la quantité d'ADN des cellules de référence en phase G0/G1 (tableau 8).

Dénomination	Valeur de l'index d'ADN
Diploïde	$0.92 < ID < 1.08$
Péridiploïde	$1.08 < ID < 1.2$
Hypoploïde	$ID < 0.92$
Aneuploïde	$1.25 < ID < 1.9$
Tétraploïde	$1.9 < ID < 2.5$
Hyperploïde	$ID > 2.5$
Multiploïde	plusieurs pics aneuploïdes

Tableau 8 : caractérisation des populations cellulaires selon leur contenu en ADN.

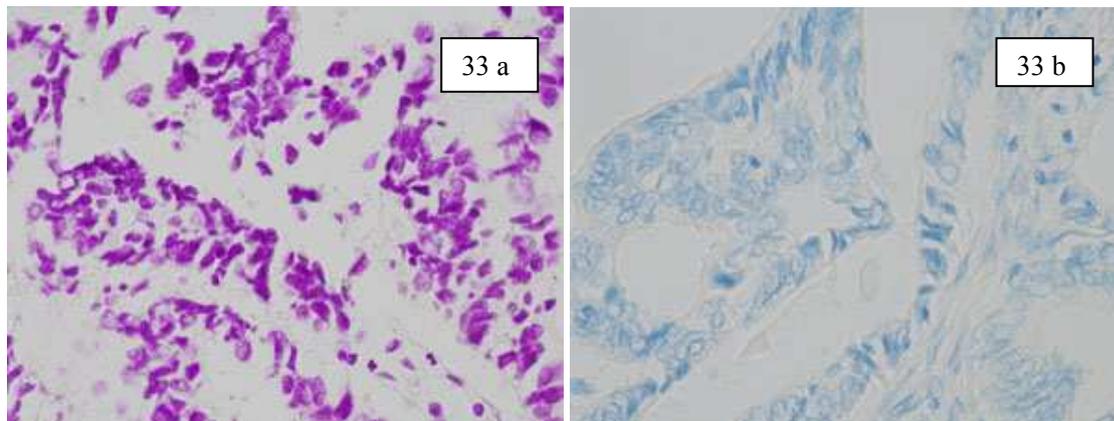
Afin de déterminer les pourcentages de noyaux dans les différentes phases du cycle, ainsi que les pourcentages de noyau à contenu en ADN $>$ à 5C, 9C (aussi appelées 5c ou 9c exceeding events : cellules anormales ayant un contenu en ADN nucléaire supérieur à une population cellulaire normale en phase G0/G1 en cours de duplication ou de quadruplication), les histogrammes sont découpés par des bornes fixées par l'opérateur.

A partir de la série des 109 patientes, la ploïdie a pu être analysée sur 101 prélèvements. En effet, les biopsies ou pièces opératoires fixées par le liquide de Bouin (6

endomètres normaux, 1 hyperplasie simple, 1 hyperplasie atypique) n'ont pu faire l'objet d'une coloration de Feulgen.

Les histogrammes de contenu en ADN (Fig. 34) ont été obtenus à partir du comptage de 200 cellules nucléées en moyenne (moyenne : 197 cellules, extrêmes : 116-312) de l'endomètre normal (prolifératif ou sécrétoire) ou dans les zones caractéristiques de la pathologie considérée (hyperplasie simple ou atypique et cancer).

Les prélèvements diploïdes ont été comparé aux prélèvements non diploïdes (regroupant les contenus aneuploïdes et multiploïdes).



Coloration de Feulgen, cancer séreux

Coloration de Feulgen, cancer endométrioïde, G2

Figures 33 : Coloration de Feulgen pour analyse de la ploïdie dans un cancer séreux (a) et dans un cancer endométrioïde (b) de l'endomètre

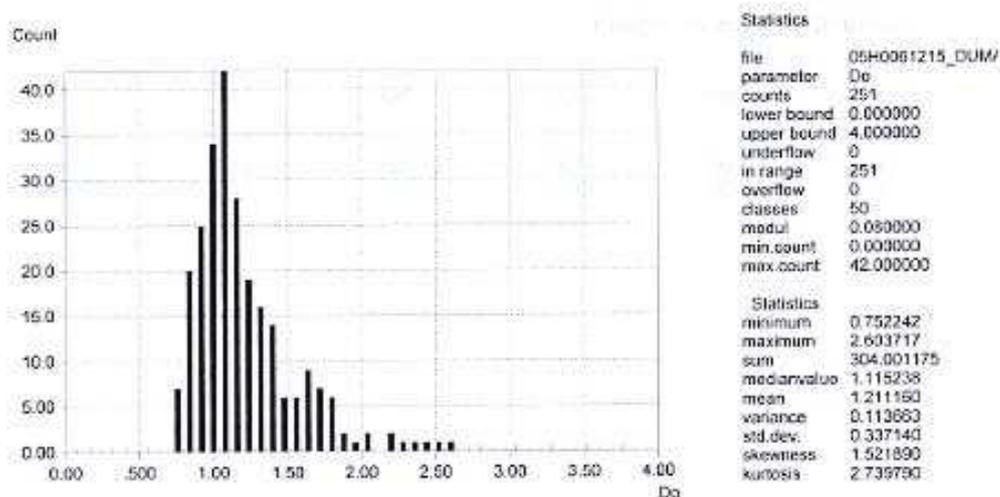


Figure 34 : exemple d'histogramme obtenu à partir d'un prélèvement de cancer endométrioïde de grade 1 de l'endomètre (index ADN = 1.04, contenu diploïde).

2.3. Hybridation in situ par fluorescence.

2.3.1. Généralités.

Les 2 brins d'une molécule d'ADN sont appariés par des liaisons hydrogène établies selon les critères de Watson et Crick. La rupture de ces liaisons entraîne la séparation de ces 2 brins et la dénaturation de l'ADN. L'hybridation correspond à la rencontre aléatoire de l'acide nucléique d'une sonde monobrin spécifique et sa séquence complémentaire dans l'ADN chromosomique cible qui a été dénaturé. Il y a formation d'hybrides spécifiques qui sont révélés par fluorescence, les hybrides non spécifiques étant éliminés par lavages. Les conditions d'hybridation doivent tenir compte de plusieurs paramètres : préservation de l'accessibilité à la séquence cible, cinétique de formation des hybrides, détection efficace de la sonde avec un minimum de bruit de fond.

2.3.2. Préparation de la sonde P53 et des coupes.

Préparation des sondes.

Les segments d'ADN génomique contenant les gènes à utiliser comme sonde ont été insérés dans l'ADN de BAC (Bacterial Artificial Chromosomes) obtenus à partir de cultures d'E. Coli transfectées et résistantes au chloramphénicol. Le choix des BAC couvrant le locus de TP53 s'est effectué en consultant les bases de données spécifiques (Ensemble.org). Après une phase de culture dans un milieu LB (mélange de tryptone, NaCl et extraits de levure) et de chloramphénicol, l'ADN est extrait grâce à un kit d'extraction (Qiagen Highspeed Plasmid Purification®). Les sondes sont ensuite marquées par nick-translation. L'ADN à marquer est incubé 8 heures à 15°C en présence d'un mélange nucléotidique contenant un nucléotide modifié (dNTP) couplé à un fluorochrome (SpectrumOrange ou SpectrumGreen) et d'un mélange enzymatique (DNAse 1 qui réalise des coupures aléatoires dans l'ADN du BAC et ADN polymérase I qui déplace les coupures par son activité exonucléasique et les comble en incorporant les nucléotides marqués et non marqués contenus dans le mélange réactionnel). La réaction est stoppée par dénaturation enzymatique pendant 10 minutes à 70°C. L'ADN marqué obtenu est précipité en présence d'ADN Cot. Celui-ci, constitué de séquences hautement répétées, permet de saturer les séquences répétées lors de l'hybridation et d'éviter les hybridations non spécifiques de la sonde.

Les sondes ainsi obtenues sont hybridées sur des lames témoins (lymphocytes normaux en métaphase) afin de contrôler la fixation de la sonde sur le bon chromosome (bras court du chr 17 pour TP53) (Fig. 34).

La sonde P53 a été co-hybridée avec une sonde commerciale centromérique du chr 17 (marquée au SpectrumGreen). Son utilisation s'est faite selon les recommandations du fabricant.

Préparation des coupes et des lames.

- Nous avons pu réaliser des appositions cellulaires sur lame à partir de matériel congelé provenant de 3 patientes incluses dans cette série : 1 endomètre normal et 2 cancers de l'endomètre (Fig. 35). Ces 3 lames ont subi le protocole de prétraitement, dénaturation et hybridation employé en routine dans le laboratoire de cytogénétique en utilisant les sondes spécifiques pour cette étude (sondes centromériques du chromosome 17 et locus spécifique de P53).

- Pour les 50 cancers de l'endomètre de cette série inclus en paraffine, les coupes sont obtenues au microtome comme pour la technique d'IHC ; elles ont une épaisseur de 3µm et sont déposées sur des lames SuperFrost Plus®. Les lames sont séchées pendant une nuit dans une étuve à 42°C.

Les lames subissent un prétraitement spécifique aux préparations tissulaires incluses en paraffine permettant l'accès des sondes à l'ADN contenu dans les noyaux des cellules. Voici les principales étapes de ce prétraitement :

- déparaffinage par 3 bains de xylène pendant 10 min chacun,
- réhydratation par des bains d'alcool à 100°, 85° et 70° pendant 5 minutes chacun,
- rinçage à l'eau distillée,
- hydrolyse par HCl 0.2M pendant 30 min,
- solution de 2XSSC buffer + 0.05% de Tween 20 pendant 5 min,
- bain marie à 80°C dans une solution de 2XSSC pendant 30 min,
- rinçage à l'eau distillée,
- solution de 2XSSC buffer + 0.05% de Tween 20 pendant 5 min,
- protéolyse par une solution de TEN (Tris HCl 1M à pH8, EDTA 0.5M, NaCl 1M) avec de la protéinase K (60µl de PK à 20µg/µl) dans un bain marie à 37°C pendant 15 min,
- solution de 2XSSC buffer + 0.05% de Tween 20 pendant 5 min,
- fixation par une solution de formaldéhyde à 4% pendant 10 min,

- solution de 2XSSC buffer + 0.05% de Tween 20 pendant 5 min,
- déshydratation par des bains d'alcool à 70°, 85° et 100° pendant 5 min chacun,
- séchage à l'air pendant 10 min

2.3.3. Dénaturation et hybridation.

Trois µl de sonde (mélange de sonde cm 17 [0.75 µl] et P53 [2.25 µl]) dilués dans un tampon approprié ont été déposés sur la zone cible (repérée par microscopie à contraste de phase) et recouverts d'une lamelle scellée par du Rubber Cement®. La dénaturation des lames s'est faite sur plaque chauffante à 90°C pendant 10 minutes et l'hybridation s'est produite lors de l'incubation des lames en chambre humide à 42°C pendant 36 heures.

2.3.4. Lavages stringents.

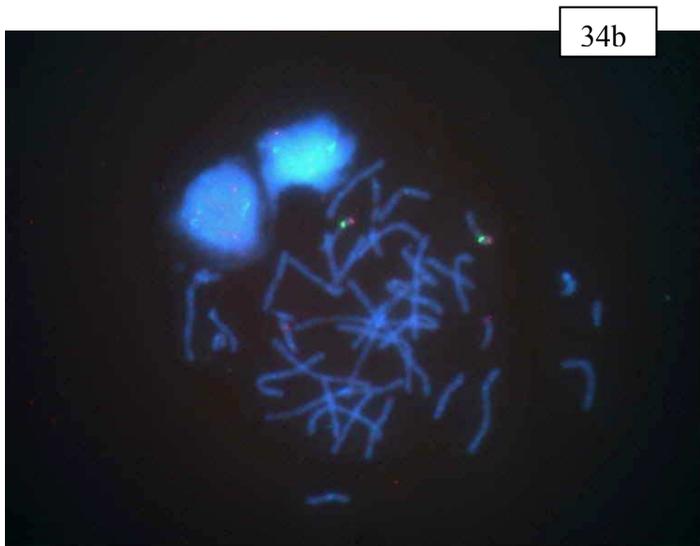
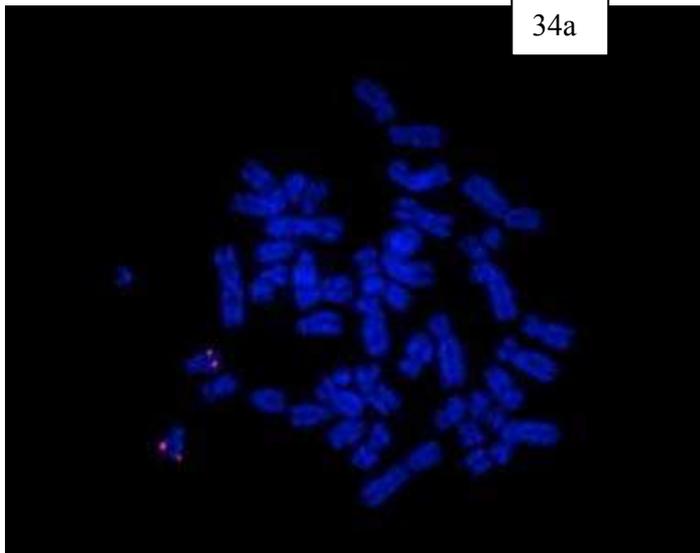
Ils permettent d'éliminer l'excès de sonde et les hybridations non spécifiques afin de limiter le bruit de fond. Les lames ont été placées dans des bains successifs de 2 SSC et 2 SSC – 50% formamide à 42°C après retrait de la lamelle. Trente µl de DAPI (4,6-diaminophénylindole permettant la contre-coloration des noyaux) contenant du Vectashield® ont été appliqués sur chaque lame et montées sur lamelles.

2.3.5. Lecture.

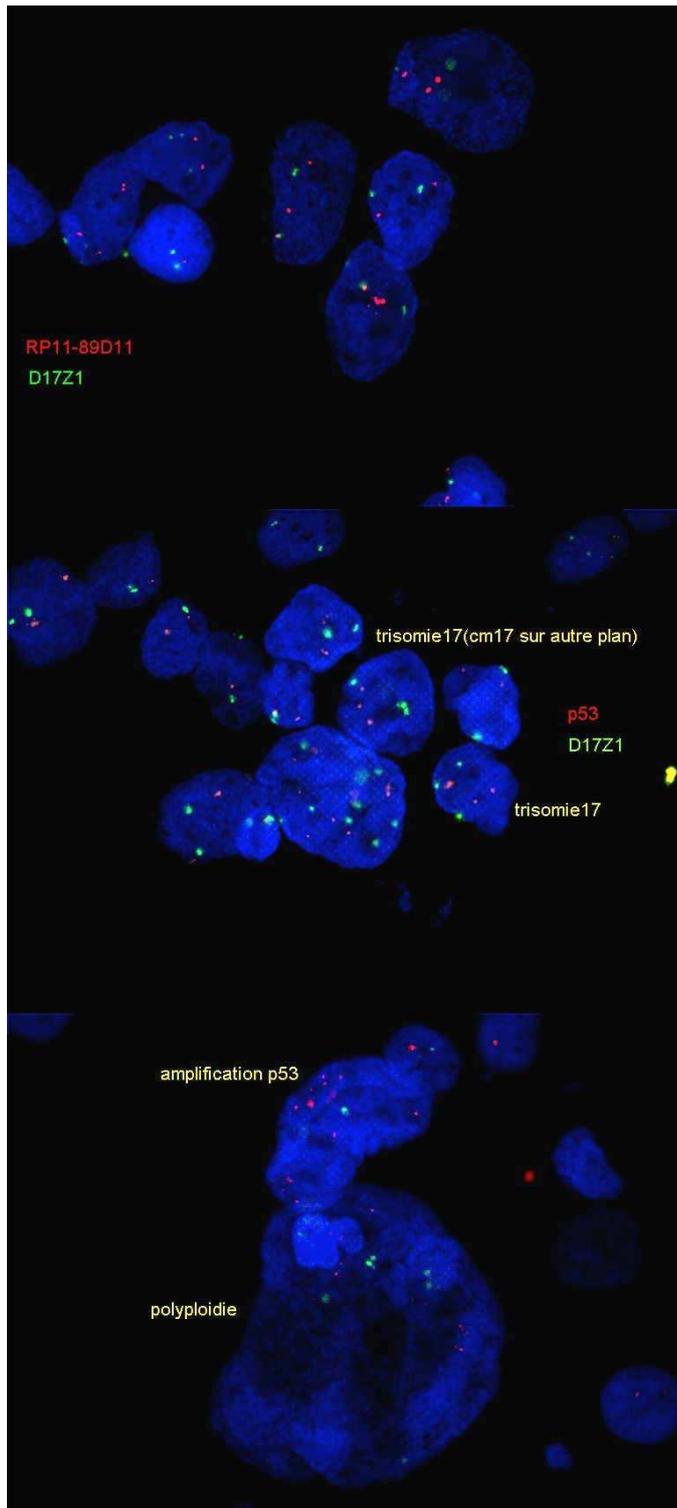
La lecture des lames de FISH a été réalisée à l'aide d'un microscope à fluorescence (LEICA) comportant différents filtres permettant la lecture des fluorochromes utilisés au grossissement 40 (x400) et en utilisant un logiciel d'analyses d'images spécifique (logiciel FISH Génikon®).

Pour les appositions cellulaires, le comptage s'est fait sur une centaine de cellules isolées en rapportant pour chaque noyau le nombre de spots de sonde centromérique et le nombre de spots de sonde P53. Pour les coupes en paraffine, le comptage s'est effectué sur les zones tumorales en déterminant le nombre de spots de sonde centromérique (cm) et le nombre de spots de sonde locus spécifique (ls) contenus dans un cadre de lecture correspondant à une surface de 0.26 mm² et à un volume de 0.15µ³. Le ratio sonde cm / sonde ls a été établi pour déterminer une éventuelle amplification ou perte d'hétérozygotie concernant TP53 (en définissant un ratio < 0.5 pour la perte d'hétérozygotie et un ratio > 2 pour l'amplification).

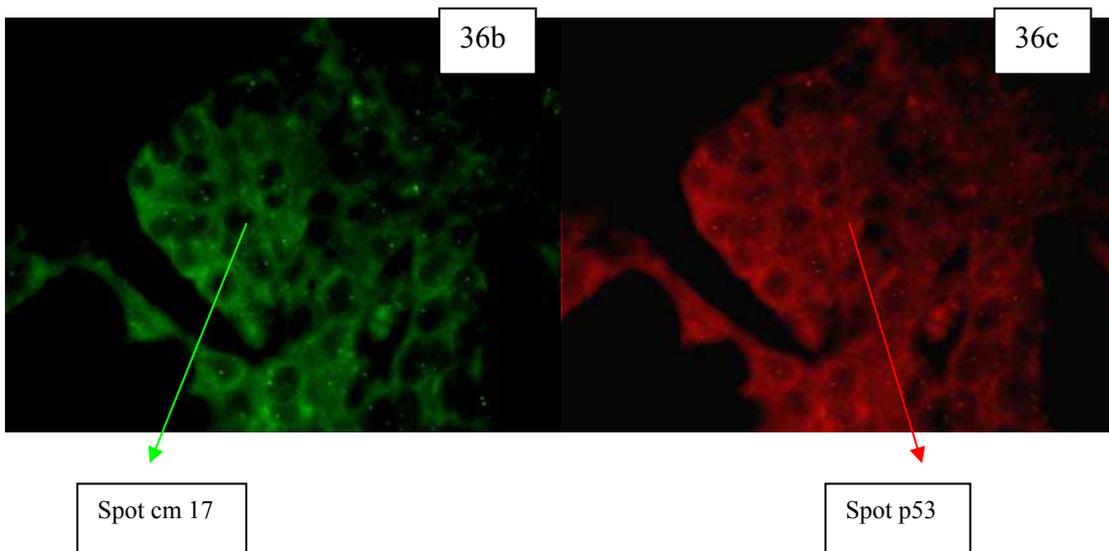
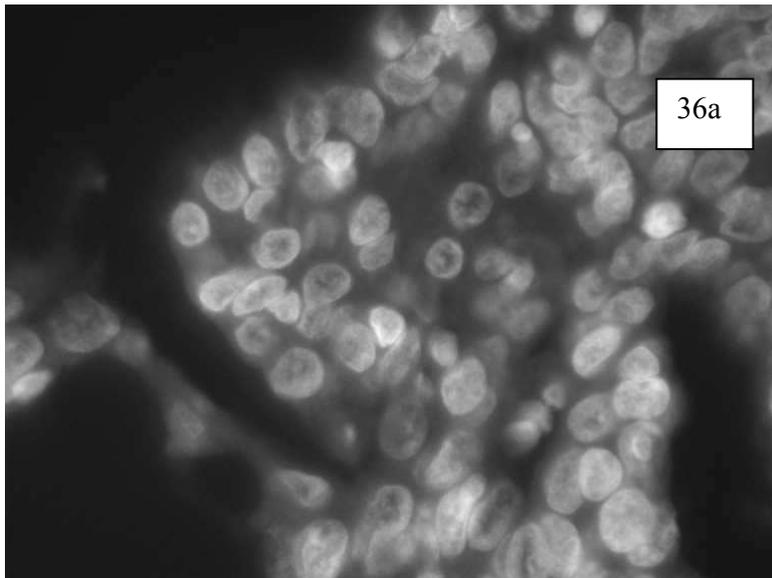
Sur les 50 coupes en paraffine techniques, seules 43 lames ont pu être analysées dans de bonnes conditions. En effet, malgré plusieurs tentatives de prétraitement et d'hybridation répétées, nous n'avons pas obtenu de spot visible sur 7 de ces coupes. Il est possible que l'absence d'hybridation soit liée à la mauvaise qualité de l'ADN sur ces prélèvements tissulaires inclus en paraffine ou à la moins bonne conservation de la morphologie tissulaire après la phase de prétraitement pour ces cas là (noyaux pycnotiques). Pour les 43 lames hybridées avec succès, le comptage s'est effectué comme décrit précédemment par 2 opérateurs. La structure morphologique des tissus, bien conservée la plupart du temps, et la bonne visibilité des spots a permis une analyse dans de bonnes conditions de lecture la plupart du temps (Fig. 36) sauf pour quelques unes des lames où la présence d'un voile rouge sous le filtre SpectrumRed a rendu cette lecture plus difficile. Nous avons également effectué une lecture « contrôle » sur des éléments cellulaires isolés identifiables en périphérie de la tumeur afin de se rapprocher des conditions décrites pour la technique des empreintes cellulaires. Cette technique a le grand avantage de permettre une analyse ciblée car la localisation des anomalies morphologiques est rendue possible par la conservation de l'architecture tissulaire mais elle est mal adaptée à la mise en évidence de petites populations cellulaires où TP53 serait amplifié ou délété car la densité cellulaire est importante et les noyaux se chevauchent très fréquemment. De plus, les noyaux des cellules analysées sont tronqués par la coupe au microtome. Pour augmenter la pertinence de l'analyse, il est souhaitable d'analyser les lames de FISH au niveau des zones correspondantes au marquage maximal en Immunohistochimie.



Figures 34: Hybridation in situ en fluorescence sur préparation chromosomique de lymphocytes sanguins. Marquage par un BAC RP11-111L9 couvrant le locus de Bcl-2 en 18q (33a). Double hybridation avec la sonde Bcl-2 (spot rouge) et une sonde centromérique commerciale du chromosome 18 (spot vert) (33b) (microscope à fluorescence x 400).



Figures 35 : double hybridation in situ en fluorescence, réalisée à partir d'un prélèvement tumoral (CE) congelé (apposition cellulaire), avec une sonde centromérique du chromosome 17 (D17Z1) et une sonde locus-spécifique de P53 (provenant d'un BAC RP11-89D11) (microscope à fluorescence x 400).



Figures 36 : Hybridation in situ en fluorescence sur tissus inclus en paraffine (cancer endométriode de grade 3). Photographies de l'architecture tissulaire et cellulaire (35a) (coloration par DAPI) et des spots de la sonde centromérique du chromosome 17 (35b) et de la sonde P53 (35c) (microscope à fluorescence, x 400).

Résultats.

Métalloprotéases et inhibiteurs tissulaires des métalloprotéases dans le processus de carcinogenèse endométriale.

Article 1 :

Métalloproteinase-2, -7 and -9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and-2 expression in normal, hyperplastic and neoplastic endometrium : a clinical-pathological correlation study.

O. Graesslin, A. Cortez, R. Fauvet, M. Lorenzato, P. Birembaut, E. Daraï.

Ann Oncol 2006; 17: 637-45.

L'objectif de ce travail était d'évaluer l'expression des MMP-2, -7 et -9 et de TIMP-1, et -2 dans l'endomètre normal, l'hyperplasie endométriale simple et atypique et dans le cancer de l'endomètre et d'analyser leur niveau d'expression et leur corrélation aux facteurs pronostiques cliniques et histologiques.

Article 1.

Nous avons effectué une étude immunohistochimique qualitative et semi-quantitative de 20 endomètres normaux (10 en phase proliférative, 10 en phase sécrétoire), 39 endomètres hyperplasiques (17 sans atypies et 22 avec atypies) et 38 cancers endométriaux de l'endomètre portant sur MMP-2, -7 et -9 et sur TIMP-1 et -2.

Résultats : dans l'endomètre normal, l'expression épithéliale de MMP-2 ($p = 0.0007$), de MMP-7 ($p = 0.0002$) et de TIMP-2 (0.0004) était significativement augmentée pendant la phase proliférative du cycle menstruel par rapport à la phase sécrétoire. L'expression de MMP-2 était négativement corrélée à celle de TIMP-2 ($p = 0.001$, $q = 0.702$). Les cellules stromales de l'endomètre exprimaient plus fortement MMP-2 ($p = 0.004$) et plus faiblement MMP-7 ($p = 0.001$) et TIMP-1 ($p = 0.01$) en phase sécrétoire qu'en phase proliférative. Dans l'endomètre hyperplasique, la présence d'atypies était associée à une expression plus faible de TIMP-2 ($p = 0.005$) avec une tendance à l'augmentation de l'expression de MMP-2. Au niveau stromal, il n'y avait pas de différence d'expression de MMP-2, -7 et -9 et sur TIMP-1 et -2 entre hyperplasie avec ou sans atypies. Un gradient d'expression de MMP-2 et -9 était observé entre hyperplasie et cancer. Dans les cancers de l'endomètre, l'expression de MMP-2 augmentait avec le grade histologique ($p = 0.0004$) alors que celle de TIMP-2 diminuait ($p = 0.0005$). L'expression de TIMP-2 était corrélée au degré d'invasion myométriale ($p = 0.005$), à l'envahissement lymphovasculaire ($p = 0.008$) et à l'envahissement ganglionnaire ($p = 0.007$).

Conclusion : ces résultats suggèrent l'implication des métalloprotéases et des inhibiteurs tissulaires des métalloprotéases dans le processus de carcinogenèse endométriale. Une expression élevée de MMP-2 et faible de TIMP-2 dans les cancers de l'endomètre est associée à un risque élevé d'extension locale et à distance.

Metalloproteinase-2, -7 and -9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and -2 expression in normal, hyperplastic and neoplastic endometrium: a clinical-pathological correlation study

O. Graesslin^{1,2,4}, A. Cortez^{1,2}, R. Fauvet², M. Lorenzato⁵, P. Birembaut^{5,6} & E. Darai^{2,3*}

¹Service d'Anatomie Pathologique, Hôpital Tenon, AP-HP, Paris; ²UPRES EA 2396 UFR Saint-Antoine, Université Paris VI, Pierre et Marie Curie;

³Service de Gynécologie, Hôpital Tenon, AP-HP, Paris; ⁴Service de Gynécologie, Institut Mère Enfant Alix de Champagne;

⁵Service d'Anatomie Pathologique, Laboratoire Pol Bouin; ⁶INSERM UMR-S 514, Reims, France

Received 31 August 2005; revised 26 November 2005; accepted 2 December 2005

Background: Matrix metalloproteinases (MMPs) and their inhibitors are key-players in extracellular matrix and basement membrane degradation, and are involved in both physiological and malignant processes. The aim of this study was to examine MMP-2, -7 and -9 and TIMP-1 and -2 expression in normal, hyperplastic and malignant endometrium, and their relation to clinical and histological prognostic factors.

Materials and methods: We performed qualitative and semi-quantitative immunohistochemical analysis of 20 samples of normal endometrium (10 in the proliferative phase, 10 in the secretory phase), 39 samples of hyperplastic endometrium (17 without atypia and 22 with atypia) and 38 samples of endometrioid carcinoma, by using specific monoclonal antibodies.

Results: In normal endometrium, epithelial expression of MMP-2 ($P = 0.0007$), MMP-7 ($P = 0.0002$) and TIMP-2 ($P = 0.0004$) was increased during the proliferative phase of the menstrual cycle. MMP-2 expression correlated negatively with TIMP-2 expression ($P = 0.001$, $\rho = 0.702$). Endometrial stromal cells in the secretory phase showed strong MMP-2 expression ($P = 0.004$) and weak MMP-7 ($P = 0.001$) and TIMP-1 expression ($P = 0.01$). In hyperplastic endometrium, the presence of atypia was associated with lower TIMP-2 expression ($P = 0.005$) and was also associated with a trend towards higher MMP-2 expression. Endometrial stromal cell expression of MMP-2, -7 and -9 and TIMP-1 and -2 did not differ between hyperplastic endometrium with and without atypia. A gradient of MMP-2 and -9 expression was observed from hyperplastic endometrium to endometrial carcinomas. In endometrial carcinomas, MMP-2 expression increased ($P = 0.0004$) and TIMP-2 expression decreased ($P = 0.0005$) with the histological grade. TIMP-2 expression correlated with myometrial invasion ($P = 0.005$), lymphovascular space involvement ($P = 0.008$) and lymph node involvement ($P = 0.007$).

Conclusion: These results support the involvement of MMPs and TIMPs in endometrial carcinogenesis. Strong MMP-2 and weak TIMP-2 expression were the most potent markers of endometrial malignancies with a high risk of local and distant spread.

Key words: metalloproteinases, metalloproteinase inhibitors, endometrial cancer, hyperplasia, normal endometrium, immunohistochemistry

introduction

Matrix metalloproteinases (MMPs) are a family of zinc-dependent proteinases known for their ability to degrade the extracellular matrix [1, 2]. Over 20 human MMPs have been described including collagenases that cleave native fibrillar collagen types I, II and III and stromelysin 1 and 2 that have broad substrate specificity [3–7]. Gelatinases A (MMP-2) and B

(MMP-9) degrade denatured collagens and basement membrane components [8, 9]. MMPs and TIMPs are thought to be essential for the proliferative, invasive and metastatic properties of various carcinomas [10–13].

Endometrial carcinoma is the most common malignancy of the female genital tract, and affects mostly menopausal women [14]. Prognostic factors include the histological grade, disease stage, myometrial invasion, vascular space involvement and lymph node metastasis [15].

Endometrial hyperplasia with atypia (EH) is considered to be a precursor of endometrial carcinoma (EC) [16]. Precursor

*Correspondence to: Professor E. Darai, Service de Gynécologie-Obstétrique, Hôpital Tenon, 4 rue de la Chine, 75020 Paris, France. Tel: +33-1-56-73-18; Fax: +33-1-56-01-73-17; E-mail: emile.darai@tnn.ap-hop-paris.fr

lesions of EC are monoclonal and recent studies suggest a multistep process involving hormonal regulation [17], gene mutation [18–20], adhesion molecules [21], apoptosis [22–24], metalloproteinases (MMP) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP) [25].

Several molecular studies have shown the involvement of MMPs and TIMPs in matrix remodelling of normal endometrium throughout the menstrual cycle [26, 27]. In contrast, few data are available on their expression in hyperplastic endometrium. Soini et al. [28], analysing the messenger RNA of MMP-9 by *in situ* hybridisation, found that MMP-9 was expressed in hyperplastic endometrium, contrary to non-neoplastic endometrium, suggesting a role in the malignant phenotype. In a small study using *in situ* hybridisation, Määttä et al. [29] found no difference in TIMP-1, -2 or -3 mRNA expression between normal and hyperplastic endometrium. In contrast, previous studies using immunohistochemistry, zymography or *in situ* hybridisation have shown a correlation between MMP-2 and/or -9 expression and the histological grade and disease stage of endometrial carcinoma [30–32]. Moreover, in a previous immunohistochemical study, we found that MMP-2, TIMP-1 and -2 expressions were correlated with the invasiveness of endometriotic lesions [33]. However, the prognostic value of MMP and TIMP expression in endometrial carcinoma is controversial [34, 35].

Therefore, the aims of this study were (a) to analyse MMP-2, -7 and -9 and TIMP-1 and -2 expression in normal, hyperplastic endometrium (with and without atypia) and endometrioid carcinomas, (b) to compare their expression according to the histological type and (c) to evaluate their prognostic value in endometrial carcinoma.

materials and methods

From 1999 to 2004, tissue samples from 97 women, comprising 20 samples of normal endometrium, 39 samples of hyperplastic endometrium and 38 samples of endometrioid carcinomas were obtained in the Gynaecology Departments of Tenon Hospital, Paris and Institut Mère Enfant Alix de Champagne, Reims, France. Two pathologists reviewed all tissues samples to confirm the diagnosis and histological characteristics. None of the 38 patients with endometrioid carcinoma received chemotherapy or radiotherapy before surgery, which consisted of peritoneal cytology, total hysterectomy, bilateral salpingo-oophorectomy, and pelvic and para-aortic lymph node sampling when necessary.

Formalin-fixed, paraffin embedded samples of 20 normal endometria (10 obtained in the proliferative phase and 10 in the secretory phase of the menstrual cycle), 39 samples of hyperplastic endometria (17 without atypia and 22 with atypia) and 38 samples of endometrioid carcinoma were studied. The histological grade of endometrioid carcinoma was assessed according to the International Federation of Gynaecology and Obstetrics (FIGO) guidelines [36]. Histological and clinical prognostic factors, including the depth of myometrial invasion, lymphovascular space involvement, lymph node metastasis, the FIGO clinical stage, recurrence and death from disease, were recorded. The histological characteristics of the 38 endometrioid carcinomas are summarised in Table 1. In accordance with FIGO recommendations, women with stage I grade 1 endometrial cancer did not routinely undergo lymphadenectomy.

Table 1. Clinical and histological characteristics of the 38 patients with endometrial cancers (endometrioid type)

Endometrial cancers	Number of patients (%)
Grades	
1	17 (44.7%)
2	13 (34.2%)
3	8 (21.1%)
Stages	
I	23 (60.5%)
II	6 (15.8%)
III	7 (18.4%)
IV	2 (5.3%)
Depth of myometrial invasion	
M0 (no invasion)	5 (13.1%)
M1 (<50%)	15 (39.5%)
M2 (>50%)	18 (47.4%)
Lymph node metastasis	
Yes	6 (15.8%)
No	20 (52.6%)
Vascular/lymphatic invasion	
Yes	14 (36.8%)
No	24 (63.2%)
Recurrence	
Yes	3 (7.9%)
No	35 (92.1%)
Death (from disease)	2 (5.2%)

immunohistochemistry

antibodies. Purified mouse monoclonal antibodies against human MMP-2 (gelatinase-A, Ab-2, clone 17B11, Novocastra Laboratories Ltd, Newcastle, UK), human MMP-7 (matrilysin, Ab-3, clone ID2, Calbiochem, Oncogene Research Products, Cambridge, UK), human MMP-9 (gelatinase-B, Ab-3, clone 56 2A4, Calbiochem, Oncogene Research Products), human TIMP-1 (Ab-4, clone 3A4, Novocastra Laboratories Ltd) and human TIMP-2 (Ab-2, clone 6F6a, Novocastra Laboratories Ltd) were used as primary antibodies. The immunogenic component was a recombinant protein corresponding to 132 amino acids of the C-terminal part of human MMP-2; recombinant human MMP-7; a synthetic peptide corresponding to amino acids 626–644 of human MMP-9; a prokaryotic recombinant protein corresponding to a 135-amino-acid region of human TIMP-1; and a synthetic peptide corresponding to a specific sequence located in the N-terminal region of TIMP-2. Anti-MMP-2, anti-MMP-7 and anti-MMP-9 recognise both latent and active forms of MMP.

immunohistochemical technique. Tissues were immediately fixed in formalin (10%) and then processed as paraffin blocks. Sections of formalin-fixed tissues, 4 µm thick, were deparaffinated in xylene and rehydrated through a graded series of ethanol solutions. Sections were immunostained using the Ventana Nexes automated immunohistochemistry system (Ventana Medical Systems, Tucson, Arizona). Prior to MMP-2, MMP-9, TIMP-1 and TIMP-2 immunoreaction, an antigen retrieval step was used, combined with a high-temperature antigen-unmasking technique (Dako® Target Retrieval Solution, Glostrup, Denmark; 100°C, 30 min). For MMP-7, antigen unmasking was achieved with proteinase K. The automated procedure was based on an indirect biotin-avidin system with a universal biotinylated immunoglobulin as secondary antibody, diaminobenzidine as substrate and hematoxylin as counterstain. For MMP-7 and MMP-9, in addition to the automated procedure, a Ventana amplification kit was used (Ventana Medical Systems®). Anti-MMP-2 and anti-MMP-9 antibodies were used at

a dilution of 1/10 (both 10 µg/ml), anti-MMP-7 and anti-TIMP-1 were used at a dilution of 1/50 (4 µg/ml and 2 µg/ml, respectively), and anti-TIMP-2 was used at a dilution of 1/15 (6.5 µg/ml).

Positive controls for MMP-2, -7, -9, TIMP-1 and -2 were sections of bronchial tissue, ovarian cancer, breast cancer and placenta, respectively. For negative control, the primary antibody was replaced by an irrelevant non-immune mouse antibody of the same IgG subtype (Dako Laboratories, Glostrup, Denmark).

analysis of immunohistochemistry

Immunoreaction of endometrial epithelial cells was assessed qualitatively and semi-quantitatively. For semi-quantitative analysis of tumour cells, the percentage of positive cells was noted for approximately 1000 neoplastic cells per slide, subdivided into 10 selected fields at $\times 400$ magnification.

Immunoreaction of endometrial stromal cells in normal and hyperplastic endometrium was assessed qualitatively and semi-quantitatively. Semi-quantitative analysis was based on the following four classes: less than 10% of cells labelled, between 10% and <25%, between 25% and <50%, and 50% or more. Immunoreaction was assessed by two independent observers. Variations between the two observers were below 5%.

statistical analysis

We used the chi-square test for categorical variables and the Kruskal–Wallis and Mann–Whitney tests for continuous variables. Correlations with MMP and TIMP expression were evaluated by using Spearman's test. *P* values below 0.05 were considered significant.

results

MMP and TIMP expression in normal endometrium

Endometrial cell cytoplasm immunoreaction was positive for MMP-2, -7 and -9 and TIMP-1 and -2. No MMP-2 (Figure 1A) immunoreaction was observed in samples from the secretory phase, while all samples from the proliferative phase were positive ($P = 0.0007$). Whatever the phase of the menstrual cycle, endometrial epithelial cells were positive for MMP-7 and -9 and TIMP-1 (Figure 1B) and TIMP-2.

Semi-quantitative immunoreaction of endometrial epithelial cells for MMP-2, -7 and -9 and TIMP-1 and -2 is shown in Table 2 according to the phase of menstrual cycle. Expression was higher in the proliferative phase than in the secretory phase for MMP-2 ($P = 0.0007$), MMP-7 ($P = 0.0002$) and TIMP-2 ($P = 0.0004$). MMP-9 and TIMP-1 expression did not vary with the phase of the menstrual cycle. A negative correlation was observed between MMP-2 and TIMP-2 expression ($P = 0.001$, $\rho = 0.702$) (Figure 2).

In endometrial stromal cells, qualitative expression of MMP-2, -7 and -9 and TIMP-1 and -2 did not differ according to the phase of the menstrual cycle.

Semi-quantitative analysis of endometrial stromal cell immunoreaction showed that MMP-2 expression increased in the secretory phase ($P = 0.004$) (Table 3). In contrast, MMP-7 ($P = 0.001$) and TIMP-1 ($P = 0.01$) expression decreased in the secretory phase (Table 3). MMP-9 and TIMP-2 expression did not vary with the phase of the menstrual cycle.

MMP and TIMP expression in hyperplastic endometrium

The cytoplasm of endometrial epithelial cells in hyperplastic endometrium reacted positively for MMP-2, -7 and -9 and

TIMP-1 (Figure 1C, D) and TIMP-2. No qualitative difference in immunoreaction for MMP-2, -7 and -9 and TIMP-1 and -2 was observed between hyperplastic endometrium with and without atypia.

Table 4 shows semi-quantitative MMP-2, -7 and -9 and TIMP-1 and -2 immunoreaction values for endometrial epithelial cells in hyperplastic endometrium with and without atypia. TIMP-2 expression was lower in hyperplastic endometrium with rather than without atypia ($P = 0.005$). A trend towards higher MMP-2 expression was observed in hyperplastic endometrium with atypia compared with samples without atypia ($P = 0.1$). No difference in MMP-7, MMP-9 or TIMP-1 expression was found between samples with and without atypia.

Qualitative and semi-quantitative expression of MMP-2, -7 and -9 and TIMP-1 and -2 by endometrial stromal cells did not differ between hyperplastic endometrium with and without atypia.

MMP and TIMP expression in endometrial carcinoma

In the epithelial compartment, all 38 samples of endometrial carcinoma (Figure 1E, F) showed positive cytoplasmic immunoreaction for MMP-7, MMP-9 and TIMP-1. All but one of the samples were positive for MMP-2 (Figure 1G, H). Four samples were negative for TIMP-2.

The mean percentage \pm SD (median, range) of cells reacting positively for MMP-2, -7 and -9 and TIMP-1 and -2 in endometrial carcinomas were 53.3 ± 29.9 (55, 0–90), 74.3 ± 18.8 (80, 30–100), 93.8 ± 7.3 (95, 70–100), 64.9 ± 22.6 (70, 10–92) and 46.9 ± 26.5 (50, 0–90), respectively. A trend towards a negative correlation was observed between MMP-2 and TIMP-2 expression ($P = 0.05$, $\rho = 0.314$).

Quantitative analysis of the immunoreaction in the endometrial stromal compartment of endometrial carcinomas was not possible because of the paucity of the stromal reaction, particularly in grade 2 and 3 carcinomas. In the endometrial stromal compartment, immunoreaction was stronger close to endometrial cancer cells. Tumour fibroblasts and endothelial cells reacted positively for MMP-2. MMP-7 was not detected in stromal cells. MMP-9 was predominantly expressed by inflammatory cells of the stroma. TIMP-1 and TIMP-2 showed variable stromal expression.

MMP and TIMP expression according to the diagnosis

MMP-2, -7 and -9 and TIMP-1 and -2 expression in proliferative and secretory endometrium with hyperplastic endometrium with and without atypia is compared in Table 5.

Stronger expression of MMP-2 ($P = 0.002$) and MMP-9 ($P < 0.0001$) was observed in endometrial carcinomas than in hyperplastic endometrium with atypia (Table 6). With a cut-off of 80% of positive cells, MMP-9 positivity had a sensitivity, specificity and positive and negative predictive values of 100%, 50%, 78% and 100%, respectively, for endometrial carcinoma. MMP-7 expression was lower in endometrial carcinomas than in hyperplastic endometrium with atypia ($P = 0.04$), while TIMP-1 and -2 expression was similar.

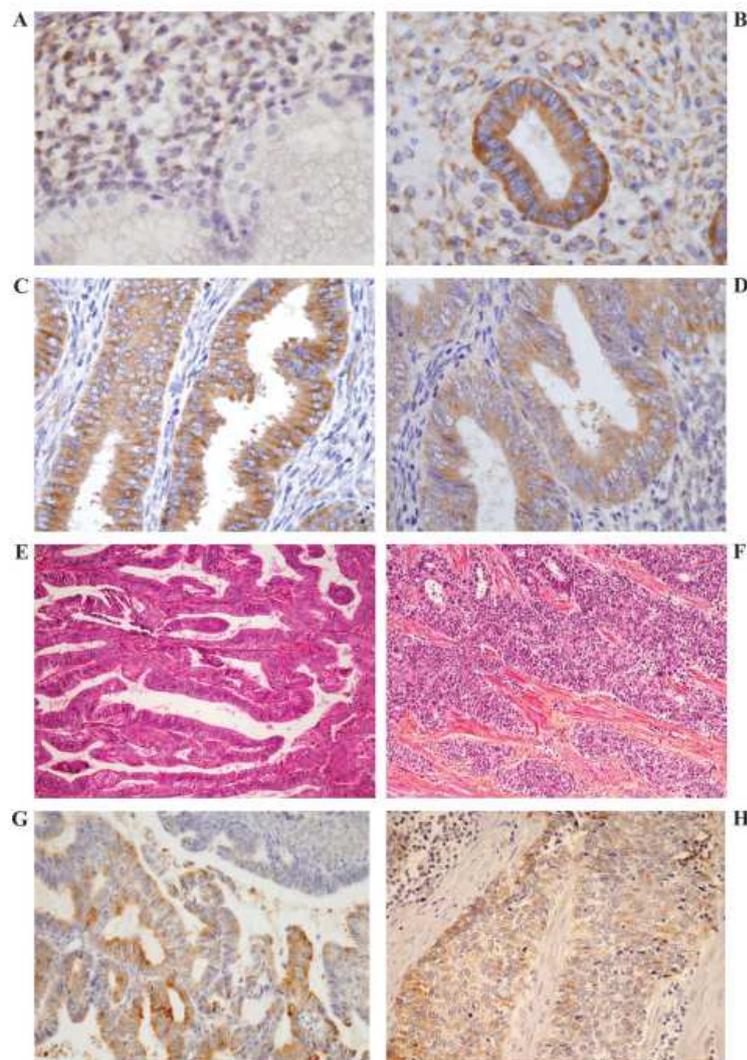


Figure 1. Representative samples of normal endometrium showing no cytoplasmic immunoreaction for MMP-2 in endometrial epithelial cells from secretory phase with a marked reaction in endometrial stromal cells (A), and a positive immunoreaction for TIMP-1 in endometrial epithelial cells from proliferative phase (B). TIMP-1 immunoreaction in endometrial epithelial cells from hyperplasia without atypia (C) and TIMP-1 immunoreaction in both endometrial epithelial and stromal cells from hyperplasia with atypia (D). Endometrioid carcinomas of the uterus (hematoxylin-eosin), grade 1 (E) and grade 3 (F). Representative samples of endometrioid carcinomas showing a low cytoplasmic immunoreaction for MMP-2 in a grade 1 (G), and a high immunoreaction in a grade 3 (H) carcinomas.

MMP and TIMP expression in endometrioid cancers according to clinical and histological characteristics

Histological grade correlated with semi-quantitative MMP-2 and TIMP-2 expression. MMP-2 expression increased with histological grade ($P = 0.0004$). The difference was significant between grade 1 and 2 ($P < 0.0001$) and between grade 1 and 3 ($P = 0.003$), but not between grade 2 and 3 (Table 7).

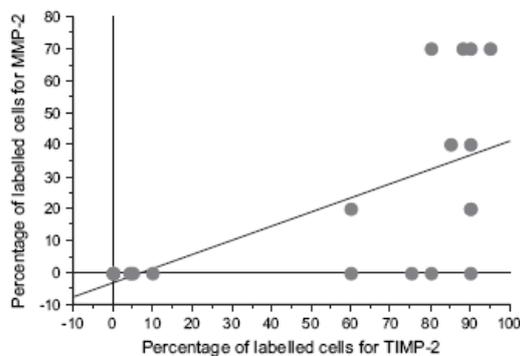
TIMP-2 expression declined with histological grade ($P = 0.0005$). The difference was significant between grade 1 and 3 ($P < 0.0001$) and between grade 2 and 3 ($P = 0.002$), while a trend towards a difference was noted between grade 1 and 2 ($P = 0.08$).

The mean percentage \pm SD of TIMP-2-positive cells in tumour samples from patients with no myometrial invasion, invasion involving less than 50% of the myometrium, and

Table 2. Semi-quantitative values of immunostaining for endometrial epithelial cells in normal endometrium according to the phase of menstrual cycle for MMP-2, -7 and -9 and TIMP-1 and -2

	Proliferative phase Mean value \pm SD Median (range)	Secretory phase Mean value \pm SD Median (range)	P value
MMP-2	42.0 \pm 26.6 40 (0–70)	0 \pm 0 0 (0)	0.0007
MMP-7	99.0 \pm 2.1 100 (95–100)	62.0 \pm 31.2 72.5 (15–90)	0.0002
MMP-9	87.0 \pm 9.2 90 (70–95)	90.6 \pm 1.7 90 (90–95)	NS
TIMP-1	91.0 \pm 5.2 90 (85–100)	84.0 \pm 11.7 87.5 (60–95)	NS
TIMP-2	85.8 \pm 9.9 90 (60–95)	23.4 \pm 33.8 40.5 (0–80)	0.0004

SD, standard deviation; NS, not significant.

**Figure 2.** Negative correlation between MMP-2 expression and TIMP-2 expression in normal endometrium.**Table 3.** Immunoreaction results for MMP-2, -7 and TIMP-1 in endometrial stromal cells of normal endometrium according to the phase of menstrual cycle

	Proliferative phase	Secretory phase	P value
MMP-2			
<10%	4	1	0.004
>10%, <25%	2	0	
>25%, <50%	3	0	
>50%	1	9	
MMP-7			
<10%	0	0	0.001
>10%, <25%	0	0	
>25%, <50%	0	7	
>50%	10	3	
TIMP-1			
<10%	0	0	0.01
>10%, <25%	0	3	
>25%, <50%	3	6	
>50%	7	1	

invasion involving more than 50% of the myometrium was 62.0 ± 14.8 , 57.3 ± 26.6 and 34.2 ± 23.6 , respectively ($P = 0.005$). The difference was significant between patients with no myometrial invasion and more than 50% of myometrial

Table 4. Immunoreaction results for MMP-2, -7 and -9 and TIMP-1 and -2 in endometrial epithelial cells from hyperplastic endometrium with and without atypia

	Hyperplasia without atypia Mean value \pm SD Median (range)	Hyperplasia with atypia Mean value \pm SD Median (range)	P value
MMP-2	15.4 \pm 18.4 5 (0–50)	28.0 \pm 27.9 15 (0–80)	0.1
MMP-7	77.4 \pm 23.9 90 (0–90)	82.9 \pm 8.8 87.5 (60–90)	NS
MMP-9	78.8 \pm 22.9 85 (10–100)	74.3 \pm 15.7 77.5 (40–95)	NS
TIMP-1	60.9 \pm 10.6 60 (40–80)	58.4 \pm 12.2 60 (30–75)	NS
TIMP-2	70.9 \pm 19.7 80 (20–90)	50.7 \pm 22.4 50 (0–90)	0.005

SD, standard deviation; NS, not significant.

invasion ($P = 0.02$), and between patients with less than 50% and more than 50% invasion ($P = 0.01$), but not between patients with no invasion and patients with less than 50% invasion.

The mean percentage \pm SD of TIMP-2-positive cells in patients with or without lymphovascular space involvement was 32.7 ± 22.4 and 55.2 ± 25.9 , respectively ($P = 0.008$). The mean percentage \pm SD of TIMP-2-positive cells in patients with and without lymph node involvement was 26.7 ± 19.9 and 58.8 ± 22.8 , respectively ($P = 0.007$). No relation was found between TIMP-2 expression and the FIGO stage, recurrence, or death from disease.

The mean percentage \pm SD of TIMP-1-positive cells in samples from patients with and without lymphovascular space involvement was 57.2 ± 20.2 and 68.8 ± 23.5 , respectively ($P = 0.04$). The mean percentage \pm SD of TIMP-1-positive cells in patients with and without recurrence was 28.3 ± 10.4 and 68.1 ± 20.5 , respectively ($P = 0.01$). No relation was found between TIMP-1 expression and the FIGO stage, the depth of myometrial invasion, lymph node metastasis, or death from disease.

A trend towards stronger MMP-2 expression was found in samples from women with myometrial invasion. In the same way, a trend towards stronger MMP-7 expression was found in samples from women with lymphovascular space involvement. In contrast, no relation was found between MMP-9 expression and the FIGO stage, the depth of myometrial invasion, lymphovascular space involvement, lymph node metastasis, recurrence, or death from disease.

discussion

We observed a continuum of MMP and TIMP expression from hyperplastic endometrium without atypia to hyperplastic endometrium with atypia and endometrial carcinomas. MMP and TIMP expression correlated with clinical and histological prognostic factors of endometrial carcinoma.

Few reports have focused on MMP and TIMP expression in hyperplastic endometrium. Lower TIMP-2 expression was observed in endometrial epithelial cells in hyperplastic endometrium with atypia than in hyperplastic endometrium without atypia. Moreover, MMP-2 expression tended to be stronger in hyperplastic endometrium with atypia. These results

Table 5. Comparison between immunoreaction results for MMP-2, -7 and -9 and TIMP-1 and -2 in endometrial epithelial cells from normal endometrium and hyperplastic endometrium with and without atypia

	MMP-2 P value	MMP-7 P value	MMP-9 P value	TIMP-1 P value	TIMP-2 P value
Proliferative endometrium versus atypical hyperplasia	NS	<0.0001	0.02	<0.0001	<0.0001
Proliferative endometrium versus simple hyperplasia	0.005	<0.009	NS	<0.0001	0.03
Atypical hyperplasia versus simple hyperplasia	NS	NS	NS	NS	0.006
Secretory endometrium versus atypical hyperplasia	0.004	0.006	0.004	0.0001	0.01
Secretory endometrium versus simple hyperplasia	0.01	NS	NS	0.0001	0.0001

NS, not significant.

Table 6. Immunoreaction results for MMP-2, -7 and -9 and TIMP-1 and -2 in endometrial epithelial cells from hyperplastic endometrium with atypia and in carcinoma cells

	Hyperplasia with atypia Mean value ± SD	Endometrioid carcinoma Mean value ± SD	P value
MMP-2	28.0 ± 27.9	53.3 ± 29.9	0.002
MMP-7	82.9 ± 8.8	74.3 ± 18.8	0.04
MMP-9	74.3 ± 15.7	93.8 ± 7.3	< 0.0001
TIMP-1	58.4 ± 12.2	64.9 ± 22.6	NS
TIMP-2	50.7 ± 22.4	46.9 ± 26.5	NS

SD, standard deviation; NS, not significant.

Table 7. Relation between clinical and pathological prognostic factors and MMPs and TIMPs expression in endometrial carcinomas from endometrioid type

Clinicopathologic features	MMP-2	MMP-7	MMP-9	TIMP-1	TIMP-2
Grade	0.0004	NS	NS	NS	0.0005
Stage (FIGO)	NS	NS	NS	NS	NS
Depth of myometrial invasion	P = 0.06	NS	NS	NS	P = 0.005
M0 (no invasion) versus M1 (<50%)					NS
M0 versus M2 (>50%)					P = 0.02
M1 versus M2					P = 0.01
Vascular/lymphatic invasion					
Presence versus absence	NS	P = 0.05	NS	P = 0.04	P = 0.008
Lymph node metastasis					
Presence versus absence	NS	NS	NS	NS	P = 0.007
Recurrence					
Yes versus no	NS	NS	NS	P = 0.01	NS
Death (from disease)	NS	NS	NS	NS	NS

NS, not significant.

support the involvement of MMP and TIMP in premalignant endometrial lesions. Our results are in keeping with those of Uzan et al. [33] showing that MMP-2 immunohistochemical expression increased with the aggressiveness of endometriotic

lesions. In contrast, they disagree with the results of Määttä et al. [29], who found no difference in MMP and TIMP expression between hyperplastic endometrium with and without atypia. However, these authors using *in situ* hybridisation (ISH) analysed only six samples of hyperplastic endometrium. Very few data are available on MMP and TIMP expression by endometrial stromal cells in hyperplastic endometrium. Soini et al. [28] observed variable MMP-2 mRNA expression in endometrial stromal cells of hyperplastic and neoplastic endometrium, but data were insufficient to determine the role of MMP in endometrial physiopathology. TIMP-2 expression by endometrial stromal cells in hyperplastic endometrium has not previously been studied. We found lower TIMP-2 expression in endometrial stromal cells from hyperplastic endometrium with atypia than in hyperplastic endometrium without atypia.

Semi-quantitative TIMP-2 expression distinguished hyperplastic endometrium with atypia from hyperplastic endometrium without atypia, while MMP-2, -7 and -9 expression distinguished hyperplastic endometrium with atypia from endometrial carcinoma. These results support the existence of a continuum of MMP and TIMP expression from hyperplastic to malignant endometrium. Our data are in keeping with previous findings suggesting that MMP-2 and MMP-9 mRNA expression is associated with the malignant phenotype of endometrial lesions [28]. Malignant transformation of endometrial precancers occurs by accumulation of sufficient genetic damage to permit invasion of the adjacent stroma [20] and increased expression of matrix-metalloproteinases could participate in this invasive process.

We found a positive relation between MMP-2 expression and the histological grade of endometrial carcinomas. A trend towards higher MMP-2 expression was also noted in women with myometrial invasion. These results are in line with previous zymographic or immunohistochemical studies suggesting that MMP-2 is the main metalloproteinase involved in the malignant behaviour of endometrial cancer [37, 38] and that MMP-2 expression is increased in regions adjacent to tumours, particularly at the invasive front, where it is co-expressed with MT1-MMP [29]. No relation was noted between MMP-2 expression and the FIGO stage, vascular/lymphatic invasion or disease-free survival, as previously reported in immunohistochemical studies [30, 31, 34]. We also noted a trend towards a relation between lymphovascular space

involvement and strong MMP-7 expression. Only one previous study has focused on MMP-7 expression in endometrial cancer, using immunohistochemistry, zymography and *in situ* hybridization techniques, and it also showed a relation between strong MMP-7 expression and lymph node metastasis [39]. These results are consistent with the work of Wang et al. [40], who demonstrated that MMP-7 can also activate progelatinases (proMMP-2 and proMMP-9) and thereby facilitate tumour invasion and metastasis.

No relation between MMP-9 expression and clinical or histological prognostic factors was observed in our study. These results are in keeping with those of Inoue et al. [41] but not with previous immunohistochemical and zymographic studies suggesting a relation between MMP-9 expression and FIGO stage and/or histological grade [30, 31, 42]. This discrepancy could be explained by the sample size and by the use of immunostaining or zymography, which only takes into account active forms of endoproteases. However, immunohistochemical analysis is particularly valuable because it can be applied to formalin-fixed samples, thereby offering better reproducibility in diagnostic histopathology and precise localisation of MMPs. Standardisation of immunohistochemical staining procedures and their evaluation is necessary to clarify the complex interactions between MMPs and TIMPs involved in local and distant progression of malignant diseases [43, 44]. The relatively small size of our sample could explain why no relation was found between clinical parameters and the expression of some MMPs and TIMPs. However, it should be noted that we used a reliable automated procedure (Nexes, Ventana).

TIMP-2 expression was lower in grade 3 endometrial cancers than in grade 1 and 2 samples. Moreover, low TIMP-2 expression correlated with the depth of myometrial invasion, lymphovascular space involvement and lymph node metastasis. A combination of low TIMP-2 and high MMP-2 expression identified a subgroup of women at high risk of aggressive endometrial carcinoma. These results are in line with those of a recent microarray gene expression profiling study of endometrial cancers, showing that TIMP-2 is down-regulated in high-grade tumours [45]. We also found a correlation between low TIMP-1 expression and both lymphovascular space involvement and recurrence. The few available data on TIMP-2 and TIMP-1 expression in endometrial cancers show an increase in TIMP mRNA or protein expression with histological grade [29, 32, 46]. Nevertheless, our results are in keeping with those observed in hepatocellular [47, 48], gallbladder [49], colorectal [50] and breast cancers [51], showing that TIMP-2 expression declines as tumour invasiveness increases. Our results also confirm those of Moser et al. [34] showing a negative correlation between MMP-2 and TIMP-2 expression in an immunohistochemical study. Together, these data show that the effects of MMPs and their inhibitors depend on their relative proportions in local microenvironments [52, 53]. However, TIMPs may directly modulate cell growth in an MMP-independent fashion [54]. It should also be noted that TIMP-2 has other roles, such as MMP-2 inhibition. Low levels of TIMP-2 activate MMP-2 through MT1-MMP, whereas high levels of TIMP-2 inhibit MMP-2 [55].

In normal endometrium, MMP-2 was expressed throughout the menstrual cycle, with strong epithelial cell expression during the proliferative phase and strong stromal cell expression during the secretory phase. These results confirm the differential expression of MMPs and TIMPs during the menstrual cycle, pointing to hormonal regulation [26–28]. In contrast to MMP-2, relatively few data are available on epithelial MMP-7 expression in normal endometrium. We observed strong epithelial MMP-7 expression in the proliferative phase, in keeping with the role of MMP-7 in degrading luminal debris and facilitating tissue remodelling during the early and mid-proliferative phases, and progesterone control of MMP-7 expression [26, 56, 57]. Bruner-Tran et al. [58] suggested that the ability of progesterone to inhibit endometrial MMP-7 expression required the local action of TGF β . In addition to growth factors, MMP activity is regulated by cytokines and angiogenic factors [7, 52, 56]. We found no variation in epithelial MMP-9 expression between the proliferative and secretory phases. No attempt was made to evaluate MMP-9 expression during menstruation. Our results are partly in line with those of Goffin et al. [26] showing the pivotal role of MMP-9, with an increase in mRNA levels during menstruation but low expression in both the proliferative and secretory phases.

We found no variation in TIMP-1 expression by endometrial epithelial cells during the menstrual cycle. TIMP-1 expression by endometrial stromal cells was higher in the proliferative phase than in the secretory phase. Stronger epithelial TIMP-2 expression was noted in the proliferative phase, while stromal expression did not vary. Therefore, our results support sequential MMP and TIMP expression during the menstrual cycle.

In addition to the MMPs and TIMPs examined here, recent studies underline the role of other MMPs such as MMP-26 in tumour progression. By cleaving and inactivating the serpin α 1-antitrypsin, MMP-26 promotes matrix destruction in estrogen-dependent tumours and thus contributes to malignant progression [59, 60].

Finally, interaction and co-operation between the stromal and epithelial compartments seem to be crucial for the invasion process [52]. Indeed, *in vitro*, MMPs have been shown to be synthesised and then translocated from stromal cells to epithelial cells under paracrine control involving integrins [38].

In conclusion, our results support the involvement of MMPs and TIMPs in endometrial carcinogenesis, as their expression profiles differ in hyperplastic endometrium with and without atypia, and in endometrial carcinomas. Moreover, MMP-2 and TIMP-2 expression profiles define a subgroup of endometrial cancers with a high risk of local and distant spread, suggesting they may have prognostic potential.

references

1. Raza SL, Cornelius LA. Matrix metalloproteinases: pro- and anti-angiogenic activities. *J Investigative Dermatol Symp Proceed* 2000; 5: 47–54.
2. Woessner JF. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB J* 1991; 5: 2145–2154.
3. Basset P, Bellocq JP, Wolf C. A novel metalloproteinase gene specifically expressed in stromal cells of breast carcinomas. *Nature* 1990; 348: 699–704.

4. Birkedal-Hansen H, Moore WG, Bodden MK et al. Matrix metalloproteinases: a review. *Crit Rev Oral Biol Med* 1993; 4: 197–250.
5. Goldberg GI, Wilhelm SM, Kroneberger A et al. Human fibroblast collagenase. Complete primary structure and homology to an oncogene transformation-induced rat protein. *J Biol Chem* 1986; 261: 6600–6605.
6. Hasty KA, Jefferey JJ, Hibbs MS. The collagen substrate specificity of neutrophil collagenase. *J Biol Chem* 1987; 262: 48–52.
7. Van den Steen PE, Opendakker G, Wormald MR et al. Matrix remodelling enzymes, the protease cascade and glycosylation. *Biochimica et Biophysica Acta* 2001; 1528: 61–73.
8. Hibbs MS, Hoidal JR, Kang AH. Expression of a metalloproteinase that degrades native type V collagen and denatured collagen by cultured human alveolar macrophages. *J Clin Invest* 1987; 80: 1644–1650.
9. Wilhelm SM, Collier IE, Marmer BL et al. SV40-transformed human lung fibroblasts secrete a 92kDa type IV collagenase which is identical to that secreted by normal human macrophages. *J Biol Chem* 1989; 264: 17213–17221.
10. Wętcowicz-Praga SM, Dickson RB, Hawkins MJ. Matrix metalloproteinase inhibitors. *Invest New Drugs* 1997; 15: 61–75.
11. Ray JM, Stetler-Stevenson WG. The role of matrix metalloproteinases and their inhibitors in tumour invasion, metastasis and angiogenesis. *Eur Respir J* 1994; 7: 2062–2072.
12. Rodgers W. Matrix metalloproteinases and carcinogenesis. *Hum Pathol* 1999; 30: 363–364.
13. Chambers AF, Matrisian LM. Changing views of the role of matrix metalloproteinases in metastasis. *J Natl Cancer Inst* 1997; 89: 1260–1270.
14. Rose PG. Endometrial carcinoma. *N Engl J Med* 1996; 335: 640–649.
15. Prat J. Prognostic parameters of endometrial carcinoma. Prognostic parameters of endometrial carcinoma. *Hum Pathol* 2004; 35: 649–662.
16. Mutter GL and The Endometrial Study Group. Endometrial intraepithelial neoplasia (EIN): will it bring order to chaos. *Gynecol Oncol* 2000; 76: 287–290.
17. Sherman ME. Theories of endometrial carcinogenesis: a multidisciplinary approach. *Mod Pathol* 2000; 13: 295–308.
18. Inoue M. Current molecular aspects of the carcinogenesis of the uterine endometrium. *Int J Gynecol Cancer* 2001; 11: 339–348.
19. Jovanovic AS, Boynton KA, Mutter GL. Uteri of women with endometrial carcinoma contain a histopathologic spectrum of monoclonal putative precancers, some with microsatellite instability. *Cancer Research* 1996; 56: 1917–1921.
20. Mutter GL, Boynton KA, Faquin WC et al. Allelotype mapping of unstable microsatellites establishes direct lineage continuity between endometrial precancers and cancer. *Cancer Research* 1996; 56: 4463–4466.
21. Leblanc M, Poncelet C, Soriano D et al. Alteration of CD44 and cadherins expression: possible association with augmented aggressiveness and invasiveness of endometrial carcinoma. *Virchows Arch* 2001; 438: 78–85.
22. Ioffe OB, Papadimitriou JC, Drachenberg CB. Correlation of proliferation indices, apoptosis, and related oncogene expression (bcl-2 and c-erbB-2) and p53 in proliferative, hyperplastic, and malignant endometrium. *Hum Pathol* 1998; 29: 1150–1159.
23. Niemann TH, Trgovac TL, McCaughey VR, Vaccarella L. Bcl-2 expression in endometrial hyperplasia and carcinoma. *Gynecol Oncol* 1996; 63: 318–322.
24. Vassileva V, Millar A, Briollais L et al. Apoptotic and growth regulatory genes as mutational targets in mismatch repair deficient endometrioid carcinomas of young patients. *Oncol Reprod* 2004; 11: 931–937.
25. Bullett C, Jasonni VM, Polli V et al. Basement membrane in human endometrium: possible role of proteolytic enzymes in developing hyperplasia and carcinoma. *Ann NY Acad Sci* 1991; 622: 376–382.
26. Goffin F, Munaut C, Frankenne F et al. Expression pattern of metalloproteinases and tissue inhibitors of matrix-metalloproteinases in cycling human endometrium. *Biol Reprod* 2003; 69: 976–984.
27. Kokorine I, Marbaix E, Henriot P et al. Focal cellular origin and regulation of interstitial collagenase (matrix metalloproteinase-1) are related to menstrual breakdown in the human endometrium. *J Cell Sci* 1996; 109 (Pt 8): 2151–2160.
28. Soini Y, Alarikkola E, Auto-Harmainen H. Expression of messenger RNAs for metalloproteinases 2 and 9, type IV collagen, and laminin in nonneoplastic and neoplastic endometrium. *Hum Pathol* 1997; 28: 220–226.
29. Määttä M, Soini Y, Liakka A, Auto-Harmainen H. Localization of MT1-MMP, TIMP-1, TIMP-2 and TIMP-3 messenger RNA in normal, hyperplastic and neoplastic endometrium. Enhanced expression by endometrial carcinomas is associated with low differentiation. *Am J Clin Pathol* 2000; 114: 402–411.
30. Aglund A, Rauvala M, Puistola U et al. Gelatinases A and B (MMP-2 and MMP-9) in endometrial cancer – MMP-9 correlates to the grade and the stage. *Gynecol Oncol* 2004; 94: 699–704.
31. Di Nezza LA, Misajon A, Zhang J et al. Presence of active gelatinases in endometrial carcinoma and correlation of matrix metalloproteinase expression with increasing tumor grade and invasion. *Cancer* 2002; 94: 1466–1475.
32. Guo W, Chen G, Zhu C, Wang H. Expression of matrix metalloproteinase-2, -9 and its tissue inhibitor-1, -2 in endometrial carcinoma. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi* 2002; 37: 604–607.
33. Uzan C, Cortez A, Dufouret C et al. Eutopic endometrium and peritoneal, ovarian and bowel endometriotic tissues express a different profile of matrix metalloproteinases -2, -3, and -11, and of tissue inhibitor metalloproteinases -1 and -2. *Virchows Arch* 2004; 445: 603–609.
34. Moser PL, Hefler L, Tempfer C et al. Immunohistochemical detection of matrix metalloproteinases (MMP) 1 and 2, and tissue inhibitor of metalloproteinase 2 (TIMP 2) in stage I and II endometrial cancer. *Anticancer Res* 1999; 19: 2365–2368.
35. Sakata K, Shigemasa K, Nagai N, Ohama K. Expression of matrix metalloproteinases (MMP-2, MMP-9, MT1-MMP) and their inhibitors (TIMP-1 and TIMP-2) in common epithelial tumors of the ovary. *Int J Oncol* 2000; 17: 673–681.
36. Benedet JL, Bender H, Jones H 3rd et al. FIGO staging classifications and clinical practice guidelines in the management of gynaecologic cancers. FIGO committee on Gynecologic Oncology. *Int J Gynecol Obstet* 2000; 70: 209–262.
37. Tamakoshi K, Kikkawa F, Nawa A et al. Characterization of extracellular matrix degrading proteinase and its inhibitor in gynaecologic cancer tissues with clinically different metastatic form. *Cancer* 1995; 76: 2565–2571.
38. Park DW, Ryu HS, Choi DS et al. Localization of matrix metalloproteinases on endometrial cancer cell invasion in vitro. *Gynecol Oncol* 2001; 82: 442–449.
39. Ueno H, Yamashita K, Azumano I et al. Enhanced production and activation of matrix metalloproteinase-7 (matrilysin) in human endometrial carcinomas. *Int J Cancer* 1999; 84: 470–477.
40. Wang FO, So J, Reierstad S, Fishman DA. Matrilysin (MMP-7) promotes invasion of ovarian cancer cells by activation of progelatinase. *Int J Cancer* 2005; 114: 19–31.
41. Inoue Y, Abe K, Obata K et al. Immunohistochemical studies on matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and type IV collagen in endometrial carcinoma. *J Obstet Gynaecol Res* 1997; 23: 139–145.
42. Iurlaro M, Loverro G, Vacca A et al. Angiogenesis extent and expression of matrix metalloproteinase -2 and -9 correlate with upgrading and myometrial invasion in endometrial carcinoma. *Eur J Clin Invest* 1999; 29: 793–801.
43. Leong AS-Y. Quantitation in Immunohistochemistry: fact or fiction? *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2004; 12: 1–7.
44. Wiegand S, Dünne AA, Müller HH et al. Metaanalysis of the significance of Matrix Metalloproteinases for lymph node disease in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer* 2005; 104: 94–100.
45. Ferguson SE, Olshen AB, Viale A et al. Gene expression profiling of tamoxifen-associated uterine cancers: evidence for two molecular classes of endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol* 2004; 92: 719–725.
46. Laird SM, Dalton CF, Okon MA et al. Metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP-1) in endometrial flushings from pre- and post-menopausal women and from women with endometrial carcinoma. *J Reprod Fertil* 1999; 115: 225–232.
47. Giannelli G, Bergamini C, Marinacci F et al. Clinical role of MMP-2/TIMP-2 imbalance in hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* 2002; 97: 425–431.
48. Xiao M, Zhou NX, Huang ZQ et al. The ratio of MMP-2 to TIMP-2 in hilar cholangiocarcinoma: a semi-quantitative study. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2004; 3: 599–602.
49. Fan YZ, Zhang JT, Yang HC, Yang YQ. Expression of MMP-2, TIMP-2 protein and the ratio of MMP-2/TIMP-2 in gallbladder carcinoma and their significance. *World J Gastroenterol* 2002; 8: 1138–1143.

50. Curran S, Dundas SR, Buxton J et al. Matrix metalloproteinase/tissue inhibitors of matrix metalloproteinase phenotype identifies poor prognosis colorectal cancers. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 8229–8234.
51. Nakopoulou L, Katsarou S, Giannopoulou I et al. Correlation of tissue inhibitor of metalloproteinase-2 with proliferative activity and patients survival in breast cancer. *Mod Pathol* 2002; 15: 26–34.
52. Polette M, Nawrocki-Raby B, Gilles C et al. Tumour invasion and matrix metalloproteinases. *Critical Rev Oncol Hematol* 2004; 49: 179–186.
53. Goffin F, Franckne F, Bellard A et al. Human endometrial epithelial cells modulate the activation of gelatinase a by stromal cells. *Gynecol Obstet Invest* 2002; 53: 105–111.
54. Li GY, Fridman R, Kim HRC. Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 inhibits apoptosis of human breast epithelial cells. *Cancer Res* 1999; 59: 6267–6275.
55. Zhang J, Hamton AL, Nie G, Salmons LA. Progesterone inhibits activation of latent matrix metalloproteinase (MMP)-2 by membrane-type 1 MMP: enzymes co-ordinately expressed in human endometrium. *Biol Reprod* 2000; 62: 85–94.
56. Salomonsen LA, Zhang J, Hampton A, Lathbury L. Regulation of matrix metalloproteinases in human endometrium. *Hum Reprod* 2000; 15 (Suppl 3): 112–119.
57. Wilson CL, Matrisian LM. An epithelial matrix metalloproteinase with potentially novel functions. *Int J Biochem* 1996; 28: 123–136.
58. Bruner-Tran KL, Eisenberg E, Yeaman GR et al. Steroid and cytokine regulation of metalloproteinase expression in endometriosis and the establishment of experimental endometriosis in nude mice. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 4782–4711.
59. Li W, Savinov AY, Rozanov DV et al. Matrix metalloproteinase-26 is associated with estrogen-dependent malignancies and targets α 1-Antitrypsin Serpin. *Cancer Res* 2004; 64: 8657–8865.
60. Zhao YG, Xiao AZ, Newcomer RG et al. Activation of progelatinase B by endometase/matrilysin-2 promotes invasion of human prostate cancer cells. *J Biol Chem* 2003; 17: 15056–15064.

Métalloprotéases et inhibiteurs tissulaires des métalloprotéases dans les cancers de l'endomètre.

Article 2 :

Endometrial tumor invasiveness is related to metalloproteinase 2 and tissue inhibitor of metalloproteinase 2 expressions.

O. Graesslin, A. Cortez, C. Uzan, P. Birembaut, C. Quéreux, E. Daraï.

Int J Gynecol Cancer 2006; 16 : 1911-7.

.

L'objectif de ce travail était d'évaluer l'expression de MMP-2, -7 et -9 et de TIMP-1, et -2 dans les cancers endométrioides et séreux de l'endomètre et d'analyser leur corrélation aux facteurs pronostiques cliniques et histologiques.

Article 2.

L'objectif de ce travail était de déterminer l'expression de MMP-2, MMP-7, et MMP-9 et des inhibiteurs tissulaires des métalloprotéases TIMP-1 and TIMP-2 dans des cancers endométrioïdes et séreux de l'endomètre et d'analyser leur corrélation éventuelle aux facteurs pronostics cliniques et histologiques. 50 prélèvements tissulaires inclus en paraffine ont été analysés en immunohistochimie en utilisant des anticorps monoclonaux. Les tumeurs ont été regroupées selon la classification de la FIGO. L'analyse du marquage immunohistochimique a été confrontée aux données cliniques et histologiques.

Résultats : l'analyse semi-quantitative de l'expression de ces MMPs et TIMPs a montré une différence significative de l'expression de TIMP-2 ($p = 0.03$) et de MMP-9 ($p = 0.05$) en fonction du type histologique. L'expression de MMP-2 augmentait significativement avec l'accroissement du grade histologique alors que celle de TIMP-2 diminuait significativement ($p = 0.0007$ et $p = 0.0001$ respectivement). L'expression de MMP-2 était corrélée à l'envahissement ganglionnaire ($p = 0.04$) alors que l'expression de TIMP-2 était corrélée à la profondeur de l'envahissement myométrial ($p = 0.01$), à l'existence d'emboles lymphovasculaires ($p = 0.02$) et à l'envahissement ganglionnaire ($p = 0.0003$).

Conclusion : ces résultats montrent l'implication des MMPs et TIMPs dans les processus de croissance et d'invasion tumorales dans le cancer de l'endomètre. Un niveau d'expression élevé de MMP-2 et faible de TIMP-2 étaient associés à un risque important d'extension à distance de cette pathologie.

Endometrial tumor invasiveness is related to metalloproteinase 2 and tissue inhibitor of metalloproteinase 2 expressions

O. GRAESSLIN*†‡, A. CORTEZ*†, C. UZAN†, P. BIREMBAUT§,
C. QUEREUX‡ & E. DARAI†||

*Service d'Anatomie Pathologique, Hôpital Tenon, AP-HP, Paris, France; †UPRES EA 2396 UFR Saint-Antoine, Université Pierre et Marie Curie, Paris VI, France; ‡CHU Reims, Service de Gynécologie, Institut Mère Enfant Alix de Champagne, §CHU Reims, Service d'Anatomie Pathologique, INSERM UMR-S 514, Laboratoire Pol Bouin, Reims, France; and ||Service de Gynécologie, Hôpital Tenon, AP-HP, Paris, France

Abstract. Graesslin O, Cortez A, Uzan C, Birembaut P, Quereux C, Darai E. Endometrial tumor invasiveness is related to metalloproteinase 2 and tissue inhibitor of metalloproteinase 2 expressions. *Int J Gynecol Cancer* 2006.

Matrix metalloproteinase (MMPs) expression has been linked to gynecological tumor aggressiveness. The objective of this study was to determine MMP-2, MMP-7, and MMP-9 and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP)-1 and TIMP-2 expression in endometrial malignancies and their relation to clinical and histologic parameters. Formalin-fixed, paraffin-embedded tumor samples from 50 patients with endometrial carcinoma treated between 1999 and 2004 were stained with specific monoclonal antibodies. The tumors were grouped according to the FIGO classification. The staining results were compared to histologic and clinical data. Semiquantitative analysis of MMP and TIMP expression showed a significant difference in TIMP-2 expression according to the histologic subtype ($P = 0.03$) and also a trend towards a difference in MMP-9 expression ($P = 0.05$). MMP-2 expression increased and TIMP-2 expression fell as the histologic grade increased ($P = 0.0007$, $P < 0.0001$, respectively). MMP-2 expression correlated with lymph node metastasis ($P = 0.04$), while TIMP-2 expression correlated with the depth of myometrial invasion ($P = 0.01$), vasculolymphatic space involvement ($P = 0.02$), and lymph node metastasis ($P = 0.0003$). These results support the involvement of MMPs and TIMPs in endometrial tumor growth and progression. High MMP-2 and low TIMP-2 expression were the most potent markers of endometrial tumors with a high risk of local and distant spread.

KEYWORDS: endometrial cancer, immunohistochemistry, metalloproteinases, metalloproteinase inhibitors, tumor progression.

Matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) are involved in extracellular matrix turnover⁽¹⁻⁵⁾. MMPs belong to a family of zinc-dependent endopeptidases and are classified according to their substrate specificity (stromelysins, collagenases, gelatinases, and membrane-type MMPs)⁽⁶⁻⁸⁾. Enhanced MMP expression correlates with the malignant phenotype of human cancer⁽⁹⁻¹³⁾. Endometrial cancer is the most common female genital tract malignancy mostly affecting postmenopausal

women. Although the overall prognosis of women with endometrial cancer is relatively good (5-year survival rate up to 80%), some women are at an increased risk of early recurrence. Tumor type (endometrioid, papillary serous, or clear cell), histologic grade, myometrial invasion, vascular space involvement, and lymph node metastasis are the most potent prognostic factors⁽¹⁴⁾. However, despite improvements in imaging techniques, these factors can only be assessed after surgery.

Recently, Soini *et al.*⁽¹⁵⁾ found MMP-2 and MMP-9 overexpression in hyperplastic endometrium and endometrial cancer, and both abnormalities were subsequently linked to histologic grade and myometrial invasion^(16,17). Aglund *et al.*⁽¹⁸⁾ found that MMP-9

Address correspondence and reprint requests to: Prof Emile Darai, MD, PhD, Service de Gynécologie-Obstétrique, Hôpital Tenon, 4 rue de la Chine, 75020 Paris, France. Email: emile.darai@tnn.ap-hop-paris.fr

doi:10.1111/j.1525-1438.2006.00717.x

© 2006, Copyright the Authors
Journal compilation © 2006, IGCS

expression was associated with FIGO stage and histologic grade. Only one report has focused on MMP-7 expression in endometrial cancer⁽¹⁹⁾; the authors found that MMP-7 overexpression correlated with clinical stage and lymph node metastasis. In contrast to MMP-2 and MMP-9, few data are available on other MMPs and TIMPs in endometrial cancer^(16,19,20-22).

The aims of this study were to evaluate the expression of MMP-2, MMP-7, and MMP-9 and TIMP-1 and TIMP-2 in 50 endometrial malignancies and to correlate the results with clinical and histologic characteristics.

Materials and methods

From 1999 to 2004, tissue samples were obtained from 50 women undergoing surgery for endometrial cancer in the Gynecology Departments of Tenon Hospital, Paris and Institut Mère Enfant Alix de Champagne, Reims, France. None of the patients received chemotherapy or radiotherapy before surgery, which consisted of total hysterectomy, bilateral salpingo-oophorectomy, peritoneal cytology, and pelvic and para-aortic lymph node sampling as necessary. Two pathologists reviewed all the tumors to confirm the diagnosis and to determine histologic characteristics.

The 50 formalin-fixed, paraffin-embedded tumor samples were from 38 patients with endometrioid carcinoma, 5 patients with serous papillary and clear cell type endometrial tumors, and 7 patients with tamoxifen-induced endometrial tumors. The histologic grade, the depth of myometrial invasion, and the clinical stage were classified as recommended by the FIGO⁽²³⁾. Epidemiologic and histologic features of the 50 patients are shown in Table 1.

Immunohistochemistry

Antibodies

Purified mouse monoclonal antibodies against human MMP-2 (gelatinase-A, Ab-2, clone 17B11, Novocastra Laboratories Ltd, Newcastle, UK), human MMP-7 (matrilysin, Ab-3, clone ID2, Calbiochem, Oncogene Research Products, Cambridge, UK), human MMP-9 (gelatinase-B, Ab-3, clone 56 2A4, Calbiochem, Oncogene Research Products), human TIMP-1 (Ab-4, clone 3A4, Novocastra Laboratories Ltd), and human TIMP-2 (Ab-2, clone 6F6a, Novocastra Laboratories Ltd) were used as primary antibodies. Anti-MMP-2, anti-MMP-9, and anti-MMP-7 recognize both latent and active forms of MMP. Anti-MMP-9 does not react with MMP-1, MMP-2, MMP-3, or MMP-13.

Table 1. Clinical and histologic characteristics of the 50 patients with endometrial cancers

Endometrial cancers	Number of patients (%)
Stages	
I	29 (58)
II	6 (12)
III	13 (26)
IV	2 (4)
Histologic grade	
1	20 (40)
2	14 (28)
3	16 (32)
Depth of myometrial invasion	
M0 (no invasion)	6 (12)
M1 (<50%)	21 (42)
M2 (>50%)	23 (46)
Lymph node metastasis	
Yes	11 (32.4)
No	23 (67.6)
Vascular/lymphatic invasion	
Yes	20 (40)
No	30 (60)
Recurrence	
Yes	6 (12)
No	44 (88)
Death (from endometrial cancer)	2 (4)

Immunohistochemical technique

Tissues were immediately fixed in formalin (10%) and then processed as paraffin blocks. Four-micron-thick sections of formalin-fixed tissues were deparaffinated in xylene and rehydrated through a graded series of ethanol solutions. Sections were immunostained using the Ventana Nexes automated immunohistochemistry system (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ). Prior to MMP-2, MMP-9, TIMP-1, and TIMP-2 staining, an antigen retrieval step was used, combined with a high-temperature antigen-unmasking technique (DAKO[®] Target Retrieval Solution; 100°C, 30 min). For MMP-7, antigen unmasking was achieved with proteinase K. The automated procedure is based on an indirect biotin-avidin system with a universal biotinylated immunoglobulin as secondary antibody, diaminobenzidine as substrate, and hematoxylin as counterstain. For MMP-7 and MMP-9, in addition to the automated procedure, a Ventana amplification kit was used (Ventana Medical Systems[®]). Anti-MMP-2 and anti-MMP-9 antibodies were used at a dilution of 1/10 (both 10 µg/mL), anti-MMP-7 and anti-TIMP-1 were used at a dilution of 1/50 (4 µg/mL and 2 µg/mL, respectively), and anti-TIMP-2 was used at a dilution of 1/15 (6.5 µg/mL).

Positive controls for MMP-2, MMP-7, and MMP-9 and TIMP-1 and TIMP-2 were sections of bronchial tissue, ovarian cancer, normal secretory phase endometrium,

breast cancer, and placenta, respectively. For negative control, the primary antibody was replaced by an irrelevant non-immune mouse antibody of the same immunoglobulin G subtype.

Semiquantitative immunohistochemical analysis

Positive immunostaining was scored semiquantitatively by two independent observers. For semiquantitative analysis of tumor cells, the percentage of positive cells was noted for approximately 1000 neoplastic cells per slide, subdivided into ten selected fields at $\times 400$ magnification. Intensity scores of 0 (no staining)–3 (maximal staining intensity) were assigned. A HSCORE was calculated as followed; $HSCORE = \sum Pi (i + 1)$, where i is the intensity of the stained epithelium (1 = weak, 2 = moderate, and 3 = strong) and Pi is the percentage of stained epithelial cells for each intensity varying from 0% to 100%. The intensity score was multiplied by the percentage of positive cells yielding a total staining score of 0 (minimum)–300 (maximum). Variations between the two observers were below 5%.

Statistical analysis

We used the Chi-square test for categoric variables and the Kruskal–Wallis and Mann–Whitney U tests for continuous variables. Correlations with MMP and TIMP expression were evaluated by using Spearman's test. P values below 0.05 were considered significant.

Results

Qualitative and semiquantitative expression of MMPs and TIMPs in endometrial cancers

MMP-2, MMP-7, and MMP-9 and TIMP-1 and TIMP-2 staining showed cytoplasmic expression in endometrial cancer cells (Table 2; Fig. 1). In stromal com-

partment, staining intensity was stronger close to endometrial cancer cells. MMP-2 was immunostained in the fibroblasts and endothelial cells in the tumors. MMP-7 was not detected in stromal cells. MMP-9 was predominantly immunolocalized to the inflammatory cells of the stroma. TIMP-1 and TIMP-2 proteins were also present in the stromal compartment at various degrees.

The mean percentage of TIMP-2-labeled cells differed according to the histologic type ($P = 0.01$). This difference was significant between endometrioid and serous and clear cell carcinomas ($P = 0.004$) but not between endometrioid and tamoxifen-induced carcinomas or between serous and clear cell and tamoxifen-induced carcinomas. The percentage of cells staining positively for MMP-2, MMP-7, and MMP-9 and TIMP-1 did not differ according to the histologic type.

The mean TIMP-2 immunostaining score differed significantly according to the histologic type ($P = 0.03$). This difference was significant between endometrioid and serous and clear cell carcinomas ($P = 0.03$) but not between endometrioid and tamoxifen-induced carcinomas or between serous and clear cell and tamoxifen-induced carcinomas. A trend toward a difference in the MMP-9 immunostaining score was found according to the histologic type ($P = 0.05$). The immunostaining scores for MMP-2, MMP-7, and TIMP-1 did not differ according to the histologic type.

A correlation was found between the percentage of labeled cells and the HSCORE for MMP-2 ($P < 0.0001$, $\rho = 0.858$), MMP-7 ($P < 0.0001$, $\rho = 0.820$), MMP-9 ($P = 0.002$, $\rho = 0.465$), TIMP-1 ($P < 0.0001$, $\rho = 0.930$), and TIMP-2 ($P < 0.0001$, $\rho = 0.971$; Fig. 2).

Relation between MMP and TIMP expression and histologic and clinical characteristics

The mean \pm standard deviation (SD) percentage of MMP-2-labeled cells in histologic grade 1, 2, and 3 endometrial cancers was 33.7 ± 27.2 , 67.7 ± 27.4 , and

Table 2. Semiquantitative MMP-2, -7, and -9 and TIMP-1 and -2 expression in endometrial cancer, based on the mean percentage of labeled cells, according to the histologic type

	MMP-2	MMP-7	MMP-9	TIMP-1	TIMP-2
Endometrioid carcinomas ($n = 38$)					
Mean value \pm SD	53.3 \pm 59.9	74.3 \pm 18.8	93.8 \pm 7.3	64.9 \pm 22.6	46.9 \pm 26.5
Median (range)	55 (0–90)	80 (30–100)	95 (70–100)	70 (10–92)	50 (0–90)
Serous, clear cell carcinomas ($n = 5$)					
Mean value \pm SD	65.0 \pm 27.1	83.0 \pm 4.5	94.0 \pm 8.9	71.0 \pm 30.1	10.0 \pm 7.9
Median (range)	75 (25–90)	80 (80–90)	100 (80–100)	80 (20–95)	10 (0–20)
Tamoxifen-induced carcinomas ($n = 7$)					
Mean value \pm SD	48.6 \pm 40.5	61.7 \pm 19.7	93.3 \pm 5.2	70.0 \pm 18.5	30.0 \pm 26.9
Median (range)	60 (5–92)	62.5 (40–90)	95 (85–100)	70 (40–100)	15 (0–70)

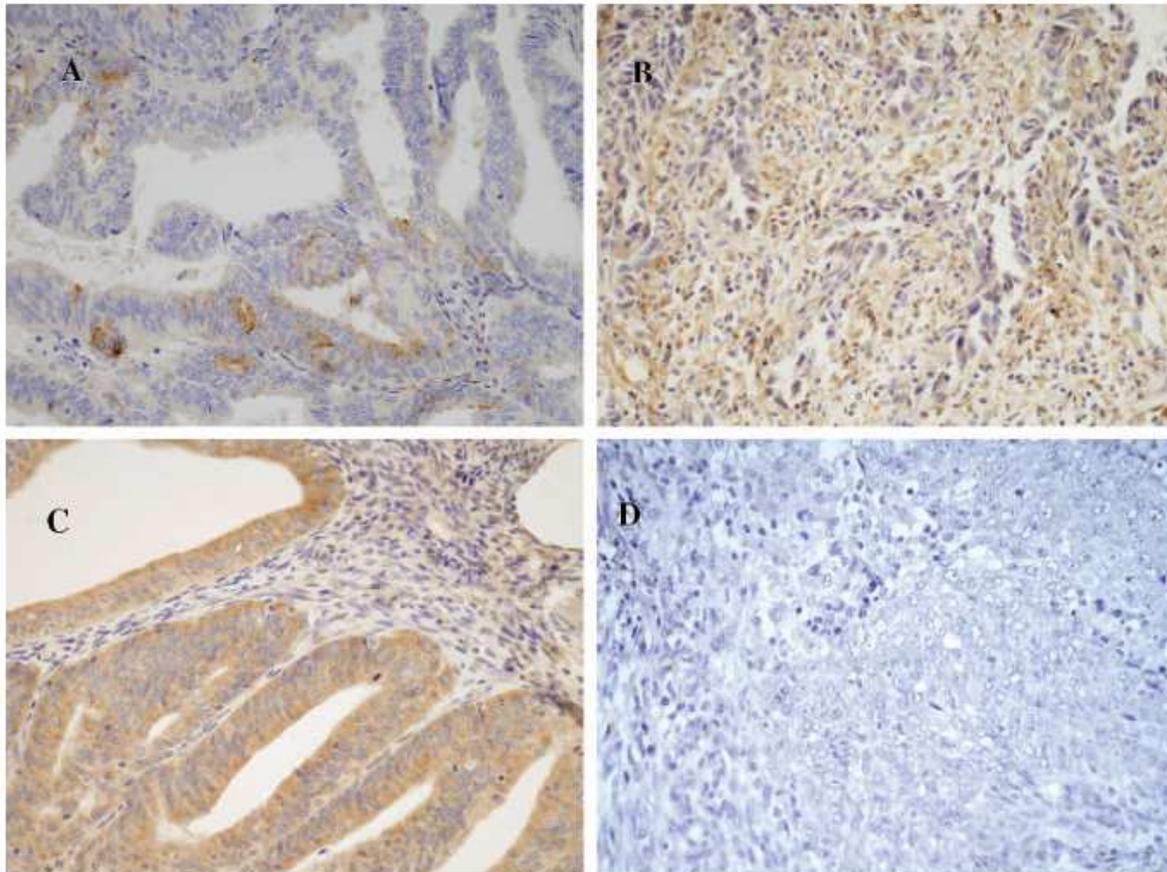


Figure 1. Representative samples of endometrial cancers showing a low cytoplasmic immunostaining for MMP-2 in a grade 1 endometrioid carcinoma (A) and a high immunostaining in a grade 3 serous carcinoma (B). In contrast, a negative immunostaining for TIMP-2 in a grade 3 endometrioid cancer (D) and a high cytoplasmic immunostaining in a grade 1 endometrioid cancer (C).

69.1 ± 22.6, respectively. MMP-2 expression increased with the histologic grade ($P = 0.0007$). The difference was significant between grade 1 and 2 ($P = 0.0008$) and between grade 1 and 3 ($P = 0.0003$) but not between grade 2 and 3 (Table 3).

The mean percentage ± SD of MMP-2-labeled cells in patients with and without lymph node involvement was 70.3 ± 23.9 and 44.6 ± 33.3, respectively ($P = 0.03$). High MMP-2 expression tended to correlate with myometrial invasion ($P = 0.06$). No relation was observed between the MMP-2 expression and the FIGO stage, lymphovascular space involvement, recurrence, or death from endometrial cancer.

The mean percentage ± SD of TIMP-2-labeled cells in histologic grade 1, 2, and 3 endometrial cancers was 55.7 ± 22.1, 47.0 ± 25.5 and 12.1 ± 14.2, respectively. TIMP-2 expression fell as histologic grade increased ($P < 0.0001$). The difference was significant between grade 1 and 3 ($P = 0.0001$), and between

grade 2 and 3 ($P < 0.0001$) but not between grade 1 and 2.

The mean percentage ± SD of TIMP-2-labeled cells in patients with no myometrial invasion and invasion of less or more than 50% of the myometrium was 52.9 ± 20.6, 51.3 ± 28.7 and 28.3 ± 23.9, respectively ($P = 0.01$). This difference was significant between patients with no myometrial invasion and those with >50% invasion ($P = 0.02$) and between patients with <50% invasion and >50% invasion ($P = 0.006$) but not between patients with no invasion and those with <50% invasion.

The mean percentage ± SD of TIMP-2-labeled cells in patients with and without lymphovascular space involvement was 26.7 ± 23.3 and 51.8 ± 26.6, respectively ($P = 0.001$). The mean ± SD percentage of TIMP-2-labeled cells in patients with and without lymph node involvement were 19.1 ± 17.6 and 56.5 ± 23.5, respectively ($P < 0.0001$). No relation was found

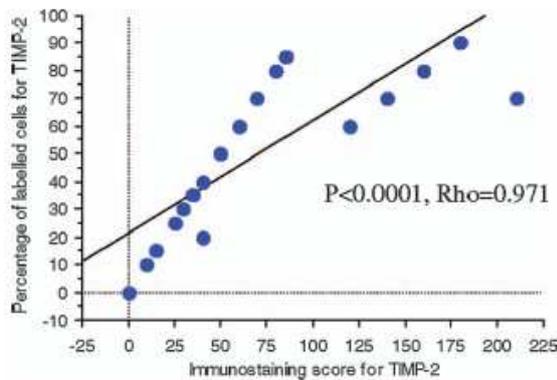


Figure 2. Correlation between percentage of labeled cells and immunohistochemical HSCORE for TIMP-2.

between TIMP-2 expression and the FIGO stage, recurrence, or death from endometrial cancer.

No relation was found between MMP-7, MMP-9, and TIMP-1 expression and histologic grade, myometrial invasion, FIGO stage, recurrence, or death from endometrial cancer. No relation was found between lymphovascular space involvement and MMP-9 or TIMP-1 expression. A trend toward a relation between lymphovascular space involvement and MMP-7 expression was found ($P = 0.05$).

Discussion

This study shows that tumoral MMP-2 and TIMP-2 expression differs according to the histologic grade of endometrial cancer. Moreover, expression of both proteins correlated with the histologic type and with histologic signs of tumor aggressiveness.

MMP-2 expression, based on the percentage of labeled cells, was lower in grade 1 than in both grade

2 and 3 endometrial cancers, with no difference between the latter two grades. These results are in keeping with those obtained in cancers of the stomach⁽²⁴⁾, lung⁽²⁵⁾, and breast⁽²⁶⁾. It is difficult to compare our data with those of previous studies of endometrial cancers, owing to differences in the immunostaining methods. Indeed, Aglund *et al.* considered a sample to be positive when more than 20% of cells were labeled, while Moser *et al.* used "strong and widespread staining" as the positivity criterion^(18,22).

We found that high MMP-2 expression correlated with lymph node metastasis and tended to be associated with myometrial invasion. Our results are in keeping with reports of a relation between MMP-2 expression and local and distant spread of endometrial cancer^(17,27). Nevertheless, as in our study, previous reports have underlined the absence of any relation between MMP-2 expression and the FIGO stage, vascular/lymphatic invasion, and disease-free survival among patients with endometrial cancer^(16,18,22).

TIMP-2 expression was lower in serous and clear cell endometrial carcinoma than in endometrioid and tamoxifen-induced forms. In a review of prognostic factors in endometrial cancers, Prat⁽¹⁴⁾ pointed out that type II (nonestrogen dependent) endometrial tumors, corresponding mainly to serous and clear cell carcinomas, carried a higher mortality than type I (estrogen dependent) forms (mainly endometrioid cancers). Therefore, our data support the differential expression of TIMP-2 in estrogen-dependent and non-estrogen dependent endometrial carcinomas and the low TIMP-2 expression in serous and clear cell endometrial carcinoma could be linked to the aggressiveness of this histologic subtype. Low TIMP-2 expression has been linked to factors of invasiveness in various malignancies⁽²⁸⁻³¹⁾. In our study, we also found a relation between TIMP-2 downregulation in grade 3

Table 3. Relation between clinical and pathologic prognostic factors and MMP and TIMP expression (percentage of labeled cells) in endometrial cancer

Clinicopathologic features	MMP-2	MMP-7	MMP-9	TIMP-1	TIMP-2
Stage (FIGO)	NS	NS	NS	NS	NS
Depth of myometrial invasion	$P = 0.06$	NS	NS	NS	$P = 0.01$
M0 (no invasion) vs M1 (<50%)	NS	NS	NS	NS	NS
M0 vs M2 (>50%)	NS	NS	NS	NS	$P = 0.02$
M1 vs M2	NS	NS	NS	NS	$P = 0.006$
Vascular/lymphatic invasion					
Presence vs absence	NS	$P = 0.05$	NS	NS	$P = 0.02$
Lymph node metastasis					
Presence vs absence	$P = 0.04$	NS	NS	NS	$P = 0.0003$
Recurrence					
Yes vs no	NS	NS	NS	NS	NS

NS, not significant.

endometrial cancers compared with grade 1 and 2 but no difference between grade 1 and 2. These results are in line with those of a recent study based on microarray gene expression profile in endometrial cancers showing that TIMP-2 was downregulated in high-grade tumors⁽³²⁾. Thus, high MMP-2 expression and low TIMP-2 expression together identify a subgroup of endometrial cancers with high invasive potential. These data pointed out that the effects of MMPs and their inhibitors resulting in alterations of proteolytic activities depend on their balance in local microenvironments⁽³³⁾. In endometrial cancers, Moser *et al.* found a negative correlation between MMP-2 and TIMP-2 expression but unrelated to clinical or histologic criteria of poor prognosis⁽²²⁾.

We also found a relation between low TIMP-2 expression and myometrial invasion, lymphovascular space involvement, and lymph node metastasis, whereas Moser *et al.* found no relation between TIMP-2 expression and histologic prognostic factors or overall survival among women with endometrial cancer⁽²²⁾. This apparent discrepancy could be due to the fact that these latter authors based their conclusions solely on qualitative MMP and TIMP expression.

Few data are available on the possible role of MMP-7 in endometrial cancer although MMP-7 (matrilysin) is known to be expressed in head, neck, lung, and ovarian carcinomas^(34–36). Contrary to other MMP family members, MMP-7 lacks the COOH-terminal hemopexin-like domain conferring strong extracellular matrix-degrading activity⁽³⁷⁾. Only one previous study has focused on MMP-7 expression in endometrial cancer and showed a relation between high MMP-7 expression and lymph node metastasis⁽¹⁹⁾. We also found a trend ($P = 0.05$) toward more frequent lymphovascular space involvement in patients with high MMP-7 expression. These results are consistent with the work of Wang *et al.*⁽³⁶⁾ who demonstrated that MMP-7 can also activate progelatinases (proMMP-2 and proMMP-9) and thus facilitate tumor invasion and metastasis.

Apart from decidualized endometrium, Soini *et al.*⁽¹⁵⁾ found no MMP-9 messenger RNA expression in non-neoplastic endometrium, suggesting that MMP-9 could be crucial for invasiveness. Using zymography of uterine lavage fluid and receiver operator characteristics analysis, Lopata *et al.*⁽³⁸⁾ found that MMP-9 overexpression (cutoff >3) had a sensitivity of 98% and a specificity of 91% for endometrial cancer. Moreover, previous reports^(17,27,38) have suggested a relation between MMP-9 overexpression and nodal metastasis. However, despite high MMP-9 immunostaining, we found no relation between MMP-9 expression and histologic prognostic factors. These conflicting results

may be due to the lack of a consensus expression threshold.

In contrast to normal endometrium^(2,39–42), few data are available on TIMP-1 expression in endometrial cancer cells either *in vitro* or *in vivo*^(16,20,21,27). Here, we found that TIMP-1 expression tended to fall as histologic grade rose but without reaching statistical significance. In contrast, Guo *et al.*⁽²⁷⁾ reported that TIMP-1 expression increased with the histologic grade of endometrial adenocarcinomas. Our data are nonetheless in keeping with previous reports of a relation between TIMP-1 downregulation and histologic prognostic factors^(16,20).

Some limitations of the present study have to be underlined. First, we did not perform zymographic analysis reflecting the active form of MMPs and TIMPs, and immunohistochemical analysis and quantitation are controversial^(16,18,19,22,43,44). Second, the sample size of the study population could explain the absence of relation between clinical parameters and some MMPs and TIMPs expressions and could not allowed to evaluate their relevance on survival. Finally, we had a high rate of grade 3 tumors in the serous, clear cell and tamoxifen-induced carcinoma groups. However, immunohistochemical analysis is of particular interest because it can be carried out in formalin-fixed tissue samples that facilitates reproducibility in diagnostic histopathology and allows for an exact location of MMPs⁽⁴⁵⁾. Moreover, the use of an automated procedure in the current study (Ventana, Nexes) allowed reproducible and comparable results. Finally, we used a HSCORE taking into account both the intensity and the percentage of labeled cells. Budwit-Novotny *et al.*⁽⁴⁶⁾ have demonstrated that it was one of the best technique for immunohistochemical quantitation. Lessey *et al.*⁽⁴⁷⁾ have also demonstrated that this type of analysis was associated with low intraobserver and interobserver errors. In addition, we found that semi-quantitative and scoring analyses of MMP and TIMP expression are similarly valid.

In conclusion, our results support the involvement of MMPs and TIMPs in endometrial tumor growth and spread. MMP-2 and TIMP-2 expression together defined a subgroup of endometrial cancers carrying a high risk of local and distant invasion.

References

- 1 Birkedal-Hansen H, Moore WG, Bodden MK *et al.* Matrix metalloproteinases: a review. *Crit Rev Oral Biol Med* 1993;4:197–250.
- 2 Goffin F, Munaut C, Frankenne F *et al.* Expression pattern of metalloproteinases and tissue inhibitors of matrix-metalloproteinases in cycling human endometrium. *Biol Repr* 2003;69:976–84.
- 3 Rodgers W. Matrix metalloproteinases and carcinogenesis. *Hum Pathol* 1999;30:363–4.

- 4 Tamakoshi K, Kikkawa F, Nawa A *et al*. Characterization of extracellular matrix degrading proteinase and its inhibitor in gynaecologic cancer tissues with clinically different metastatic form. *Cancer* 1995;76:2565-71.
- 5 Wojtowicz-Praga SM, Dickson RB, Hawkins MJ. Matrix metalloproteinase inhibitors. *Invest New Drugs* 1997;15:61-75.
- 6 Raza SL, Cornelius LA. Matrix metalloproteinases: pro- and anti-angiogenic activities. *J Invest Dermatol Symp Proc* 2000;5:47-54.
- 7 Van den Steen PE, Opdenakker G, Wormald MR, Dwek RA, Rudd PM. Matrix remodelling enzymes, the protease cascade and glycosylation. *Biochimica et Biophysica Acta* 2001;1528:61-73.
- 8 Woessner JE. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB J* 1991;5:2145-54.
- 9 Chambers AF, Matrisian LM. Changing views of the role of matrix metalloproteinases in metastasis. *J Natl Cancer Inst* 1997;89:1260-70.
- 10 Ray JM, Stetler-Stevenson WG. The role of matrix metalloproteinases and their inhibitors in tumour invasion, metastasis and angiogenesis. *Eur Respir J* 1994;7:2062-72.
- 11 Jones JL, Glynn P, Walker RA. Expression of MMP-2 and MMP-9, their inhibitors and the activator MT1-MMP in primary breast carcinomas. *J Pathol* 1999;189:161-8.
- 12 Maeta H, Ohgi S, Terada T. Protein expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 and tissue inhibitors of metalloproteinase 1 and 2 in papillary thyroid carcinomas. *Virchows Arch* 2001;438:121-8.
- 13 Sakata K, Shigemasa K, Nagai N, Ohama K. Expression of matrix metalloproteinases (MMP-2, MMP-9, MT1-MMP) and their inhibitors (TIMP-1 and TIMP-2) in common epithelial tumors of the ovary. *Int J Oncol* 2000;17:673-81.
- 14 Prat J. Prognostic parameters of endometrial carcinoma. *Hum Pathol* 2004;35:649-62.
- 15 Soini Y, Alarakkola E, Auto-Harmanen H. Expression of messenger RNAs for metalloproteinases 2 and 9, type IV collagen, and laminin in nonneoplastic and neoplastic endometrium. *Hum Pathol* 1997;28:220-6.
- 16 Di Nezza LA, Misajon A, Zhang J *et al*. Presence of active gelatinases in endometrial carcinoma and correlation of matrix metalloproteinase expression with increasing tumor grade and invasion. *Cancer* 2002;94:1466-75.
- 17 Iurlaro M, Loverro G, Vacca A *et al*. Angiogenesis extent and expression of matrix metalloproteinase -2 and -9 correlate with upgrading and myometrial invasion in endometrial carcinoma. *Eur J Clin Invest* 1999;29:793-801.
- 18 Aglund A, Rauvala M, Puistola U *et al*. Gelatinases A and B (MMP-2 and MMP-9) in endometrial cancer—MMP-9 correlates to the grade and the stage. *Gynecol Oncol* 2004;94:699-704.
- 19 Ueno H, Yamashita K, Azumano I, Inoue M, Okada Y. Enhanced production and activation of matrix metalloproteinase-7 (matrilysin) in human endometrial carcinomas. *Int J Cancer* 1999;84:470-7.
- 20 Laird SM, Dalton CF, Okon MA, Bunning RAD, Marshall R, Li TC. Metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP-1) in endometrial flushings from pre- and post-menopausal women and from women with endometrial carcinoma. *J Reprod Fertil* 1999;115:225-32.
- 21 Määttä M, Soini Y, Liakka A, Auto-Harmanen H. Localization of MT1-MMP, TIMP-1, TIMP-2 and TIMP-3 messenger RNA in normal, hyperplastic and neoplastic endometrium. Enhanced expression by endometrial carcinomas is associated with low differentiation. *Am J Clin Pathol* 2000;114:402-11.
- 22 Moser PL, Hefler L, Tempfer C, Neunteufel W, Kieback DG, Gitsch G. Immunohistochemical detection of matrix metalloproteinases (MMP) 1 and 2, and tissue inhibitor of metalloproteinase 2 (TIMP 2) in stage I and II endometrial cancer. *Anticancer Res* 1999;19:2365-8.
- 23 Benedet JL, Bender H, Jones H III, Ngan HY, Pecorelli S. FIGO staging classifications and clinical practice guidelines in the management of gynaecologic cancers. FIGO committee on Gynecologic Oncology. *Int J Gynaecol Obstet* 2000;70:209-62.
- 24 Nomura H, Sato H, Seiki M, Mai M, Okada Y. Expression of membrane-type matrix metalloproteinase in human gastric carcinomas. *Cancer Res* 1995;55:3263-6.
- 25 Tokuraku M, Sato H, Murakami S, Okada Y, Watanabe Y, Seiki M. Activation of the precursor of gelatinase A/72 kDa type IV collagenase/MMP-2 in lung carcinomas correlates with the expression of membrane-type matrix metalloproteinase (MT-MMP) and with lymph node metastasis. *Int J Cancer* 1995;64:355-9.
- 26 Davies B, Miles DW, Happerfield LC *et al*. Activity of type IV collagenases in benign and malignant breast disease. *Br J Cancer* 1993;67:1126-31.
- 27 Guo W, Chen G, Zhu C, Wang H. Expression of matrix metalloproteinase-2, -9 and its tissue inhibitor-1, -2 in endometrial carcinoma. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi* 2002;37:604-7.
- 28 Fan YZ, Zhang JT, Yang HC, Yang YQ. Expression of MMP-2, TIMP-2 protein and the ratio of MMP-2/TIMP-2 in gallbladder carcinoma and their significance. *World J Gastroenterol* 2002;8:1138-43.
- 29 Giannelli G, Bergamini C, Marinosci F *et al*. Clinical role of MMP-2/TIMP-2 imbalance in hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* 2002;97:425-31.
- 30 Xiao M, Zhou NX, Huang ZQ *et al*. The ratio of MMP-2 to TIMP-2 in hilar cholangiocarcinoma: a semi-quantitative study. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2004;3:599-602.
- 31 Uzan C, Cortez A, Dufournet C, Fauvet R, Siffroi JP, Darai E. Eutopic endometrium and peritoneal, ovarian and bowel endometriotic tissues express a different profile of matrix metalloproteinases -2, -3, and -11, and of tissue inhibitor metalloproteinases -1 and -2. *Virchows Arch* 2004;445:603-9.
- 32 Ferguson SE, Olshen AB, Viale A, Awtrey CS, Barakat RR, Boyd J. Gene expression profiling of tamoxifen-associated uterine cancers: evidence for two molecular classes of endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol* 2004;92:719-25.
- 33 Polette M, Nawrocki-Raby B, Gilles C, Clavel C, Birembaut P. Tumour invasion and matrix metalloproteinases. *Crit Rev Oncol Hematol* 2004;49:179-86.
- 34 Heppner KJ, Matrisian LM, Jensen RA, Rodgers WH. Expression of most matrix metalloproteinase members in breast cancer represents a tumor-induced host response. *Am J Pathol* 1996;149:273-82.
- 35 Müller D, Breathnach R, Engelmann A *et al*. Expression of collagenase-related metalloproteinase genes in human lung or head and neck tumors. *Int J Cancer* 1991;48:550-6.
- 36 Wang FQ, So J, Reierstad S, Fishman DA. Matrilysin (MMP-7) promotes invasion of ovarian cancer cells by activation of progelatinase. *Int J Cancer* 2005;114:19-31.
- 37 Wilson CL, Heppner KJ, Labosky PA, Hogan BLM, Matrisian LM. Intestinal tumorigenesis is suppressed in mice lacking the metalloproteinase matrilysin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:1402-7.
- 38 Lopata A, Agresta F, Quinn MA, Smith C, Ostor AG, Salamonsen LA. Detection of endometrial cancer by determination of matrix metalloproteinases in the uterine cavity. *Gynecol Oncol* 2003;90:318-24.
- 39 Goffin F, Franckene E, Beliard A *et al*. Human endometrial epithelial cells modulate the activation of gelatinase a by stromal cells. *Gynecol Obstet Invest* 2002;53:105-11.
- 40 Kokorine I, Marbaix E, Henriot P *et al*. Focal cellular origin and regulation of interstitial collagenase (matrix metalloproteinase-1) are related to menstrual breakdown in the human endometrium. *J Cell Sci* 1996;109(Pt 8):2151-60.
- 41 Salamonsen LA, Zhang J, Hampton A, Lathbury L. Regulation of matrix metalloproteinases in human endometrium. *Hum Reprod* 2000;15(Suppl. 3):112-9.
- 42 Zhang J, Hamton AL, Nie G, Salamonsen LA. Progesterone inhibits activation of latent matrix metalloproteinase (MMP)-2 by membrane-type 1 MMP: enzymes co-ordinately expressed in human endometrium. *Biol Reprod* 2000;62:85-94.
- 43 Liokumovich P, Goldberg I, Davidson B, Gottlieb WH, Zahavi T, Ben Baruch G. Expression of metalloproteinases endometrial stromal sarcoma: immunohistochemical study using image analysis. *J Clin Pathol* 1999;52(Pt 3):198-202.
- 44 Leong AS-Y. Quantitation in Immunohistology: fact or fiction? *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2004;12:1-7.
- 45 Wiegand S, Dünne AA, Müller HH *et al*. Metaanalysis of the significance of matrix metalloproteinases for lymph node disease in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer* 2005;104:94-100.
- 46 Budwit-Novotny A, McCarty KS, Cox EB *et al*. Immunohistochemical analyses of estrogen receptor in endometrial adenocarcinoma using a monoclonal antibody. *Cancer Res* 1986;46:5419-25.
- 47 Lessey BA, Castelbaum AJ, Wolf L *et al*. Use of integrins to date the endometrium. *Fertil Steril* 2000;73:779-87.

Accepted for publication April 24, 2006

Evaluation de P53 et de la ploïdie dans les cancers de l'endomètre.

Article 3 :

Fluorescence in situ hybridization and immunohistochemical analysis of P53 expression in endometrial cancer: prognostic value and relation to ploidy.

**O. Graesslin, S. Chantot-Bastarud, M. Lorenzato, P. Birembaut, C. Quéreux, E. Daraï.
Ann Surg Oncol 2008 ; 15 : 484-492.**

.

L'objectif de ce travail était d'effectuer une analyse comparative de l'expression de p53 par immunohistochimie et par FISH dans le cancer de l'endomètre et de comparer ces caractéristiques à la ploïdie et aux facteurs pronostiques cliniques et histologiques connus.

Article 3.

Notre objectif était de comparer l'expression protéique de p53 par immunohistochimie (IHC) et l'analyse des anomalies génétiques de TP53 évaluées par hybridation in situ en fluorescence (FISH) de 43 cancers endométrioïdes et séreux de l'endomètre, et de comparer ces données à la ploïdie (quantification par analyse d'images) et aux facteurs pronostics cliniques et histologiques connus.

Résultats : 13 des 43 cancers de l'endomètre (30.2%) analysés ont montré une perte d'hétérozygotie pour TP53. La perte d'hétérozygotie de TP53 était associée au type ($p = 0.03$) et au grade ($p = 0.004$) histologiques. L'expression de p53 en IHC quantitative était corrélée au type histologique. Avec un seuil de positivité de p53 en IHC fixé à 10%, la surexpression de p53 était corrélée au type ($p = 0.03$) et au grade ($p = 0.008$) histologiques. Aucune corrélation n'a été établie entre la perte d'hétérozygotie ou l'expression immunohistochimique de p53 et le stade clinique, la profondeur d'invasion myométriale, le statut ganglionnaire, l'existence d'emboles lymphovasculaires, la récurrence ou le décès par cancer. Les cancers de l'endomètre non diploïdes pénétraient plus profondément le myomètre que les cancers diploïdes ($p = 0.01$). Nous n'avons pas observé de relation entre la ploïdie et l'expression de P53 par immunohistochimie ou FISH.

Conclusion : dans les cancers de l'endomètre, le profil d'expression de p53 est variable selon le type histologique ; néanmoins, l'analyse de TP53 par FISH n'apporte pas d'information pronostique plus pertinente que l'analyse immunohistochimique.

Fluorescence in situ Hybridization and Immunohistochemical Analysis of p53 Expression in Endometrial Cancer: Prognostic Value and Relation to Ploidy

Olivier Graesslin, MD,^{1,2,4} Sandra Chantot-Bastaraud, MD,¹ Marianne Lorenzato, MD,⁵ Philippe Birembaut, MD, PhD,⁵ Christian Quéreux, MD,⁴ and Emile Daraï, MD, PhD^{2,3}

¹Service de Cytogénétique, Hôpital Tenon, AP-HP, F-75020, Paris, France

²UPRES EA 2396 UFR Saint-Antoine, Université Paris VI, Pierre et Marie Curie, F-75006, Paris, France

³Service de Gynécologie, Hôpital Tenon, Université Paris VI, Pierre et Marie Curie, CancerEst, AP-HP, F-75020, Paris, France

⁴Service de Gynécologie-Obstétrique, Centre Hospitalier Universitaire, F-51092, Reims, France

⁵Laboratoire Pol Bouin, INSERM UMR-S 514, Centre Hospitalier Universitaire, F-51092, Reims, France

Background: Endometrial carcinoma is the most common gynecological malignancy. Several molecular biological characteristics have been studied for their potential value in patient management.

Objectives: Our objectives were to compare p53 immunohistochemical expression with P53 gene status determined by fluorescence in situ hybridization (FISH) and to compare these characteristics with ploidy and with classical clinical and histological prognostic factors.

Materials and Methods: We reviewed stored specimens from 43 patients with endometrial cancer diagnosed in 1999–2004. P53 FISH and immunohistochemistry were performed, together with imaging cytometry to calculate DNA ploidy.

Results: Thirteen of the 43 endometrial carcinomas (30.2%) showed P53 loss of heterozygosity (LOH). P53 LOH correlated with the histological type ($P = .03$) and the histological grade ($P = .004$). Quantitative immunohistochemical expression of p53 protein correlated with the histological type ($P = .0001$). With a cutoff of 10% of p53-positive cells, p53 overexpression correlated with the histological type ($P = .003$) and grade ($P = .0008$). No relation was found between P53 LOH or immunohistochemical expression and the disease stage, the depth of myometrial invasion, lymph node status, lymphovascular space involvement, recurrence, or death from cancer. Nondiploid carcinomas showed deeper myometrial invasion than diploid carcinomas ($P = .01$). No relation was observed between ploidy and qualitative or semiquantitative p53 expression or P53 LOH.

Conclusion: In endometrial cancer, FISH analysis of P53 status adds no significant prognostic information compared with immunohistochemical p53 analysis.

Key Words: Endometrial cancer—FISH—Immunohistochemistry—Ploidy—p53—Tumor suppressor gene.

Endometrial cancer is the fourth most common gynecological cancer and the eighth most common

cause of age-adjusted mortality in the female population.¹ The main risk factors for endometrial cancer are elevated endogenous estrogen levels, obesity,² hormone replacement therapy with estrogen alone, antiestrogen adjuvant therapy (e.g., tamoxifen) in women with breast cancer,^{3,4} and a family history of hereditary nonpolyposis colorectal cancer.⁵

Received May 20, 2007; accepted October 23, 2007; published online December 11, 2007.

Address correspondence and reprint requests to: Olivier Graesslin; E-mail: ograesslin@chu-reims.fr

Published by Springer Science+Business Media, LLC © 2008 The Society of Surgical Oncology, Inc.

The P53 tumor suppressor gene is located on the short arm of chromosome 17 and encodes a 53-kD phosphoprotein that regulates DNA integrity and cell cycling. Wild-type p53 activates the transcription of a wide range of genes involved in cell-cycle inhibition and apoptosis,^{6,7} while accumulation of mutated p53 subsequent to oncogene mutations, hypoxia, and/or DNA damage loses these functions.^{6,7} These abnormalities of p53 expression may lead to DNA damage and subsequent aneuploidy.

In endometrial cancer, p53 overexpression correlates with tumor aggressiveness and grade.⁸ Several reports suggest that p53 overexpression is associated with type II endometrial cancer, extensive extrauterine disease, and reduced disease-free and overall survival.⁸⁻¹² However, p53 overexpression does not always indicate p53 gene mutation, and p53 gene mutation does not always lead to intracellular accumulation of p53 protein.¹³⁻¹⁵ Moreover, the optimal cutoff for distinguishing between p53-negative and p53-positive tumors is controversial.

The amount of p53 protein can be measured by means of immunohistochemistry, and the P53 gene copy number can be evaluated by fluorescence in situ hybridization (FISH). In previous immunohistochemical studies, tumors were generally considered p53-negative when they had less than 5% or 10% of positive cells.¹⁶⁻²⁰ The only previous FISH study of p53 in endometrial cancer showed that P53 deletion is common in high-grade tumors.²¹ Few data are available on the relation between FISH and immunohistochemical p53 expression in endometrial cancer.²² Various studies have investigated the value of tumor ploidy as a prognostic marker in endometrial cancer.^{23,24} Lim et al.²³ reported that women with aneuploid endometrial tumors had poor survival and that p53 expression in diploid tumors was associated with increased risk of relapse.

Thus, the aim of this study was to compare immunohistochemical p53 expression, P53 gene status determined by FISH, ploidy, and clinical prognostic factors in a series of 43 women with endometrioid, serous, or tamoxifen-induced carcinoma.

MATERIALS AND METHODS

From 1999 to 2004, tissue samples from 43 women with endometrial cancer (32 endometrioid, six tamoxifen-induced, and five serous carcinomas) were obtained in the Gynecology Departments of Tenon Hospital, Paris and Institut Mère Enfant Alix de

Champagne, Reims, France. Two pathologists reviewed all the tissues samples to confirm the diagnosis and histological characteristics. None of the patients with endometrial carcinoma received chemotherapy or radiotherapy before surgery, which consisted of peritoneal cytology, total hysterectomy, bilateral salpingo-oophorectomy, and pelvic and para-aortic lymph node sampling when necessary. In accordance with International Federation of Gynecologists and Obstetricians (FIGO) recommendations, women with stage I grade 1 endometrial cancer did not undergo lymphadenectomy.

The histological grade of endometrioid carcinoma was assessed according to the FIGO classification.²⁵ Histological and clinical prognostic factors, including the depth of myometrial invasion, lymphovascular space involvement, lymph node metastasis, the FIGO stage, recurrence, and death from disease were recorded. The clinical and histological characteristics of the 43 women are summarized in Table 1. All six tamoxifen-induced carcinomas, which could have specific prognosis and response to therapy, had endometrioid histological type and were of grade 1, 2, or 3 in three cases, one case, and two cases, respectively.

TABLE 1. Clinical and histological characteristics of the 43 patients with endometrial cancers

	Number of patients (%)
Histology	
Endometrioid	32 (74.5%)
Tamoxifen-induced	6 (13.9%)
Serous or clear cell	5 (11.6%)
Grades	
1	16 (37.2%)
2	12 (27.9%)
3	15 (34.9%)
Stages	
I	25 (58.1%)
II	6 (13.9%)
III	10 (23.3%)
IV	2 (4.7%)
Depth of myometrial invasion	
M0 (no invasion)	5 (11.6%)
M1 (< 50%)	18 (41.9%)
M2 (> 50%)	20 (46.5%)
Lymph node metastasis	
Yes	9 (21%)
No	20 (46.5%)
Patients without pelvic lymphadenectomy	14 (32.5%)
Vascular / lymphatic invasion	
Yes	18 (41.9%)
No	25 (58.1%)
Recurrence	
Yes	4 (9.3%)
No	39 (90.7%)
Death (from disease)	2 (4.7%)

Fluorescence in situ Hybridization (FISH)

Probes

BAC clone RP11-89D11 from the RP11 human BAC clone library, mapping to 17p13 at the p53 locus, was used for FISH. BAC DNA was labeled with spectrum orange dUTP by nick translation. Dual-color FISH was performed with a mixture of spectrum orange labeled p53 probe (BAC RP11-89D11) and a spectrum green labeled centromere control for chromosome 17 (17p11.1-q11.1), allowing simultaneous determination of the number of gene and chromosome 17 copies (Vysis, Inc., Downers Grove, IL, USA).

Samples

Tissue sections 4 μ m thick were placed on slides, air dried, and baked overnight at 56°C. The sections were then dewaxed in xylene 3 \times for 10 min and rehydrated in graded alcohol solutions (100%, 85%, 70% for 5 min each). Air-dried tissue sections were treated with 0.2 N HCl for 30 min, washed with 2 \times SSC buffer, 0.05% Tween 20 for 5 min, then incubated for 30 min at 80°C in 2 \times SSC. The slides were washed in 2 \times SSC buffer, 0.05% Tween 20 for 5 min, then treated with proteinase K (PK) solution (Tris-1 M HCl pH 8, 0.5 M EDTA, 1 M NaCl, PK 20 μ g/ μ L) for 15 min at 37°C, and washed in 2 \times SSC buffer, 0.05% Tween 20 for 5 min. The slides were dehydrated in chilled alcohol solutions (70%, 80%, 90%, and 100% for 2 min each). Three microliters of hybridization mixture was applied to each slide, then covered with a glass coverslip and sealed with rubber cement. Denaturation was performed at 90°C for 10 min. Hybridization took place overnight at 42°C in a moist chamber. The slides were postwashed twice in 50% formamide at 42°C for 5 min and then twice in 2 \times SSC at 42°C for 5 min. Nuclei were counterstained with DAPI/Vectashield. The p53 and chromosome 17 centromeric probes were viewed with a Zeiss Axioskop fluorescence microscope (Carl Zeiss Inc., Jena, Germany) equipped with specially designed filter combination for spectrum green and spectrum orange (Vysis, Inc., Downers Grove, IL, USA).

Hybridization signals were scored in at least 100 intact nonoverlapping randomly selected nuclei.

The numbers of oncogene (red-orange) and centromere signals (green) were recorded for each cell. The ratio of p53 signals per nucleus to chromosome 17 centromere signals was calculated.

Cells were considered deleted if the number of centromere signals was more than twice the number of oncogene signals.²⁶ The number of P53 signals

(red-orange) was recorded for each of 100 cells. Cells with ratios < 0.5 were considered deleted, while cells with ratios > 2 were considered amplified.

Immunohistochemistry

Purified mouse monoclonal antibodies against human p53 (DO-7, Dako, Glostrup, Denmark) were used. Tissues were immediately fixed in formalin (10%) and then processed as paraffin blocks. Sections of formalin-fixed tissues 4 μ m thick were deparaffinated in xylene and rehydrated through a graded series of ethanol solutions. Sections were immunostained using the Ventana Nexes automated immunohistochemistry system (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ, USA). Prior to p53 immunoreaction, an antigen retrieval step was used, combined with a high-temperature antigen-unmasking technique (Dako Target Retrieval Solution, Glostrup, Denmark; 100°C, 30 minutes). The automated procedure is based on an indirect biotin-avidin system with a universal biotinylated immunoglobulin as secondary antibody, diaminobenzidine as substrate, and hematoxylin as counterstain. Dilutions of 1/75 were used.

Positive controls were sections of breast cancer. For negative controls the primary antibody was replaced by an irrelevant nonimmune mouse antibody of the same IgG subtype (Dako Laboratories, Glostrup, Denmark).

Immunoreaction of endometrial tumor cells was assessed qualitatively and semiquantitatively. For semiquantitative analysis, the percentage of positive cells was counted for approximately 1000 neoplastic cells per slide, subdivided into 10 selected fields at 400 \times magnification. Counts were performed with a digital image analyzer.^{27,28} The colored image was digitized with a light microscope (Zeiss) fitted with a digital video camera, using specific software (Zeiss, KS 300, Germany).

Immunostaining was assessed by two independent observers, with interobserver variations of less than 5%.

No consensus exists on cutoffs for p53 immunohistochemical positivity.⁹ Therefore, in accordance with previous studies,^{9,16} we took into account the most frequent cutoffs used in the literature of 5% and 10% of positive cells to differentiate positive from negative tumors.

DNA Content

The DNA index (ploidy) was determined by imaging cytometry on 5- μ m paraffin sections rehy-

drated with xylene, ethanol, and water. The specimens were then stained using Feulgen's technique (12 N HCl, azur A, sodium metabisulfite, KH_2SO_4 , 100° ethanol), which yields stoichiometric nuclear staining. DNA content was analyzed with a specific digital image analyzer. The colored image was digitized as above. About 200 cells were counted per slide. Histograms were generated, from which the DNA index was calculated. DNA indices of 1.00 and 2.00 corresponded to diploidy and tetraploidy, respectively. Tumors with DNA indices outside the ranges of 0.92–1.08 and 1.9–2.1 were considered aneuploid, while those with more than one aneuploid peak were considered multiploid.

Statistical Analysis

We used the chi-square test for categorical variables and the Kruskal-Wallis and Mann-Whitney tests for continuous variables. Correlations with p53 expression by FISH and IHC were evaluated using Spearman's test. *P* values below .05 were considered significant.

RESULTS

FISH versus Histological and Clinical Characteristics (Table 2)

Thirteen of the 43 endometrial carcinomas (30.2%) showed P53 LOH (Fig. 1). The frequency of LOH differed according to the histological type (*P* = .03). The difference was significant between endometrioid and serous carcinomas (*P* = .01) and between tamoxifen-induced and serous carcinomas (*P* = .03), but not between endometrioid and tamoxifen-induced carcinomas. The frequency of LOH also varied with the histological grade (*P* = .004); the difference was significant between grade 1 and grade 3 (*P* = .001), but not between grade 1 and grade 2 (Table 2).

LOH did not correlate with the disease stage, the depth of myometrial invasion, lymph node metastasis, lymphovascular space involvement, recurrence, or death from disease.

Immunohistochemical p53 Expression (Table 3, Fig. 2)

The mean percentages (± standard deviation) of p53-positive cells in endometrioid, serous, and tamoxifen-induced carcinomas were 6.0 ± 11.1 , 25.2 ± 13.3 , and 43.3 ± 19.3 , respectively. Quanti-

TABLE 2. Relation between clinical/histological characteristics and P53 LOH

	Number of patients with LOH (n = 13)	<i>P</i> value
Histology		.03
Endometrioid	8/32 (25%)	
Tamoxifen-induced	1/6 (16%)	
Serous or clear cell	4/5 (80%)	
Grades		.004
1	1/16 (6%)	
2	3/12 (25%)	
3	9/15 (60%)	
Stages		NS
I	5/25 (20%)	
II	3/6 (50%)	
III	5/10 (50%)	
IV	0/2	
Depth of myometrial invasion		.14
M0 (no invasion)	3/5 (60%)	
M1 (< 50%)	3/18 (16%)	
M2 (> 50%)	7/20 (35%)	
Lymph node metastasis		NS
Yes	4/9 (44%)	
No	5/20 (25%)	
Patients without pelvic lymphadenectomy	4/14 (28%)	
Vascular/lymphatic invasion		.08
Yes	8/18 (44%)	
No	5/25 (20%)	
Recurrence		.19
Yes	2/4 (50%)	
No	11/39 (28%)	
Death		NS
Yes	0/2	
No	13/41 (32%)	

tative p53 expression differed according to the histological type (*P* = .0001). The difference was significant between endometrioid and serous carcinomas (*P* = .002) and between endometrioid and tamoxifen-induced carcinomas (*P* < .0001), but not between serous and tamoxifen-induced carcinomas.

With a cutoff of 10% of p53-positive cells, p53 overexpression correlated with the histological type (*P* = .003) and histological grade (*P* = .0008), but not with the disease stage, the depth of myometrial invasion, lymph node metastasis, lymphovascular space involvement, recurrence, or death from disease.

With a cutoff of 5% of p53-positive cells, the correlation between p53 overexpression and the histological type and grade persisted (Table 3).

No general relation was observed between p53 LOH and qualitative or semiquantitative p53 expression. When subsets of tumors were considered according to the histological type, grades, stages, depth of myometrial invasion, lymph node metastasis, and lymphovascular invasion, no significant relation between P53 LOH and p53 immunohistochemical expression was observed.

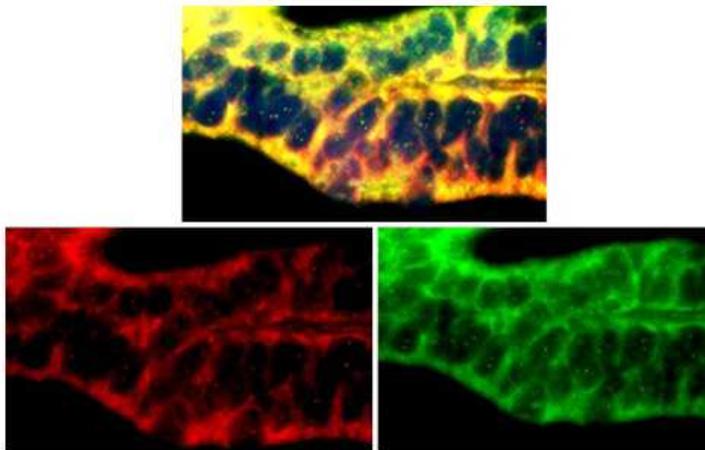


FIG. 1. Representative samples of endometrioid carcinomas of the uterus studied by FISH, showing P53 loss of heterozygosity.

TABLE 3. Relation between clinical/histological characteristics, immunohistochemical p53 expression, and LOH for P53

	P53 < 10%	P53 < 5%	Patients with LOH (n = 13)
Histology	<i>P</i> = .003	<i>P</i> = .001	
Endometrioid	27/32	23/32	8 (25%)
Tamoxifen	1/6	0/6	1 (16.5%)
Serous	1/5	1/5	4 (80%)
Grades	<i>P</i> = .0008	<i>P</i> = .003	
1	12/16	9/16	1 (6.2%)
2	12/12	11/12	3 (25%)
3	5/15	4/15	9 (60%)
Stages	<i>P</i> = .14	<i>P</i> = .2	
I	16/25	13/25	5 (20%)
II	6/6	5/6	3 (50%)
III	5/10	4/10	5 (50%)
IV	2/2	2/2	0
Depth of myometrial invasion	<i>P</i> = NS	<i>P</i> = S	
M0 (no invasion)	3/5	3/5	3 (60%)
M1 (< 50%)	12/18	8/18	3 (16.5%)
M2 (> 50%)	14/20	13/20	7 (35%)
Lymph node metastasis	<i>P</i> = .08	<i>P</i> = NS	
Yes	5/9	5/9	4 (44.5%)
No	17/20	12/20	5 (25%)
Patients without pelvic lymphadenectomy	8/14	8/14	4 (28.5%)
Lymphovascular invasion	<i>P</i> = .15	<i>P</i> = NS	
Yes	19/25	16/25	8 (32%)
No	10/18	8/18	5 (27.7%)
Recurrence	<i>P</i> = NS	<i>P</i> = NS	
Yes	3/4	3/4	2 (50%)
No	26/39	21/39	11 (28.2%)
Death	<i>P</i> = NS	<i>P</i> = NS	
Yes	1/2	1/2	0
No	28/41	23/41	13 (31.7%)

DNA Ploidy

The 43 endometrial carcinomas were diploid, aneuploid, and multiploid in 12, 23, and 8 cases (27.9%, 53.5%, and 18.6%), respectively. The 32 endometrioid carcinomas were diploid, aneuploid, and multiploid in 9, 16, and 7 cases (28.1%, 50%, and 21.9%), respectively. The five serous carcinomas were diploid, aneuploid, and multiploid in 2, 3, and 0 cases (40% and 60%). The six tamoxifen-induced carcinomas were diploid, aneuploid, and multiploid in respectively 1, 4, and 1 case (16%, 68%, and 16%), respectively (Table 4). No difference in ploidy was noted according to the histological type.

Relative to diploid carcinomas, nondiploid (aneuploid and multiploid) carcinomas showed deeper myometrial invasion (*P* = .01). No difference in the histological type or grade, the disease stage, lymph node metastasis, lymphovascular space involvement, recurrence, or death from disease was found between diploid and nondiploid carcinomas (Table 5).

No relation was found between ploidy and qualitative or semiquantitative p53 expression. No relation was observed between ploidy and P53 LOH.

DISCUSSION

This study shows that P53 loss of heterozygosity (LOH) is related to the histological type of endometrial carcinoma and is associated with high histolog-

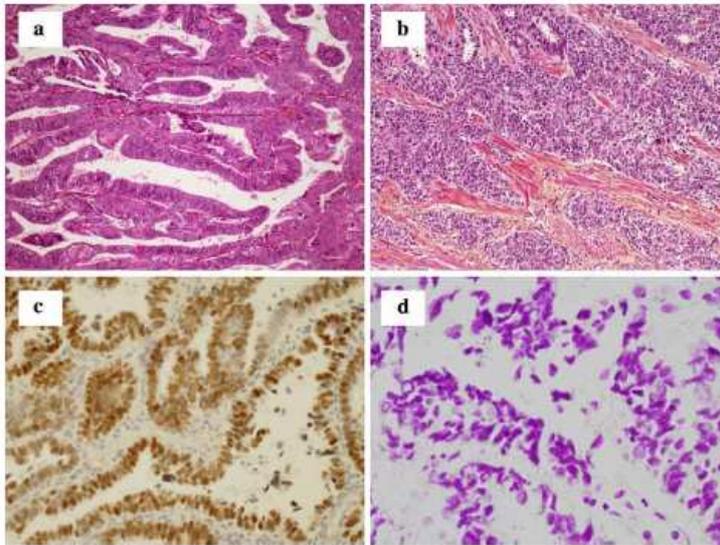


FIG. 2. Representative samples of grade 1 (2a) and grade 3 (2b) endometrial (endometrioid subtype) carcinomas of the uterus (hematoxylin-eosin, HES) immunostained for p53 in a tamoxifen-induced carcinoma (2c), and Feulgen staining for DNA content (2d).

TABLE 4. Relation between histological characteristics and ploidy

	Diploid	Aneuploid	Multiploid
Endometrioid carcinoma (32)	9	16	7
Serous carcinoma (5)	2	3	0
Tamoxifen-induced carcinoma (6)	1	4	1

ical grade. Our immunohistochemical studies showed a similar relation between p53 overexpression and both the histological type and grade. In contrast, no relation between P53 LOH and p53 immunohistochemical expression was noted.

FISH showed P53 deletion in nearly one-third of the 43 endometrial carcinomas. Only one-fourth of endometrioid carcinomas exhibited P53 deletion. In the only previous study of P53 LOH in this setting,²¹ P53 deletion was found in 31 of 47 endometrial carcinomas (65%), comprising 41 endometrioid carcinomas, five malignant mixed Mullerian tumors, and one adenosarcoma. In our series P53 deletion was more frequent in serous than in endometrioid carcinomas, whereas endometrioid and tamoxifen-induced carcinomas had similar low rates of P53 deletion. Our data are compatible with those of previous studies showing that nonendometrioid carcinomas (mainly serous and clear-cell types) exhibited P53 LOH.²⁹ Moreover, P53 LOH was more frequent in our high-histological-grade tumors, independently of the his-

TABLE 5. Relation between clinical/histological characteristics and ploidy

	Number of patients with diploid tumors (%)	P value
Histology		NS
Endometrioid	9/32 (28%)	
Tamoxifen-induced	2/6 (33%)	
Serous or clear cell	1/5 (20%)	
Grades		.07
I	7/16 (44%)	
2 or 3	5/27 (18.5 %)	
Stage		NS
I	8/25 (32%)	
II	2/6 (33%)	
III	2/10 (20%)	
IV	0/2	
Depth of myometrial invasion		.01
M0 (no invasion)	0/5	
M1 (< 50%)	9/18 (50%)	
M2 (> 50%)	3/20 (15%)	
Lymph node metastasis		NS
Yes	2/9 (22%)	
No	7/20 (35%)	
Vascular/lymphatic invasion		NS
Yes	4/18 (22%)	
No	8/25 (32%)	
Recurrence		.19
Yes	0/4	
No	12/39 (31%)	
Death	0/2	NS

tological type, suggesting that P53 alterations occur in the later stages of endometrioid carcinogenesis. However, we found no relation between P53 LOH

and the FIGO stage, the depth of myometrial invasion, lymph node metastasis, lymphovascular space involvement, recurrence, or death. This lack of prognostic significance of P53 LOH could be related to an inadequate sample size. Williams et al. reported that univariate analysis showed a strong correlation between P53 LOH and tumor grade,²¹ whereas in multivariate analysis the same authors found that only histological grade 3 and P53 LOH approached prognostic significance. Thus, P53 LOH has at best limited prognostic value in endometrial carcinoma.²⁹⁻³²

In our study, 32.5% of the endometrial carcinomas displayed p53 overexpression. P53 protein overexpression was more frequent in serous and tamoxifen-induced tumors than in endometrioid tumors, but no difference was noted between serous and tamoxifen-induced carcinomas. A relation between p53 overexpression and histological grade was also observed. P53 overexpression tended to be associated with lymph node metastasis, but not with the FIGO stage, the depth of myometrial invasion, lymphovascular space involvement, recurrence, or death from disease. In contrast, previous large series showed an association between p53 overexpression and advanced stage and poor survival, although p53 overexpression was not an independent prognostic factor.^{20,33,34} Ragni et al. found no correlation between p53 immunostaining and histological prognostic factors.¹¹ The discrepancies among these series could be explained by differences in both the cutoffs and the immunohistochemical techniques.³⁵ Alkushi et al. found that the distribution of p53 immunostaining was bimodal, with a low or a very high p53 index in most cases.⁹ Using multivariate analysis, these authors demonstrated the prognostic significance of p53 staining for endometrioid but not clear-cell or papillary serous carcinomas, but they used a cutoff of 50% of labeled cells. Moreover, McCluggage et al. clearly demonstrated that staining varied according to the concentration and choice of primary antibody.³⁶ Efforts must be made to standardize immunohistochemical techniques and to agree on a cutoff to permit comparisons among studies and to determine the real prognostic relevance of p53 expression.

We found no relation between p53 LOH and overexpression (immunohistochemistry) in endometrial carcinomas. Moreover, p53 LOH did not relate to classical prognostic factors. These data do not support routine use of FISH rather than immunohistochemistry for p53 analysis, as the latter method is simple, cost effective, and amenable to automated staining and quantification methods.³⁷ However, it is

important to note that immunohistochemistry may be negative on carcinomas in which P53 is inactivated by loss of both alleles or by null mutations even less frequently in endometrial than ovarian carcinomas, and that not all mutations stabilize the protein.^{37,38}

As a result, genetic methods have been recommended to determine P53 status, such as WAVE System (Transgenomic, Omaha, NE), single strand conformation polymorphism (SSCP), and direct sequencing. Moreover, not all mutations are associated with a loss of transcriptional function.³⁹⁻⁴¹ Recently, Nenutil et al. recommended the use of the functional analysis of separated alleles of p53 on yeast (FASAY) method to identify tumors that contain a mutant TP53 gene inactivating the protein product as a transcription factor.³⁷ Further studies are required to evaluate the clinical relevance of P53 gene status in this setting. Semczuk et al. recall that the correlation between gene distortions concerning P53 and nuclear p53 immunoreactivity in endometrial carcinomas are not yet fully understood.⁴² In their series as observed in ours, endometrial carcinomas with LOH for P53 were high-grade tumors. According to Stewart et al., p53 protein may be expressed in uterine malignant tumors without point mutations, suggesting involvement of abnormal p53 protein stabilization and/or interaction with other members of the p53 pathway (possibly by an MDM2-mediated process).⁴³ In addition, p53 protein may also accumulate and can be detected immunohistochemically as a result of cellular impairment or hypoxia.

The prognostic relevance of DNA aneuploidy in endometrial carcinoma is controversial.⁴⁴⁻⁴⁸ In multivariate analysis, Lundgren et al. found that ploidy and the histopathological subgroup retained their significance, whereas only ploidy was significant in the endometrioid subgroup.⁴⁶ DNA ploidy was the strongest predictor of relapse-free survival and the only independent prognostic factor in the endometrioid subgroup. In contrast, Orbo et al. found no relation between ploidy and clinical or histological prognostic factors.⁴⁷ In our study, the only significant relation was between aneuploidy and myometrial invasion, possibly owing to the relatively small sample size. We found no relation between LOH and ploidy, nor between p53 overexpression and aneuploidy. Our results therefore disagree with those of Osmanagaoglu et al. showing a relation between ploidy (evaluated by flow cytometry) and p53 immunopositivity.⁴⁹ This could partly be due to the use of different techniques to evaluate ploidy. Although Lundgren et al. reported a strong correlation between the results of flow cytometry and imaging analysis,⁴⁶

the latter method specifically evaluates ploidy in tumor cells, whereas flow cytometry takes all cells into account.

In conclusion, P53 FISH does not appear to add significant prognostic information in endometrial cancer compared with classical immunohistochemistry. The fact that P53 LOH was preferentially detected in serous endometrial carcinomas in this series suggests that different pathways may be involved in endometrioid and tamoxifen-induced endometrial carcinomas, possibly explaining the different prognoses of women with different histological subtypes of endometrial carcinoma.

REFERENCES

- Cook LS, Kmet LM, Magliocco AM, et al. Endometrial cancer survival among U.S. black and white women by birth cohort. *Epidemiology* 2006; 17:469-72.
- Rose PG. Endometrial carcinoma. *N Engl J Med* 1996; 335:640-9.
- Fisher B, Costantino JP, Redmond CK, et al. Endometrial cancer in tamoxifen-treated breast cancer patients: findings from the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project (NSABP) B-14. *J Natl Cancer Inst* 1994; 86:527-37.
- Mignotte H, Lasset C, Bonadona V, et al. Iatrogenic risks of endometrial carcinoma after treatment for breast cancer in a large French case-control study. FNCLCC. *Int J Cancer* 1998; 76:325-30.
- Watson P, Vasen HF, Mecklin JP, et al. The risk of endometrial cancer in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Am J Med* 1994; 96:516-20.
- May P, May E. Twenty years of p53 research: structural and functional aspects of the p53 protein. *Oncogene* 1999; 18:7621-36.
- Drane P, Bravard A, Bouvard V, et al. Reciprocal downregulation of p53 and SOD2 gene expression: implication in p53 mediated apoptosis. *Oncogene* 2001; 20:430-9.
- Mariani A, Sebo TJ, Webb MJ, et al. Molecular and histopathologic predictors of distant failure in endometrial cancer. *Cancer Detect Prev* 2003; 27:434-41.
- Alkushi A, Lim P, Coldman A, et al. Interpretation of p53 immunoreactivity in endometrial carcinoma: establishing a clinically relevant cut-off level. *Int J Gynecol Pathol* 2004; 23:129-37.
- Coronado PJ, Vidart JA, Lopez-Asenjo JA. P53 overexpression predicts endometrial carcinoma better than HER-2/neu overexpression. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2001; 98:103-8.
- Ragni N, Ferrero S, Prefumo F, et al. The association between p53 expression, stage and histological features in endometrial cancer. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2005; 123:111-6.
- Kounelis S, Kapranos N, Kouri E, et al. Immunohistochemical profile of endometrial adenocarcinoma: a study of 61 cases and review of the literature. *Mod Pathol* 2000; 13:379-88.
- Davidoff AM, Humphrey PA, Iglehart JD, et al. Genetic basis for p53 overexpression in human breast cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88:5006-10.
- Iggo R, Gatter K, Bartek J, et al. Increased expression of mutant forms of p53 oncogene in primary lung cancer. *Lancet* 1990; 335:675-9.
- Hall PA, Lane DP. P53 in tumour pathology: can we trust immunohistochemistry? *J Pathol* 1994; 172:1-4.
- Soong R, Knowles S, Williams KE, et al. Overp53 expression protein is an independent prognostic indicator in human endometrial carcinoma. *Br J Cancer* 1996; 74:562-7.
- Taskin M, Lallas TA, Barber HR, et al. bcl-2 and p53 in endometrial adenocarcinoma. *Mod Pathol* 1997; 10:728-34.
- Erdem O, Erdem M, Dursun A, et al. Angiogenesis, p53, and bcl-2 expression as prognostic factors in endometrial cancer: comparison with traditional clinicopathological variables. *Int J Gynecol Pathol* 2003; 22:254-60.
- Zheng W, Cao P, Zheng M, et al. p53 overexpression and bcl-2 persistence in endometrial carcinoma: comparison of papillary serous and endometrioid subtypes. *Gynecol Oncol* 1996; 61:167-74.
- Ito K, Watanabe K, Nasim S, et al. Prognostic significance of p53 overexpression in endometrial cancer. *Cancer Res* 1994; 54:4667-70.
- Williams JA Jr, Wang ZR, Parrish RS, et al. Fluorescence in situ hybridization analysis of Her-2/neu, c-myc and p53 in endometrial cancer. *Exp Mol Pathol* 1999; 67:135-43.
- Sandberg AA. Cancer cytogenetics for clinicians. *Ca Cancer J Clin* 1994; 44:136-59.
- Lim P, Aquino-Parsons CF, Wong F, et al. Low-risk endometrial carcinoma: assessment of a treatment policy based on tumor ploidy and identification of additional prognostic indicators. *Gynecol Oncol* 1999; 73:191-5.
- Santala M, Talvensaaari-Mattila A. DNA ploidy is an independent prognostic indicator of overall survival in stage I endometrial endometrioid carcinoma. *Anticancer Res* 2003; 23:5191-96.
- Benedet JL, Bender H, Jones H 3rd, et al. FIGO staging classifications and clinical practice guidelines in the management of gynaecologic cancers. FIGO committee on Gynecologic Oncology. *Int J Gynaecol Obstet* 2000; 70:209-62.
- Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Waldman FM, et al. Detection of retinoblastoma gene copy number in metaphase chromosomes and interphase nuclei by fluorescence in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 1992; 60:190-3.
- De Jong JS, Van Diest PJ, Baak JPA. Methods in laboratory investigation. Heterogeneity and reproducibility of microvessel counts in breast cancer. *Lab Invest* 1995; 73:922-6.
- Weidner N. Intratumor microvessel density as a prognostic factor in cancer. *Am J Pathol* 1995; 147:9-19.
- Matias-Guiu X, Catusas L, Bussaglia E, et al. Molecular pathology of endometrial hyperplasia and carcinoma. *Hum Pathol* 2001; 32:569-77.
- Tashiro H, Isacson C, Levine R, et al. P53 gene mutations are common in uterine serous carcinoma and occur early in their pathogenesis. *Am J Pathol* 1997; 150:177-85.
- Jovanovic AS, Boynton KA, Mutter GL. Uteri of women with endometrial carcinoma contain a histopathologic spectrum of monoclonal putative precancers, some with microsatellite instability. *Cancer Res* 1996; 56:1917-21.
- Oehler MK, Brand A, Wain GV. Molecular genetics and endometrial cancer. *J Br Menopause Soc* 2003; 9:27-31.
- Inoue M, Okayama A, Fujita M, et al. Clinicopathological characteristics of p53 overexpression in endometrial cancers. *Int J Cancer* 1994; 58:14-9.
- Lukes AS, Kohler MF, Pieper CF, et al. Multivariable analysis of DNA ploidy, P53, and HER-2/NEU as prognostic factors in endometrial cancer. *Cancer* 1994; 73:2380-5.
- Leong AS-Y. Quantitation in immunohistochemistry: fact or fiction?. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2004; 12:1-7.
- McCluggage WG, Connolly LE, McGregor G, et al. A strategy for defining biologically relevant levels of p53 protein expression in clinical samples with reference to endometrial neoplasia. *Int J Gynecol Pathol* 2005; 24:307-12.
- Nenuil R, Smardova J, Pavlova S, et al. Discriminating functional and non functional p53 in human tumours by p53 and MDM2 immunohistochemistry. *J Pathol* 2005; 207:251-9.

38. Wynford-Thomas D. P53 in tumour pathology: can we trust immunohistochemistry?. *J Pathol* 1992; 166:329-30.
39. Soussi T, Beroud C. Assessing TP53 status in human tumours to evaluate clinical outcome. *Nature Rev Cancer* 2001; 1:233-40.
40. Soussi T, Kato S, Levy PP, et al. Reassessment of the TP53 mutation database in human disease by data mining with a library of TP53 missense mutations. *Hum Mutat* 2005; 25:6-17.
41. Ludwig RL, Bates S, Vousden KH. Differential activation of target cellular promoters by p53 mutants with impaired apoptotic function. *Mol Cell Biol* 1996; 16:4952-60.
42. Semczuk A, Marzec B, Skomra D, et al. Allelic loss at TP53 is not related to p53 protein overexpression in primary human endometrial carcinomas. *Oncology* 2005; 69:317-25.
43. Stewart RL, Royds JA, Burton JL, et al. Direct sequencing of the p53 gene shows absence of mutations in endometrioid endometrial adenocarcinomas expressing p53 protein. *Histopathology* 1998; 33:440-5.
44. Coleman RL, Schinck JC, Miller DS, et al. DNA flow cytometric analysis of clinical stage I endometrial carcinomas with lymph node metastases. *Gynecol Oncol* 1993; 50:20-4.
45. Terada K, Mattson D, Goo D, et al. DNA aneuploidy is associated with increased mortality for stage I endometrial cancer. *Gynecol Oncol* 2004; 95:483-7.
46. Lundgren C, Auer G, Frankendal B, et al. Prognostic factors in surgical stage I endometrial carcinoma. *Acta Oncol* 2000; 43:49-56.
47. Orbo A, Rydningen M, Straume B, et al. Significance of morphometric, DNA cytometric features, and other prognostic markers on survival of endometrial cancer patients in Northern Norway. *Int J Gynecol Cancer* 2002; 12:49-56.
48. Biesterfeld S, Leitloff M, Rath W, et al. DNA image cytometry in the differential diagnosis of endometrial hyperplasia and adenocarcinoma. *Analyt Quant Cytol Histol* 2001; 23:123-8.
49. Osmanagaoglu MA, Kadioglu S, Osmanagaoglu S, et al. The relationship between mutant p53 gene, DNA contents and conventional clinicopathological prognostic variables in cases with endometrial carcinoma. *Eur J Gynaecol Oncol* 2005; 26:64-70.

RESULTATS NON PUBLIES.

1. Expression des facteurs de prolifération (Ki67).

La protéine nucléaire Ki67 est un témoin de la prolifération cellulaire. Les résultats de l'analyse quantitative sont exprimés en pourcentage de cellules marquées par rapport au nombre total de cellules examinées en analyse d'image [moyenne \pm 2 DS].

1.1. Ki67 et type histologique.

- Dans l'endomètre normal, concernant l'activité de prolifération mesurée par le Ki67, nous n'avons pas retrouvé de différence significative selon les 2 phases du cycle (5.4% \pm 7.1 en phase proliférative vs 3.16% \pm 5.8 en phase sécrétoire).
- Dans l'hyperplasie endométriale, nous n'avons pas observé de différence significative entre les 2 types d'hyperplasie quant à l'index de prolifération mesuré par le Ki67 (9.5% \pm 11.0 dans l'hyperplasie simple vs 7.1% \pm 6.2 dans l'hyperplasie atypique).

Dans les cancers endométrioïdes de l'endomètre, il y a une différence significative entre les grades 1 et 2 d'une part et les grades 3 d'autre part (grade 1 vs grade 3 : $p=0.0002$; grade 2 vs grade 3 : $p=0.006$), ces derniers ayant un index de prolifération plus élevé que les grades plus faibles.

	Grade 1	Grade 2	Grade 3
Ki67	22.1 \pm 15.8	25.3 \pm 16.1	44.7 \pm 9.3

Ki67 dans les cancers endométrioïdes de l'endomètre (n = 38) selon le grade (moyenne \pm 2 DS).

1.2. Ki67 et facteurs pronostics cliniques et histologiques.

Lorsque l'on s'intéresse à la corrélation entre les facteurs pronostics cliniques et histologiques et le Ki67 dans les cancers endométrioïdes, on observe une relation très significative entre l'index de prolifération mesuré par le Ki67 et la présence d'embolies lymphatiques ou vasculaires et l'existence de métastases ganglionnaires.

Paramètres clinicopathologiques	Ki67
Stade (FIGO)	NS
Profondeur de l'invasion myométriale	NS
Emboles lymphovasculaires	
Présence vs absence	p = 0.0003
Emboles + (mean value ± SD)	40.4 ± 15.1
Emboles 0	21.9 ± 12.1
Métastase ganglionnaire	
Présence vs absence	p = 0.02
N+ (mean value ± SD)	40.3 ± 17.5
N0	23.7 ± 13.6
Récurrence	
Oui vs Non	NS
Décès	NS

Corrélation entre l'expression du Ki67 et les facteurs pronostics cliniques et histologiques.

2. Expression des facteurs apoptotiques p53 et bcl-2.

Pour les protéines p53 et bcl-2, les résultats de l'analyse quantitative sont exprimés en pourcentage de cellules marquées par rapport au nombre total de cellules examinées.

2.1. Expression des facteurs apoptotiques selon les types histologiques.

- Dans l'endomètre normal, bcl-2 est significativement plus faiblement exprimé en phase sécrétoire qu'en phase proliférative. Concernant p53, il n'y a pas de différence significative entre les 2 phases du cycle.

EN	Prolifératif	Sécrétoire	p
p53	1.0 ± 3.3	0.5 ± 1.7	NS
bcl-2	61.8 ± 32.4	0.9 ± 1.9	< 0.0001

Expression des facteurs apoptotiques p53 et bcl-2 dans l'endomètre normal (moyenne ± 2 DS).

- Dans l'hyperplasie endométriale, il n'y a pas de différence significative d'expression de bcl-2 entre les 2 types d'hyperplasie, simple ou atypique, mais l'on note une différence

significative dans l'expression de p53 bien que la valeur moyenne ne soit que de 5.5% dans les HA.

Hyperplasie	Simple	Atypique	p
p53	0.1 ± 0.3	5.5 ± 9.4	0.02
bcl-2	39.5 ± 34.3	39.2 ± 31.4	NS

Expression des facteurs apoptotiques p53 et bcl-2 dans l'hyperplasie simple et atypique de l'endomètre (moyenne ± 2DS).

- Dans les cancers de l'endomètre, l'expression de p53 est significativement différente selon le type histologique, mais ce n'est pas le cas pour bcl-2. En effet, p53 est surexprimé dans les cancers séreux et dans les cancers induits par le tamoxifène comparativement aux cancers endométrioïdes.

Cancers	Endométrioïdes	Séreux	Tamoxifène	p
p53	6.0 ± 11.3	25.2 ± 17.3	37.1 ± 24.0	0.0008
bcl-2	21.8 ± 30.4	0.4 ± 0.9	14.0 ± 29.5	0.09

Expression des facteurs apoptotiques p53 et bcl-2 dans les cancers de l'endomètre (endométrioïdes, séreux et sous tamoxifène) (moyenne ± 2DS).

	p53	bcl-2
Endométrioïde vs séreux	0.001	NS
Endométrioïde vs tamoxifène	< 0.0001	NS
Séreux vs tamoxifène	NS	NS

Comparaison de l'expression des facteurs apoptotiques p53 et bcl-2 selon les types de cancer.

2.2. Facteurs apoptotiques et paramètres pronostics cliniques et histologiques.

Pour les cancers endométrioïdes, lorsque l'on s'intéresse à la corrélation entre les facteurs pronostics cliniques et histologiques et l'expression des facteurs apoptotiques, on observe que p53 est corrélé au grade histologique (les grades 3 surexprimant p53 comparativement aux grades 1 et 2) et qu'il y a une tendance à la corrélation avec le statut ganglionnaire. Aucun paramètre n'est significativement corrélé à l'expression de bcl-2.

Paramètres cliniques et histologiques	p53	bcl-2
Grade	0.05	NS
Stade (FIGO)	NS	NS
Invasion myométriale	NS	NS
Emboles lymphovasculaires		
Présence vs absence	NS	NS
Métastase ganglionnaire		
Présence vs absence	0.08	NS
Récurrence		
Oui vs Non	NS	NS
Décès	NS	NS

Relation entre les facteurs pronostiques cliniques et histologiques et les facteurs apoptotiques p53 et bcl-2 dans les cancers endométrioides (n = 38).

3. Expression des récepteurs hormonaux (RE α , RPA et RPB).

Les récepteurs hormonaux ont été quantifiés par analyseur d'image et les résultats sont exprimés en pourcentage de cellules marquées sur le nombre total de cellules comptées (valeur moyenne \pm 2DS).

3.1. Expression des récepteurs hormonaux selon les types histologiques.

- Dans l'endomètre normal nous avons retrouvé une différence très significative d'expression des récepteurs hormonaux aux œstrogènes et à la progestérone entre les 2 phases du cycle, les récepteurs E et P étant davantage exprimés dans la phase proliférative que dans la phase sécrétoire.

EN	Prolifératif	Sécrétoire	p
RE α	90.7 \pm 7.3	41.8 \pm 16.1	< 0.0001
RPA	81.5 \pm 27.8	38.4 \pm 35.3	0.007
RPB	84.3 \pm 25.8	39.4 \pm 37.7	0.006

Expression des récepteurs hormonaux dans l'endomètre normal.

- Dans l'hyperplasie atypique comparativement à l'hyperplasie simple, nous avons observé une augmentation significative de l'expression de RE α et une diminution significative de l'expression de RPB.

Hyperplasie	Simple	Atypique	p
RE α	51.9 \pm 23.9	75.6 \pm 17.8	0.001
RPA	54.7 \pm 31.5	48.6 \pm 31.4	NS
RPB	61.9 \pm 28.4	43.0 \pm 30.2	0.05

Expression des récepteurs hormonaux dans l'hyperplasie simple et atypique.

- Pour les cancers de l'endomètre, le pourcentage de cellules marquées est donné pour chaque type de CE et pour chaque récepteur hormonal dans le tableau suivant.

Cancers	Endométrioïdes	Séreux	Tamoxifène	p
RE α	24.1 \pm 26.3	1.1 \pm 1.1	17.8 \pm 23.2	0.08
RPA	16.6 \pm 19.2	0.1 \pm 0.1	11.7 \pm 21.5	0.007
RPB	14.6 \pm 19.1	0.3 \pm 0.6	10.2 \pm 17.9	0.06

Expression des récepteurs hormonaux dans les différents types de cancers de l'endomètre (endométrioïdes, séreux et sous tamoxifène)

Lorsque l'on compare les différents types de CE entre eux, on observe une différence significative d'expression de RE α , RPA et RPB entre les cancers de type endométrioïde et les cancers de type séreux.

	RE α	RPA	RPB
Endométrioïde vs séreux	0.03	0.002	0.02
Endométrioïde vs tamoxifène	NS	NS	NS
Séreux vs tamoxifène	NS	NS	NS

Comparaison de l'expression des récepteurs hormonaux selon les types histologiques de cancer.

3.2. Récepteurs hormonaux et facteurs pronostics cliniques et histologiques.

Lorsque l'on s'intéresse à la corrélation entre les facteurs pronostics cliniques et histologiques et l'expression des récepteurs hormonaux, on observe une corrélation :

- entre l'expression de **RE α** et le grade histologique, l'invasion myométriale et la présence d'emboles lymphatiques
- entre l'expression de **RPA** et le grade histologique, la présence d'emboles lymphatiques et le statut ganglionnaire

L'expression de ces 3 récepteurs hormonaux est corrélée dans les cancers de l'endomètre (RE α et RPA : $p=0.0003$ et $\rho = 0.602$; RE α et RPB : $p= 0.03$ $\rho = 0.342$; RPA et RPB : $p < 0.0001$ et $\rho = 0.751$). Ces récepteurs sont coexprimés.

Paramètres cliniques et histologiques	RE α	RPA	RPB
Grade	0.001	0.007	NS
Stade (FIGO)	NS	NS	NS
Invasion myométriale	0.01	NS	NS
Emboles lymphatiques/vasculaires			
Présence vs absence	0.04	0.02	0.06
Métastase ganglionnaire			
Présence vs absence	NS	0.05	NS
Récurrence			
Oui vs Non	NS	NS	0.09
Décès	NS	NS	NS

Relation entre les facteurs pronostiques cliniques et histologiques et l'expression des récepteurs hormonaux dans les cancers de l'endomètre.

4. Evaluation de la ploïdie par analyse d'images.

A partir de la série des 109 patientes, la ploïdie a pu être analysée sur 101 prélèvements. En effet, les biopsies ou pièces opératoires fixées par le liquide de Bouin (6 endomètres normaux, 1 hyperplasie simple, 1 hyperplasie atypique) n'ont pu faire l'objet d'une coloration de Feulgen.

Les histogrammes de contenu en ADN ont été obtenus à partir du comptage de 200 cellules nucléées en moyenne (moyenne : 197 cellules comptées, extrêmes : 116-312) de l'endomètre normal (prolifératif ou sécrétoire) ou dans les zones caractéristiques de la pathologie considérée (hyperplasie simple ou atypique et cancer).

Les prélèvements diploïdes ont été comparé aux prélèvements non diploïdes (regroupant les contenus aneuploïdes et multiploïdes).

4.1. Ploïdie selon le type histologique.

- Dans l'endomètre normal, il n'y a pas de différence significative dans le contenu en ADN entre les phases proliférative et sécrétoire dans notre série.
- Dans l'hyperplasie endométriale, il n'y a pas de différence significative entre les formes simple et atypique quant au contenu en ADN.

Ploïdie	Hyperplasie simple	Hyperplasie atypique	p
Diploïde	13	16	} NS (0.85)
Non diploïde	3	5	
Total	16	21	

Ploïdie dans les hyperplasies simple (n = 16) et atypique (n = 21) de l'endomètre.

- Dans les cancers de l'endomètre, selon le type, nous avons observé :
 - CE endométrioïde : 11 diploïdes / 27 non diploïdes (71% formes non diploïdes)
 - CE sous tamoxifène : 1 diploïde / 6 non diploïdes (85% formes non diploïdes)
 - CE séreux : 2 diploïdes / 3 non diploïdes (60% formes non diploïdes)

Il n'y a pas de différence significative quant au nombre de formes non diploïdes selon le type de cancer, mais cela tient probablement au faible effectif de cancers séreux de notre série.

4.2. Ploïdie et facteurs pronostics cliniques et histologiques.

La ploïdie a été analysée pour les cancers endométrioïdes en corrélation avec les facteurs pronostics cliniques et histologiques.

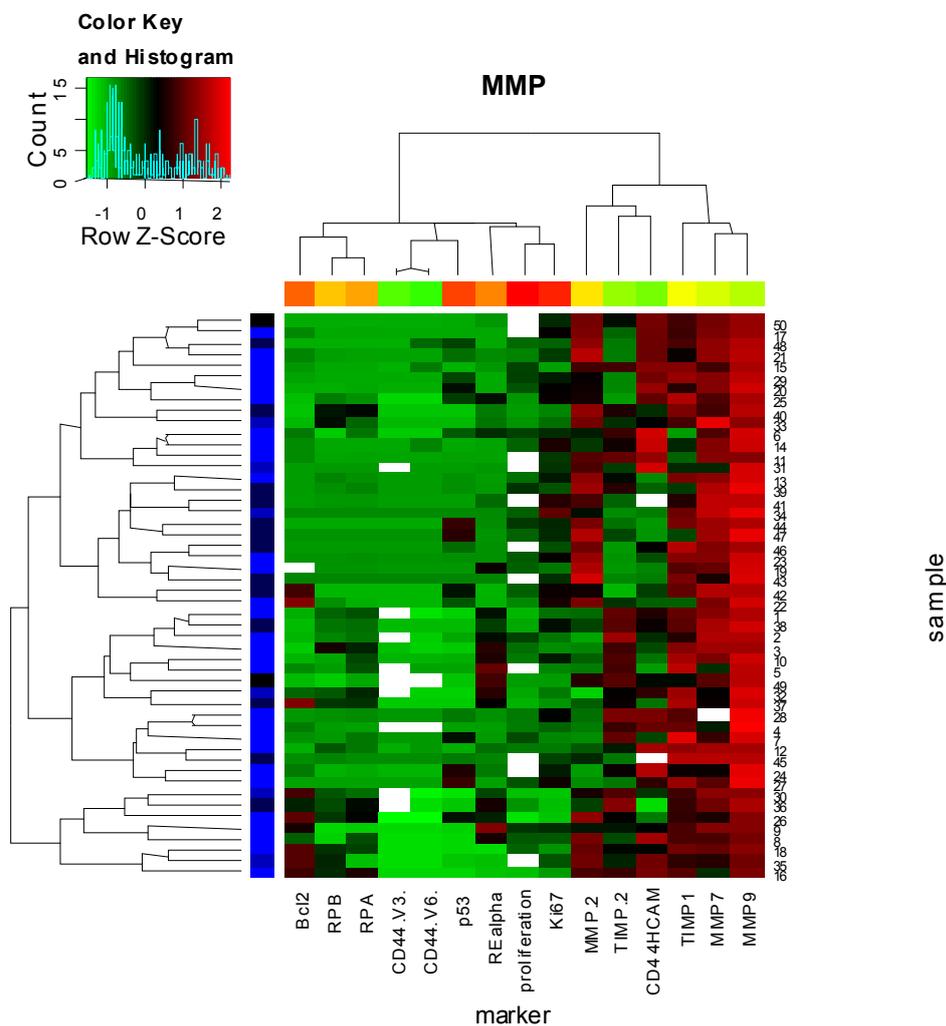
Il n'y a pas de différence statistiquement significative du contenu en ADN selon le grade histologique des tumeurs (grade 1 : 7 diploïdes vs 10 non diploïdes, grade 2 : 3 diploïde vs 10 non diploïde, grade 3 : 1 diploïde vs 7 non diploïde). Seule l'invasion myométriale est corrélée à la ploïdie avec un nombre significativement plus important de formes non diploïdes dans les formes envahissant plus de 50% du myomètre (M2) par rapport aux formes intramuqueuses (M0) ou aux formes n'envahissant que superficiellement le myomètre (M1).

Caractéristiques cliniques et histologiques	ploïdie
Stade (FIGO)	NS
Profondeur d'invasion myométriale	p = 0.03
M0 (diploïde/non diploïde)	1/4
M1	8/7
M2	2/16
Emboles lymphovasculaires	
Présence vs absence	NS (p = 0.3)
Emboles + (mean value ± SD)	
Emboles 0	
Métastase ganglionnaire	
Présence vs absence	NS (p = 0.9)
N+ (mean value ± SD)	
N0	
Récurrence	
Oui vs Non	NS (p = 0.6)
Décès	NS

Relation entre les facteurs pronostiques cliniques et histologiques et la ploïdie (diploïde vs non diploïde) dans les cancers endométriaux.

5. Clustering.

Lorsqu'on dispose d'une quantité importante de données biologiques, l'utilisation d'une technique d'analyse non supervisée telle que le clustering permet d'organiser et de regrouper ces données en ensembles informatifs [218]. Nous avons débuté une analyse de ce type en l'appliquant aux 50 patientes atteintes de cancer de l'endomètre afin de dégager, au sein des données colligées dans notre travail, les marqueurs les plus pertinents sur le plan pronostic. Nous ne disposons pour l'instant que de résultats préliminaires.



Résultats préliminaires obtenus par la technique du clustering à partir des données extraites pour les 50 patientes atteintes de cancer de l'endomètre de notre série.

En abscisse : les marqueurs biologiques ; en ordonnée : les différentes patientes.

Les différents pixels à l'intérieur de cette représentation schématique correspondent à l'expression relative des différents marqueurs biologiques testés (vert = expression faible, rouge = surexpression).

La barre verticale bleue correspond aux stades du cancer (bleu clair : stades précoces I et II, bleu foncé : stades avancés III et IV).

Synthèse des résultats et Discussion.

V. SYNTHÈSE DES RESULTATS ET DISCUSSION.

Les résultats des études déjà publiées portant sur les altérations moléculaires et génétiques impliquées dans la carcinogenèse endométriale sont souvent contradictoires et montrent à quel point ce processus est complexe et diversifié. Les cancers de l'endomètre regroupent des formes variées sur le plan histologique (endométriïde, séreux, cellules claires) et dont les voies moléculaires de carcinogenèse diffèrent. Comme pour d'autres cancers, croissance tumorale et progression sont conditionnées par les altérations des oncogènes et des gènes suppresseurs de tumeurs qui surviennent dans ce processus multi-étapes et induisent un déséquilibre entre prolifération et apoptose.

Nous avons exploré une partie des aspects de la **carcinogenèse endométriale** en évaluant à la fois l'implication des MMPS et des TIMPs dans la prolifération et l'invasion tumorales et les altérations génétiques de TP53 dans une série de lésions précancéreuses et de cancers de l'endomètre. L'analyse cytogénétique des cancers de l'endomètre par hybridation in situ en fluorescence (FISH) peut apporter d'importantes informations sur la présence ou non d'altérations d'oncogènes ou de gènes suppresseurs de tumeur [219]. L'évaluation de l'impact de l'amplification ou de la délétion de ces gènes sur les caractéristiques et le comportement des tumeurs peut être faite en combinant ce type d'analyse génétique à l'analyse immunohistochimique de l'expression des protéines. Cette combinaison permet en théorie de mieux comprendre les relations entre les altérations génétiques et les modifications induites sur l'expression protéique.

Nous avons également cherché à évaluer, dans cette série, l'intérêt **pronostic** des marqueurs biologiques étudiés. En effet, les paramètres histopronostiques habituellement utilisés dans le cancer de l'endomètre se révèlent insuffisants dans certains cas pour prédire de façon pertinente le risque de récurrence et/ou de décès parmi les patientes atteintes de CE, en particulier dans les formes précoces (stades I ou II) ou dans les formes bien différenciées. Par ailleurs, l'évaluation du risque d'atteinte ganglionnaire est imparfaite en période préopératoire et ce malgré l'utilisation de l'IRM. Même si le stade clinique est corrélé au devenir, il reste mal corrélé à l'évolution de la maladie dans près d'un tiers des cas [8, 182]. L'expression des gélatinases A et B, peu évaluée dans les cancers de l'endomètre, a été étudiée dans d'autres tumeurs solides et est étroitement corrélée dans certains cas au pronostic de la maladie.

- **Expression des MMPs et TIMPs dans l'endomètre normal, l'hyperplasie et le cancer endométriaux.**

Notre travail montre l'existence d'un continuum dans l'expression des MMPs et TIMPs étudiés entre l'hyperplasie endométriale et le carcinome endométrial. Par ailleurs, l'expression de MMP-2 et TIMP-2 est corrélée au grade et au type histologiques des CE ainsi qu'à certains autres facteurs pronostics cliniques et histologiques.

Endomètre normal.

MMP-2 est exprimée durant le cycle menstruel dans l'endomètre normal à un niveau élevé dans les cellules épithéliales pendant la phase proliférative et dans les cellules stromales pendant la phase sécrétoire. Ces résultats sont conformes à ceux publiés dans d'autres études qui montrent une expression différentielle des MMPs et des TIMPs tout au long du cycle menstruel suggérant que ces protéines subissent une régulation hormonale [21, 220, 221]. A l'inverse de MMP-2, peu de données sont disponibles concernant l'expression de MMP-7 (MMP spécifiquement sécrétée par les cellules épithéliales) au cours du cycle menstruel normal.

Dans notre expérience, l'expression de **MMP-7** était significativement plus élevée au cours de la phase proliférative. Ces résultats sont en accord avec les études antérieures attribuant à cette MMP un rôle de dégradation des débris intraluminaux au début de la phase proliférative et suggérant un contrôle de l'expression de MMP-7 par la progestérone [21, 222-224]. Bruner-Tran et al. ont suggéré que cette capacité de la progestérone à inhiber l'expression de la MMP-7 au niveau endométrial nécessitait la coopération locale de TGF β [225]. En plus de certains facteurs de croissance, il a été montré que l'activité des MMPs était également régulée par des cytokines et des facteurs angiogéniques [14, 21, 41, 226].

Pour les cellules épithéliales, nous n'avons pas observé de différence d'expression de **MMP-9** entre les 2 phases du cycle. Nous n'avons cependant pas analysé de prélèvement endométrial en phase menstruelle; or Goffin et al. ont bien montré le rôle crucial de la MMP-9 au cours de la menstruation avec une augmentation significative de son ARNm, et une synthèse plus faible au cours des phases proliférative et sécrétoire [21, 222].

Dans ce travail, nous n'avons pas observé de différence d'expression de **TIMP-1** au niveau des cellules épithéliales au cours du cycle menstruel. Cependant, dans les cellules stromales, l'expression de TIMP-1 était plus élevée en phase proliférative qu'en phase

sécrétoire. Pour **TIMP-2**, l'expression était plus élevée dans les cellules épithéliales en phase proliférative par rapport à la phase sécrétoire alors que nous n'avons observé aucune différence entre les 2 phases dans le compartiment stromal. Ces résultats confirment une expression séquentielle des MMPs et des TIMPs entre les compartiments épithélial et stromal tout au long du cycle.

Endomètre hyperplasique.

Il y a peu de publications concernant l'expression des MMPs et TIMPs dans l'hyperplasie de l'endomètre. Nous avons observé une expression significativement plus faible de TIMP-2 dans les cellules épithéliales des hyperplasies atypiques (HA) comparées aux hyperplasies simples (HS). De plus, nous avons noté une tendance significative à l'augmentation de l'expression de MMP-2 entre HS et HA. Ces résultats suggèrent l'implication des MMPs et TIMPs dans la physiopathologie des lésions précurseur des CE. Ces résultats sont en accord avec ceux publiés par Uzan et al. qui ont montré l'augmentation significative de l'expression de MMP-2 avec l'accroissement de l'agressivité des lésions endométriosiques [227]. Cependant, ces résultats sont en désaccord avec ceux publiés par Maatta et al. qui n'ont pas montré de différence significative dans l'expression des MMPs et TIMPs entre les 2 formes d'hyperplasie, simple et atypique [228]. Ces auteurs, qui ont utilisé une technique d'hybridation in situ, n'ont cependant analysé que 6 prélèvements d'hyperplasie endométriale. Il y a également très peu de données concernant l'expression des MMPs et TIMPs dans le compartiment stromal des lésions hyperplasiques de l'endomètre. Soini et al. ont observé une expression variable de l'ARNm de MMP-2 dans les cellules stromales de l'endomètre hyperplasique et néoplasique, et ces données sont insuffisantes pour en déduire le rôle précis des MMPs et TIMPs dans la physiopathologie des lésions endométriales [221]. Aucune donnée n'est disponible concernant l'expression de TIMP-2 dans les cellules stromales de l'endomètre hyperplasique. Dans notre série nous avons, comme dans le compartiment épithélial, observé une baisse significative de l'expression de TIMP-2 dans les cellules stromales des hyperplasies endométriales avec atypie comparées aux hyperplasies endométriales simples.

Endomètre tumoral.

Dans notre travail, d'une part l'expression de TIMP-2 permet de distinguer l'hyperplasie endométriale avec atypie de l'hyperplasie simple et d'autre part l'expression de MMP-2, -7 et -9 permet de distinguer l'hyperplasie avec atypies du cancer endométrioïde de

l'endomètre. Ces résultats suggèrent une fois de plus l'existence d'un continuum dans l'expression des MMPs et des TIMPs entre l'endomètre hyperplasique et l'endomètre tumoral, ce qui est souligné dans la publication de Soini [221]. De plus, comme nous l'avons souligné, il n'existe pas de consensus anatomopathologique permettant de distinguer formellement, sur des critères morphologiques, les hyperplasies simples complexes des hyperplasies atypiques. Dans ce contexte, l'adjonction de l'évaluation de TIMP-2 par IHC pourrait aider à une meilleure discrimination et ainsi contribuer à une meilleure définition de la stratégie thérapeutique. La transformation maligne des lésions précancéreuses de l'endomètre survient dès lors que l'accumulation d'altérations génétiques est suffisante pour permettre l'invasion du stroma adjacent [28]. L'augmentation de l'expression des metalloprotéinases pourrait participer à ce processus invasif comme semblent le montrer nos résultats.

L'expression de **MMP-2**, basée sur le pourcentage de cellules marquées, était plus faible dans les grades 1 que dans les grades 2 ou 3. Ces résultats sont comparables à ceux observés dans d'autres types de cancers comme le cancer de l'estomac [229], du poumon [230, 231], ou du sein [232].

Il est difficile de comparer nos données à celles des travaux antérieurs sur l'expression des MMPs et des TIMPs dans le CE du fait des différences quant aux techniques d'IHC utilisées et des différences observées dans l'expression des résultats. En effet, Aglund et al. considèrent un prélèvement positif lorsque plus de 20% des cellules sont marquées alors que Moser et al. utilisent comme critère de positivité un « marquage fort et étendu » [48, 233].

Nous avons observé que l'augmentation de l'expression de MMP-2 était corrélée avec l'existence de métastases ganglionnaires et tendait à être associée au degré d'invasion myométriale. Nos résultats sont en accord avec les travaux déjà publiés qui établissent une relation entre l'expression de MMP-2 et l'extension locale et à distance des cancers de l'endomètre [234, 235] et qui attribuent à MMP-2 un rôle majeur dans le comportement des CE [38, 236]. La MMP-2 est exprimée près du front d'invasion tumorale où elle est co-exprimée avec MT1-MMP [228]. Un travail récent montre la corrélation entre l'expression de MMP-2 dans les CE et la survie globale bien que les facteurs histopronostiques classiques soient mieux corrélés à l'analyse de la survie [237]. Néanmoins, comme dans notre étude, certaines publications ont souligné l'absence de relation entre l'expression de MMP-2 dans le CE et le stade FIGO, la présence d'emboles lymphovasculaires et la survie sans récurrence [48, 50, 233]. Sur une lignée de cellules de CE (Ishikawa), DiNezza et al. ont montré qu'un

traitement par la progestérone réduisait de façon significative la sécrétion de pro-MMP-2 et -9 et de MMP-2 par les cellules tumorales [238].

L'expression de **TIMP-2** était plus faible dans les cancers séreux que dans les cancers endométrioïdes ou les cancers sous tamoxifène. C'est le premier travail qui rapporte une expression différentielle de TIMP-2 selon le type histologique de CE. Dans une revue de la littérature concernant les facteurs pronostics des cancers de l'endomètre, Prat rappelle que le taux de mortalité est plus élevé dans les CE de type II (non estrogéno-dépendants) correspondant essentiellement aux cancers séreux et à cellules claires que dans les CE de type I (estrogéno-dépendants) correspondant aux cancers endométrioïdes [2]. Nos résultats suggèrent une expression différentielle de TIMP-2 dans les cancers estrogéno-dépendants et non estrogéno-dépendants. Nous avons d'ailleurs mis en évidence une corrélation entre l'expression de TIMP-2 et de RE α ($p=0.002$) et de RPA ($p<0.0001$) et de RPB ($p=0.0006$). Dans d'autres types de cancers, un niveau faible d'expression de TIMP-2 est corrélé à certains facteurs d'agressivité [239-243]. Dans notre étude, l'agressivité particulière des CE séreux pourrait être liée en partie à la faible expression de TIMP-2 dans ces formes et à une modification défavorable du ratio MMP-2/TIMP-2. Nous avons également observé une relation entre la diminution d'expression de TIMP-2 et l'augmentation des grades histologiques des CE. Ces données sont en accord avec les résultats d'une étude récente portant sur le profil d'expression génique des CE et qui utilise une technique de microarrays montrant une diminution de l'expression de TIMP-2 dans les tumeurs de grades élevés [244]. Ainsi, un haut niveau d'expression de MMP-2 et un faible niveau d'expression de TIMP-2 identifient un sous-groupe de CE ayant un comportement particulièrement agressif. Ces données montrent que l'équilibre entre les MMPs et leurs inhibiteurs dans le microenvironnement local module leur activité protéolytique [226].

Dans l'endométriose, Uzan et al. ont retrouvé une corrélation négative entre l'expression de MMP-2 et de TIMP-2 avec l'augmentation de l'agressivité des lésions [227]. La même constatation a été faite dans les CE par Moser et al. [48]. D'autres auteurs ont montré que l'expression des TIMPs était corrélée au grade histologique dans les CE [51, 221, 228, 234]. Néanmoins, nos résultats sont comparables à ceux observés dans d'autres cancers comme les carcinomes hépatocellulaire [241, 243], vésiculaire [240], colorectal [239], et le cancer du sein [242] démontrant une diminution de l'expression de TIMP-2 parallèlement à l'augmentation de l'agressivité des tumeurs. Cependant, on connaît, outre le rôle de TIMP-2 dans l'inhibition des MMPs et de MMP-2 en particulier, d'autres rôles biologiques des TIMPs qui sont capables de moduler la croissance cellulaire par une voie indépendante des MMPs

[123, 245]. On sait par ailleurs que de faibles taux de TIMP-2 activent MMP-2 par l'intermédiaire de MT1-MMP (MMP-14) alors que des taux élevés de TIMP-2 inhibent MMP-2 [79].

Nous avons aussi mis en évidence une relation significative entre la diminution d'expression de TIMP-2 et l'invasion myométriale, la présence d'emboles lymphovasculaires et l'existence de métastases ganglionnaires alors que Moser et al. n'ont pas établi de relation entre l'expression de TIMP-2 et les facteurs pronostics histologiques ou la survie globale dans les CE [48]. Cette différence peut être liée au fait que ces auteurs formulent leurs résultats sur la seule base d'une analyse qualitative de l'expression des MMPs et TIMPs.

Peu de données sont disponibles sur l'expression de **MMP-7** et son rôle dans les CE alors que l'on sait que cette MMP (matrilysine) est exprimée dans les cancers de la tête et du cou, dans les cancers du poumon et de l'ovaire [246-248]. Contrairement aux autres membres de la famille des MMPs, la MMP-7 ne possède pas le domaine hémapexine à la partie COOH-terminale conférant une forte activité protéolytique de dégradation de la matrice extracellulaire [224]. Deux études préalables se sont intéressées à l'expression de MMP-7 dans le CE et ont montré une relation entre l'expression élevée de MMP-7 et l'extension métastatique ganglionnaire et la survie sans récurrence [52, 249]. Nous avons également mis en évidence une relation entre l'augmentation de l'expression de MMP-7 et la présence d'emboles lymphovasculaires ($p=0.05$). Ces résultats vont dans le sens de ceux exprimés dans la publication de Wang et al. montrant que la MMP-7 dans le cancer de l'ovaire peut également activer les pro-gélatinases (pro-MMP-2 et pro-MMP-9) et ainsi faciliter l'invasion tumorale et l'extension métastatique [248].

Hormis l'endomètre décidualisé, Soini et al n'ont pas retrouvé d'ARNm de **MMP-9** dans l'endomètre non néoplasique mais en ont mis en évidence dans le CE suggérant, comme d'autres, le rôle probablement important de cette MMP dans l'invasion tumorale [49, 221]. En utilisant une technique de zymographie sur le produit de lavage utérin et par une analyse ROC (*receiver-operator characteristics*), Lopata et al. ont montré que la surexpression de MMP-9 (seuil > 3) avait une sensibilité et une spécificité de 98% et 91% respectivement pour le diagnostic de cancer endométrial [250]. D'autres publications ont suggéré l'existence d'une relation entre la surexpression de MMP-9 et l'envahissement ganglionnaire, le stade FIGO de la maladie ou le grade histologique [50, 233, 235]. Dans notre série, malgré un niveau d'expression élevé de cette MMP observé pour l'ensemble des cancers, nous n'avons pas pu mettre en évidence de relation entre son expression et les

facteurs pronostics cliniques ou histologiques étudiés ce qu'ont également observé Inoue et al. [9]. Ces différences pourraient s'expliquer par les différences dans la taille des séries, par l'absence de consensus quant à l'expression de l'immunomarquage et par l'utilisation de techniques de zymographie pour certaines de ces études.

A l'opposé de ce que l'on observe pour l'endomètre normal [14, 21, 220, 222, 251], peu de données concernant l'expression de TIMP-1, *in vitro* ou *in vivo*, sont disponibles pour le cancer de l'endomètre [50, 51, 228, 234]. Nous avons observé que l'expression de TIMP-1 avait tendance à diminuer avec l'augmentation du grade histologique des tumeurs sans toutefois atteindre la significativité sur le plan statistique. A l'inverse, Guo et al. ont rapporté une augmentation de l'expression de TIMP-1 avec l'augmentation du grade des tumeurs endométriales [234]. Néanmoins, nos données sont concordantes avec d'autres études retrouvant également une relation entre la diminution de l'expression de TIMP-1 et certains facteurs pronostics histologiques [50, 51].

Il convient cependant de rappeler les limites de l'analyse quantitative en IHC, même si l'analyse d'images réduit les variations inter- ou intra-observateurs. Plusieurs facteurs peuvent moduler le marquage IHC : type de fixateur utilisé, délai entre la réception de la pièce et sa fixation, qualité de la préservation des antigènes dans le bloc inclus en paraffine, type d'anticorps utilisé (clone) et sa dilution, méthode de démasquage enzymatique, chromogène utilisé, interprétation des résultats et utilisation de seuils [252].

L'analyse immunohistochimique des MMPs et des TIMPs et sa quantification sont également controversées [48, 50, 52, 233, 252, 253]. Différents auteurs [52, 233] formulent leur conclusion à partir du pourcentage moyen de cellules marquées alors que Di Nezza et al. [50] utilisent un système de score prenant en compte à la fois le pourcentage de cellules marquées et l'intensité du marquage (côté de 0 à 3) (H-score). Nous avons ainsi comparé les 2 approches et avons mis en évidence une bonne corrélation de ces 2 techniques pour l'expression de chacune des protéines étudiées.

Les limites de notre travail tiennent non seulement à l'effectif de la série mais également aux techniques utilisées. En effet, nous n'avons pas pu réaliser d'analyse zymographique qui aurait permis d'évaluer les seules formes actives des MMPs et TIMPs. La taille de l'échantillon pourrait également expliquer l'absence de corrélation entre l'expression de certaines de ces protéines et les paramètres cliniques et histologiques considérés. Néanmoins, l'analyse immunohistochimique garde un intérêt particulier car elle peut être effectuée sur des prélèvements fixés au formol et inclus en paraffine conservés pendant

plusieurs années, ce qui autorise un diagnostic histopathologique reproductible, et qu'elle permet une localisation précise de l'expression des métalloprotéinases. De plus, l'utilisation d'une procédure automatisée (Nexes, Ventana®) dans notre travail permet l'obtention de résultats comparables et reproductibles.

La standardisation des techniques d'immunohistochimie et l'évaluation des procédures sont nécessaires pour étudier et clarifier le rôle et l'interaction des MMPs et TIMPs dans les mécanismes complexes de carcinogenèse endométriale et pour mieux comprendre leur implication dans la progression locale et à distance des tumeurs endométriales [254]. Par ailleurs, seule une étude statistique univariée a été utilisée. Les résultats montrant l'interaction des différentes MMPs et TIMPs dans la carcinogenèse justifieraient une analyse multivariée.

Une interaction et une coopération étroites entre les compartiments épithélial et stromal sont nécessaires dans le mécanisme d'invasion tumorale et semblent jouer un rôle crucial dans la progression du cancer [226]. Des études *in vitro* ont montré que la synthèse des MMPs s'effectuait dans le compartiment stromal et qu'elles étaient secondairement, sous contrôle paracrine exercé en particulier par les intégrines, transloquées des cellules stromales vers les cellules épithéliales [236]. Néanmoins, il ne nous a pas été possible dans ce travail d'analyser l'expression stromale des MMPs et TIMPs dans les cancers de l'endomètre.

En complément des MMPs et TIMPs évalués dans ce travail, de récentes études ont montré le rôle d'autres métalloprotéinases dans la progression tumorale, comme par exemple la MMP-26. La MMP-26, en clivant et en inactivant l'*α1-antitrypsin serpin* favorise la dégradation de la matrice extracellulaire des tumeurs estrogénodépendantes et contribue à la progression de la maladie cancéreuse [255]. Dans le cancer de la prostate, Zhao et al ont montré que la MMP-26 était capable d'activer la pro-MMP-9 facilitant ainsi le clivage de la fibronectine par la MMP-9. De plus, la MMP-9 activée par la MMP-26 semble plus stable que celle activée par la MMP-7 [256].

- **Expression de bcl-2 et p53 dans les hyperplasies et les cancers de l'endomètre.**

Bcl-2 bloque l'apoptose induite par différents stimuli sans affecter la prolifération cellulaire. L'expression cyclique de bcl-2 dans l'endomètre a été montrée, ce que nous avons également observé dans notre travail (différence significative d'expression entre les phases

proliférative et sécrétoire dans l'endomètre normal) et cette régulation est sous dépendance hormonale, la progestérone inhibant l'expression de bcl-2 [148]. Dans notre série, l'expression de bcl-2 était significativement plus élevée dans l'endomètre normal que dans l'hyperplasie et le cancer et ceci est conforme aux travaux déjà publiés [257]. Nous n'avons pas observé de différence significative de l'expression de bcl-2 entre cancers endométrioïdes et séreux, néanmoins les cancers séreux montrent un marquage plus hétérogène et moins intense que les cancers endométrioïdes. Ces différences d'expression laissent supposer que les altérations bcl-2 sont des anomalies survenant précocement dans la carcinogenèse endométriale [30]. Les tumeurs contenant des cellules transformées pour bcl-2 augmentent leurs chances d'acquérir d'autres anomalies génétiques pour aboutir à leur transformation cancéreuse. Dès lors cette transformation acquise, bcl-2 pourrait être inactivée par des mécanismes cellulaires qui modifient ou diminuent son expression.

Les travaux de la littérature évaluant le rôle pronostic de bcl-2 sont contradictoires. Ces différences peuvent s'expliquer par la sensibilité de l'anticorps utilisé, la technique d'IHC utilisée, la sélection des patientes, et les seuils de positivité définis. Néanmoins, la plupart des travaux publiés concluent à l'absence de rôle pronostic de bcl-2 dans le cancer de l'endomètre, ce qui est également le cas dans notre travail.

Dans la littérature, **p53** est exprimé dans 10 à 15 % des stades précoces (I-II) versus 40 à 50% des stades avancés (III-IV) [148]. De la même façon, p53 est surexprimée dans les cancers de type II (séreux) par rapport aux cancers de type I (endométrioïdes) ce que nous avons également observé dans notre travail [258]. La différence d'expression de la protéine p53 entre ces 2 types histologiques de cancer ne tient pas seulement au niveau d'expression de la protéine mais est également liée à l'origine et à la chronologie des anomalies génétiques [201]. Dans les cancers séreux, l'augmentation de l'expression de la p53 est liée aux mutations de cette protéine et à sa perte de fonction (protéine mutante). Lorsque TP53 est muté, la production de p53 mutée devient prédominante et conduit à la délétion de l'allèle sauvage [208]. Dans les cancers endométrioïdes, cette augmentation d'expression, qui peut s'observer en l'absence de toute mutation, peut être liée au changement conformationnel post-transcriptionnel de la protéine sauvage [259].

L'absence de différence significative d'expression de p53 entre hyperplasie atypique (lésion précurseur) et cancer endométrioïde (en particulier dans les stades précoces) suggère également la survenue tardive des altérations de p53 dans la pathogénie des tumeurs

endométrioides alors qu'elles surviennent précocement dans les cancers séreux (et sont observées dans les lésions précurseurs de type EIC) [181]. Nous avons observé dans l'un des cas de cancer séreux de notre série une importante immunoréactivité de l'endomètre atrophique jouxtant l'endomètre tumoral.

Les résultats que nous avons obtenus par FISH vont également dans ce sens. En effet, nous avons observé 80% de perte d'hétérozygotie de TP53 dans les CE séreux et seulement 25% dans les CE endométrioides. Les résultats du travail de Williams et al., l'une des seules publications à notre connaissance concernant l'étude de TP53 par FISH dans le CE (47 patientes) a montré sur des isolats cellulaires issus de prélèvements congelés et en comptant 100 cellules par prélèvement que l'anomalie la plus fréquemment rencontrée était la perte d'hétérozygotie [208]. Il ne semble pas y avoir, dans cette étude, de relation simple entre l'existence d'anomalies génétiques et l'hyperexpression protéique. De la même façon, dans un travail portant sur 42 patientes, Semczuk ne retrouve pas de relation entre la perte d'hétérozygotie de TP53 évaluée par PCR et la surexpression protéique de p53 évaluée en IHC [260]. Nous avons fait le même constat.

Inoue et al. ont analysé la p53 en IHC dans une série de 139 cancers de l'endomètre [261]. La surexpression de p53 était associée aux stades avancés, aux grades élevés, et à une diminution de la survie mais la p53 n'était pas un facteur pronostic indépendant. Ito et al. utilisant une technique similaire et travaillant sur une cohorte de 221 cancers de l'endomètre a montré que la surexpression de p53 était associée à des facteurs de mauvais pronostic [262]. Hamel et Engelsen ont quant à eux montré que la surexpression de p53 était corrélée à un taux plus faible de survie sans récurrence, mais aussi à d'autres paramètres pronostiques cliniques et histologiques tels que le stade clinique, le grade histologique (ce que nous avons également mis en évidence dans notre série), le degré d'invasion myométriale, le sous-type histologique (ce qui est également le cas dans notre série), la ploïdie et à l'hyperexpression de HER-2/neu [263, 264]. La surexpression de p53 serait plus fréquente chez les patientes atteintes de CE et qui sont de race noire, ce qui pourrait expliquer le taux de mortalité plus important dans ce groupe de patientes, bien qu'un diagnostic plus tardif puisse également intervenir [265].

Il semble cependant ne pas y avoir de relation simple entre l'expression de p53 et l'agressivité des cancers de l'endomètre [165]. Cela peut s'expliquer par l'existence de certaines mutations de TP53 qui sont responsables de la production d'une protéine mutée tronquée non détectable en IHC et par l'utilisation de techniques non standardisées avec des seuils de positivité non consensuels mais aussi par l'existence de plusieurs mécanismes de

régulation de l'expression et de l'activité de la protéine p53, ce qui peut limiter l'intérêt de l'analyse moléculaire du gène TP53 [172]. En revanche, cela permet de souligner tout l'intérêt de l'analyse fonctionnelle de la protéine p53 en y associant l'analyse de mdm-2. L'analyse par FISH de p53 en mettant en évidence une éventuelle perte d'hétérozygotie ne semble pas apporter d'information pronostique supplémentaire par rapport à l'IHC.

Dans un article de synthèse sur le rôle pronostic de p53, un modèle statistique associant 3 variables biologiques (p53 et Ki67 exprimés en IHC, et la ploïdie) permet d'individualiser un groupe à haut risque de récurrence ou de décès lié au CE [8]. Ces marqueurs biologiques, pouvant être évalués en pré-opératoire sur produit de curetage ou de biopsie par IHC et analyse d'images, permettraient d'orienter la stratégie chirurgicale et le traitement post-opératoire [258].

La standardisation des techniques d'immunohistochimie et la définition consensuelle de seuils de positivité semblent là aussi être indispensables pour déterminer le véritable rôle pronostic de p53 dans les cancers de l'endomètre.

- **Ploïdie.**

La ploïdie peut être évaluée de 2 façons différentes : la cytométrie de flux (*Flow Cytometry Measurement* = FCM) et l'analyse d'images (*Imaging Cytometry Measurement* = ICM). La FCM analyse un nombre plus élevé de noyaux mais ne peut séparer les cellules normales des cellules tumorales dans le prélèvement. A l'inverse, l'ICM permet d'analyser les seules cellules tumorales mais en nombre plus restreint. Certaines études ont montré plus de 80% de concordance entre les résultats exprimés par les 2 techniques et ont souligné le fait que les petites populations cellulaires aneuploïdes détectées par l'analyse d'images étaient négligées par la cytométrie en flux [266].

L'intérêt de l'étude de la ploïdie peut être diagnostique et pronostic. L'analyse de la ploïdie peut servir à établir le diagnostic différentiel entre tumeur maligne et lésion précurseur comme par exemple dans les dysplasies de l'épithélium gastrique où les lésions aneuploïdes progressent plus fréquemment vers les tumeurs malignes que les lésions non aneuploïdes [267]. Il en est de même pour les lésions aneuploïdes « *borderline* » de l'ovaire qui montrent un risque plus élevé de récurrence et de métastases [267]. Dans l'hyperplasie endométriale, peu d'études ont été réalisées sur la ploïdie et la plupart d'entre elles ont été réalisées par FCM et comportent peu de patientes. Dans ce type de pathologie (hyperplasie), l'analyse d'images permettrait d'observer des anomalies plus fines et semble avoir une valeur

diagnostique plus élevée que la cytométrie en flux. Elle permettrait de distinguer avec une bonne sensibilité et une bonne spécificité les lésions d'hyperplasie simple, d'hyperplasie atypique et d'adénocarcinome lorsque l'analyse morphologique est difficile. La ploïdie peut être évaluée sur produit de curetage. Néanmoins, ces paramètres (ploïdie, volume nucléaire moyen, 5cEE (exceeding events)) ne doivent pas être considérés isolément mais doivent être intégrés à l'analyse histologique. Dans notre travail, nous n'avons pas observé de différence significative concernant la ploïdie entre HS et HA mais nous n'avons pas inclus d'autres paramètres que la ploïdie (contenu en ADN) dans l'analyse statistique.

L'intérêt de l'analyse de la ploïdie dans l'évaluation pronostique du CE a déjà été démontrée [268, 269]. Néanmoins, les études évaluant la corrélation entre la ploïdie et les facteurs pronostics cliniques et histologiques restent contradictoires. Dans l'étude de Lundgren portant sur 284 patientes présentant des CE de stade I, la ploïdie était le facteur prédictif de survie sans récurrence le plus important alors que dans l'étude d'Orbo, qui comporte 123 patientes atteintes de CE et une majorité de stade I (103 patientes / 123), la ploïdie n'a pas de rôle pronostic [266, 270]. Néanmoins, Larson dans un travail récent portant sur 208 CE a retrouvé 74% de tumeurs diploïdes et 26% de tumeurs non diploïdes et montré que les tumeurs non diploïdes étaient associées à un risque relatif (RR) de 4.5 d'extension ganglionnaire au niveau pelvien et à un RR de 5.8 d'extension ganglionnaire lomboaortique et qu'elles étaient également associées à une augmentation significative du risque de récurrence et à une diminution de la survie [268]. Dans une étude récente publiée par Susini et al., les mêmes constatations sont faites, et la survie des patientes dont les tumeurs étaient aneuploïdes était significativement plus faible que celle observée chez les patientes ayant des tumeurs diploïdes [271]. Dans notre étude, la ploïdie est corrélée à l'invasion myométriale, facteur de risque reconnu d'extension ganglionnaire.

- **Expression des récepteurs hormonaux.**

L'absence d'expression des récepteurs aux œstrogènes et à la progestérone semble être un processus précoce dans la carcinogenèse endométriale [148]. Si l'expression des RE dans le CE a déjà fait l'objet de nombreux travaux, l'expression des isoformes A et B du RP dans les hyperplasies et dans les cancers de l'endomètre est encore mal connue.

L'expression des RE augmente en passant de l'endomètre normal à l'hyperplasie endométriale pour décroître entre hyperplasie et cancer. L'évolution de l'expression des RP montre quant à elle une décroissance des valeurs entre l'hyperplasie et le cancer. Dans l'hyperplasie, l'expression IHC des récepteurs à la progestérone révèle l'excès d'estrogènes qui induisent l'augmentation de la transcription des RP [272]. L'expression des RE et des isoformes A et B des RP est dans notre travail significativement associée au type endométrioïde (type I). L'expression des isoformes A et B des RP est significativement plus faible dans les CE endométrioïdes de grades 3 comparés aux grades 1 et 2, et dans les CE séreux par rapport aux CE endométrioïdes [272].

L'intérêt pronostique de l'expression des récepteurs hormonaux dans le cancer de l'endomètre est discuté dans la littérature et leur évaluation dans le CE n'a pour l'instant pas le rôle majeur qu'on lui connaît dans le cancer du sein. Néanmoins, l'expression de ces récepteurs est la plupart du temps corrélée au grade histologique des tumeurs et à la survie [273-275]. L'expression des RP semble cependant apporter des informations pronostiques plus importantes que l'expression des RE comme le montre le travail de Fukuda où l'expression des isoformes A et B des RP est corrélée aux facteurs pronostics et à la survie [276]. L'expression de l'isoforme B serait la mieux corrélée au comportement agressif de ces cancers et semble associé au risque d'extension ganglionnaire [272, 277]. La perte d'expression de RP-A déséquilibre le rapport entre les 2 isoformes et la surexpression relative de RP-B, seul isoforme exprimé dans les lésions métastatiques, pourrait être liée au potentiel métastatique des tumeurs endométriales [278]. La perte d'expression des RP pourrait être liée à l'hyperméthylation des îlots CpG du promoteur [279].

- **Cancers de l'endomètre sous tamoxifène et cancers de type séreux.**

Les cancers de l'endomètre se développant sous traitement par tamoxifène ont fait l'objet de quelques études spécifiques afin de mieux comprendre les mécanismes moléculaires en cause dans leur développement. Des analyses par séquençage direct de l'ADN concernant PTEN, K-RAS, TP53, CTNNB1 et la recherche de microinstabilité n'ont pas permis de retrouver, sur les 29 CE sous tamoxifène étudiés, de profil particulier qui serait différent des CE sporadiques [280]. Les mêmes constatations ont été faites en utilisant l'étude du profil génique de ces cancers par microarrays [244]. Il ne semble donc pas s'agir d'un sous-groupe

biologique particulier. Néanmoins, les auteurs de cette dernière étude confirment l'existence de 2 types de CE au profil génétique différent correspondant aux formes déjà connues (type I et II). Le profil IHC des cancers sous tamoxifène de notre série ne diffère pas de celui des CE endométrioïdes, sauf pour l'expression de p53.

Récemment, Santin et al ont analysé HER2/neu par FISH et par IHC dans 26 cancers séreux papillaires de l'endomètre (CE de type II) et ont pu montrer que l'amplification de ce gène était un événement fréquent dans ce sous-type histologique [281]. Ils ont également observé une bonne corrélation entre les 2 techniques utilisées (plus de 80%) mais le comptage en FISH n'a porté que sur 20 noyaux pour chaque prélèvement.

- **Perspectives.**

A l'heure de la thérapie moléculaire ciblée, il est important de connaître précisément le comportement biologique et les profils d'expression des tumeurs que nous sommes amenés à traiter. Dans cette perspective, il nous paraît indispensable de poursuivre nos travaux sur un mode prospectif en utilisant d'autres outils permettant une analyse à plus large échelle tels que les tissue-microarrays, l'hybridation génomique comparative (CGH).

Aux facteurs déjà étudiés, il serait souhaitable d'associer, afin de rendre l'analyse des CE plus pertinente, l'étude de l'expression de MT1-MMP (ou MMP-14) qui est coexprimée avec MMP-2 (rôle d'activation de la pro-MMP-2) et l'étude de mdm-2 pour affiner l'analyse de l'expression de p53 sur le plan fonctionnel. L'étude des métalloprotéases pourrait également être complétée par l'utilisation de techniques de zymographie permettant de mieux appréhender et de déterminer plus précisément le rôle des formes actives de MMPs, MMP-2 et -9 en particulier, dans la progression et le pronostic de ces tumeurs. Enfin, sachant que l'on dispose aujourd'hui d'une thérapie ciblée anti-HER2-neu, l'implication de ce facteur sur le plan pronostic dans les CE, et en particulier dans les types II, mérite d'autres investigations. A partir de l'analyse de ces différents paramètres, la technique du clustering devrait permettre de dégager les facteurs prédictifs les plus importants sur le plan pronostic et qui devront être pris en compte sur le plan thérapeutique.

Conclusion.

Conclusion.

L'analyse moléculaire des cancers et de ses lésions précurseurs permet de compléter l'approche anatomopathologique, même si l'identification d'altérations génétiques n'amène que des connaissances fragmentaires avec des conséquences à de multiples niveaux de l'homéostasie cellulaire et tissulaire. La poursuite d'études permettant la description des profils d'expression génique plus ou moins spécifiques des différentes catégories de tumeurs en fonction de leur origine cellulaire et de leur niveau de progression est nécessaire. Il faut en effet pouvoir construire des schémas précis des différentes voies empruntées pour le processus oncogénique ce qui devrait permettre d'avancer dans la définition de nouvelles cibles. L'intégration de l'étude dynamique et fonctionnelle de ces processus est un pas de plus qu'il faudra franchir pour y parvenir.

Concernant les mécanismes de la carcinogenèse endométriale étudiés dans ce travail, nos résultats permettent de confirmer le rôle prépondérant de la perte d'hétérozygotie de TP53 dans le développement des cancers de type II.

Nos résultats suggèrent l'implication des métalloprotéinases et de leurs inhibiteurs dans le processus de carcinogenèse endométriale avec un profil d'expression différent dans l'hyperplasie et dans le cancer de l'endomètre. Par ailleurs, nous avons pu montrer que l'expression de MMP-2 et de TIMP-2 permettait de définir un sous-groupe de cancer de l'endomètre qui était particulièrement à risque d'extension locale et à distance.

Les données cliniques concernant l'expression des MMPs et en particulier des gélatinases A et B et de leurs inhibiteurs (TIMP-1 et -2) dans de nombreuses tumeurs solides montrent la place importante de ces enzymes protéolytiques dans l'acquisition d'un phénotype agressif corrélé à un pronostic défavorable bien qu'il y ait manifestement des variations significatives selon le type de cancer.

Nos constatations, combinées à l'analyse de la littérature, suggèrent également que l'évaluation conjointe de la ploïdie, de MMP-2 et TIMP-2, du Ki67 et de la p53 ainsi que des récepteurs hormonaux (E et P) pourraient être réalisés sur les prélèvements tissulaires avant de déterminer la thérapeutique définitive des patientes atteintes de cancer de l'endomètre.

En poursuivant nos travaux, nous espérons pouvoir, en sélectionnant une population à risque, mieux orienter la stratégie thérapeutique (chirurgie radicale, exploration ganglionnaire optimale) et déterminer les bonnes candidates aux essais thérapeutiques évaluant l'intérêt des traitements innovants dans cette pathologie (chimiothérapie pré- ou post-opératoire,

administration d'anticorps anti-HER2/neu récepteurs, thérapie génique) en attendant que l'analyse des cellules tumorales circulantes soit généralisée ou que les biopuces permettent d'établir le profil évolutif spécifique de chaque patiente atteinte de CE.

Références.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.

- [1] Purdie DM, Green AC. Epidemiology of endometrial cancer. *Best Practice Res Clin Obstet Gynaecol.* 2001;3:341-54.
- [2] Prat J. Prognostic parameters of endometrial carcinoma. *Hum Pathol.* 2004 Jun;35:649-62.
- [3] Creasman WT. Endometrial cancer: incidence, prognostic factors, diagnosis, and treatment. *Semin Oncol.* 1997 Feb;24:S1-140-S1-50.
- [4] Kurman RJ, Norris HJ. Evaluation of criteria for distinguishing atypical endometrial hyperplasia from well-differentiated carcinoma. *Cancer.* 1982 Jun 15;49:2547-59.
- [5] Mutter GL, Baak JP, Crum CP, Richart RM, Ferenczy A, Faquin WC. Endometrial precancer diagnosis by histopathology, clonal analysis, and computerized morphometry. *J Pathol.* 2000 Mar;190:462-9.
- [6] Silverberg SG. Problems in the differential diagnosis of endometrial hyperplasia and carcinoma. *Mod Pathol.* 2000 Mar;13:309-27.
- [7] Palacios J, Catusus L, Moreno-Bueno G, Matias-Guiu X, Prat J, Gamallo C. Beta- and gamma-catenin expression in endometrial carcinoma. Relationship with clinicopathological features and microsatellite instability. *Virchows Arch.* 2001 May;438:464-9.
- [8] Mariani A, Sebo TJ, Webb MJ, Riehle D, Katzmann JA, Keeney GL, *et al.* Molecular and histopathologic predictors of distant failure in endometrial cancer. *Cancer Detect Prev.* 2003;27:434-41.
- [9] Inoue M. Current molecular aspects of the carcinogenesis of the uterine endometrium. *Int J Gynecol Cancer.* 2001 Sep-Oct;11:339-48.
- [10] Jabbour HN. Endocrine regulation of menstruation. *Endocr Rev.* 2006 27:17-46.
- [11] Molenda H, K.C., Allen R, Tetel M. Nuclear receptor coactivator function in reproductive physiology and behavior. *Biol Reprod.* 2003;69:1449-57.
- [12] Saunders P. Estrogen receptor subtypes in the female reproductive tract. *Reprod Med Rev.* 2002;10:149-64.
- [13] Milne S. Prostaglandin (PG) F(2 α) receptor expression and signaling in human endometrium: role of PGF(2 α) in epithelial cell proliferation. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88:1825 - 32.
- [14] Salamonsen LA, Zhang J, Hampton A, Lathbury L. Regulation of matrix metalloproteinases in human endometrium. *Hum Reprod.* 2000 Aug;15 Suppl 3:112-9.
- [15] Tushaus L, Hopert AC, Strunck E, Schubert C, Wunsche W, Vollmer G. Estrogenic and antiestrogenic regulation of MMP-2 and MMP-13 mRNA in RUCA-I endometrial tumor cells in vitro and in vivo. *Cancer Lett.* 2003 Jul 30;198:99-106.
- [16] Nayak NR, Critchley HO, Slayden OD, Menrad A, Chwalisz K, Baird DT, *et al.* Progesterone withdrawal up-regulates vascular endothelial growth factor receptor type 2 in the superficial zone stroma of the human and macaque endometrium: potential relevance to menstruation. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:3442-52.
- [17] Ferenczy A, Bergeron C. Histology of the human endometrium: from birth to senescence. *Ann N Y Acad Sci.* 1991;622:6-27.
- [18] Ferenczy A, Guralnick M. Endometrial microstructure: structure function relationships throughout the menstrual cycle. *Semin Reprod Endocrinol* 1983;1:205-19.
- [19] Von Rango U, Classen-Linke I, Krusche CA, Beier HM. The receptive endometrium is characterized by apoptosis in the glands. *Hum Reprod.* 1998;13:3177-89.
- [20] Neulen J, Zahradnik HP, Flecken U, Breckwoldt M. Effects of estradiol-17beta and progesterone on the synthesis of prostaglandin F2alpha, prostaglandin E2 and prostaglandin I2 by fibroblasts from human endometrium in vitro. *Prostaglandins* 1998;988:17-30.

- [21] Goffin F, Munaut C, Frankenne F, Perrier D'Hauterive S, Beliard A, Fridman V, *et al.* Expression pattern of metalloproteinases and tissue inhibitors of matrix-metalloproteinases in cycling human endometrium. *Biol Reprod.* 2003 Sep;69:976-84.
- [22] Bokhman JV. Two pathogenetic types of endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol.* 1983;15:10-7.
- [23] Dietel M. The histological diagnosis of endometrial hyperplasia. Is there a need to simplify? *Virchows Arch.* 2001;439:604-8.
- [24] Horn LC, Meinel A, R. H, Einkenkel J. Histopathology of endometrial hyperplasia and endometrial carcinoma. An update. *Ann Diag Path.* 2007;11:297-311.
- [25] Clement PB, Young RH. Endometrioid carcinoma of the uterine corpus : a review of its pathology with emphasis on recent advances and problematic aspects. *Adv Anat Pathol.* 2002;9:145-84.
- [26] Mutter GL. Endometrial intraepithelial neoplasia (EIN): will it bring order to chaos? The Endometrial Collaborative Group. *Gynecol Oncol.* 2000 Mar;76:287-90.
- [27] Marsden DE, Hacker NF. Optimal management of endometrial hyperplasia. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2001 Jun;15:393-405.
- [28] Mutter GL, Lin MC, Fitzgerald JT, Kum JB, Baak JP, Lees JA, *et al.* Altered PTEN expression as a diagnostic marker for the earliest endometrial precancers. *J Natl Cancer Inst.* 2000 Jun 7;92:924-30.
- [29] Baloglu H, Cannizzaro LA, Jones J, Koss LG. Atypical endometrial hyperplasia shares genomic abnormalities with endometrioid carcinoma by comparative genomic hybridization. *Hum Pathol.* 2001 Jun;32:615-22.
- [30] Ioffe OB, Papadimitriou JC, Drachenberg CB. Correlation of proliferation indices, apoptosis, and related oncogene expression (bcl-2 and c-erbB-2) and p53 in proliferative, hyperplastic, and malignant endometrium. *Hum Pathol.* 1998 Oct;29:1150-9.
- [31] Hecht JL, Mutter GL. Molecular and pathologic aspects of endometrial carcinogenesis. *J Clin Oncol.* 2006;24:4783-91.
- [32] Semple D. Endometrial cancer. *Br J Hospit Med.* 1997;57:260-2.
- [33] Creutzberg CL, Van Putten WL, Warlam-Rodenhuis CC. Postoperative radiation therapy in endometrial carcinoma trial. Outcome of high-risk stage IC, grade 3, compared with stage I endometrial carcinoma patients. *J Clin Oncol.* 2004;22:1234-41.
- [34] Doll A, Abal M, Rigau M, Monge M, Gonzalez M, Demajo S. Novel molecular profiles of endometrial cancer—new light through old windows. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2008;108:221-9.
- [35] Benedet JL, Bender H, Jones H, 3rd, Ngan HY, Pecorelli S. FIGO staging classifications and clinical practice guidelines in the management of gynecologic cancers. FIGO Committee on Gynecologic Oncology. *Int J Gynaecol Obstet.* 2000 Aug;70:209-62.
- [36] Birkedal-Hansen H, Moore WG, Bodden MK, Windsor LJ, Birkedal-Hansen B, DeCarlo A, *et al.* Matrix metalloproteinases: a review. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1993;4:197-250.
- [37] Rodgers W. Matrix metalloproteinases and carcinogenesis. *Hum Pathol.* 1999 Apr;30:363-4.
- [38] Tamakoshi K, Kikkawa F, Nawa A, Ishikawa H, Mizuno K, Tamakoshi A, *et al.* Characterization of extracellular matrix-degrading proteinase and its inhibitor in gynecologic cancer tissues with clinically different metastatic form. *Cancer.* 1995 Dec 15;76:2565-71.
- [39] Wojtowicz-Praga SM, Dickson RB, Hawkins MJ. Matrix metalloproteinase inhibitors. *Invest New Drugs.* 1997;15:61-75.
- [40] Raza SL, Cornelius LA. Matrix metalloproteinases and their native or pharmacologic inhibitors. *Adv Dermatol.* 2000;16:185-208; discussion 9.

- [41] Van den Steen PE, Opdenakker G, Wormald MR, Dwek RA, Rudd PM. Matrix remodelling enzymes, the protease cascade and glycosylation. *Biochim Biophys Acta*. 2001 Oct 3;1528:61-73.
- [42] Woessner JF, Jr. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *Faseb J*. 1991 May;5:2145-54.
- [43] Chambers AF, Matrisian LM. Changing views of the role of matrix metalloproteinases in metastasis. *J Natl Cancer Inst*. 1997 Sep 3;89:1260-70.
- [44] Ray JM, Stetler-Stevenson WG. The role of matrix metalloproteases and their inhibitors in tumour invasion, metastasis and angiogenesis. *Eur Respir J*. 1994 Nov;7:2062-72.
- [45] Jones JL, Glynn P, Walker RA. Expression of MMP-2 and MMP-9, their inhibitors, and the activator MT1-MMP in primary breast carcinomas. *J Pathol*. 1999 Oct;189:161-8.
- [46] Maeta H, Ohgi S, Terada T. Protein expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 and tissue inhibitors of metalloproteinase 1 and 2 in papillary thyroid carcinomas. *Virchows Arch*. 2001 Feb;438:121-8.
- [47] Sakata K, Shigemasa K, Nagai N, Ohama K. Expression of matrix metalloproteinases (MMP-2, MMP-9, MT1-MMP) and their inhibitors (TIMP-1, TIMP-2) in common epithelial tumors of the ovary. *Int J Oncol*. 2000 Oct;17:673-81.
- [48] Moser PL, Kieback DG, Hefler L, Tempfer C, Neunteufel W, Gitsch G. Immunohistochemical detection of matrix metalloproteinases (MMP) 1 and 2, and tissue inhibitor of metalloproteinase 2 (TIMP 2) in stage IB cervical cancer. *Anticancer Res*. 1999 Sep-Oct;19:4391-3.
- [49] Turpeenniemi-Hujanen T. Gelatinases (MMP-2 and -9) and their natural inhibitors as prognostic indicators in solid cancers. *Biochimie*. 2005;87:287-97.
- [50] Di Nezza LA, Misajon A, Zhang J, Jobling T, Quinn MA, Ostor AG, *et al*. Presence of active gelatinases in endometrial carcinoma and correlation of matrix metalloproteinase expression with increasing tumor grade and invasion. *Cancer*. 2002 Mar 1;94:1466-75.
- [51] Laird SM, Dalton CF, Okon MA, Bunning RA, Marshall R, Li TC. Metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP-1) in endometrial flushings from pre- and post-menopausal women and from women with endometrial adenocarcinoma. *J Reprod Fertil*. 1999 Mar;115:225-32.
- [52] Ueno H, Yamashita K, Azumano I, Inoue M, Okada Y. Enhanced production and activation of matrix metalloproteinase-7 (matrilysin) in human endometrial carcinomas. *Int J Cancer*. 1999 Oct 22;84:470-7.
- [53] Gross J, CM. L. Collagenolytic activity in amphibian tissue: a tissue culture assay. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1962;48:1014-22.
- [54] Verma R, Hansch C. Matrix metalloproteinases (MMPs): chemical-biological functions and (Q)SARs. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. 2007;15:2223-68.
- [55] Visse R, H. N. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases : structure, function and biochemistry. *Circ Res*. 2003;92:827-39.
- [56] Folgueras AR, Pendas AM, Sanchez LM, Lopez-Otin C. Matrix Metalloproteinases in cancer : from new functions to improved inhibition strategies. *Int J Dev Biol*. 2004;48:411-24.
- [57] Nagase H, Woessner J. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem*. 1999;274:21491-4.
- [58] Shapiro SD. Matrix metalloproteinases degradation of extracellular matrix: biological consequences. *Curr Opin Cell Biol*. 1998;10:602-8.
- [59] Galant C, Eeckhout Y, Courtoy PJ, Henriot P, Marbaix E. Implication des métalloprotéases matricielles (MMPs) dans la menstruation et les métrorragies dysfonctionnelles. *Med Ther Endoc Reprod*. 2004;6:16-23.
- [60] Chakraborti S, Mandal M, Das S, Mandal A, Chakraborti T. Regulation of matrix metalloproteinases : an overview. *Mol Cell Biochem*. 2003;253:269-85.

- [61] Fini M, Cook J, Mohan R, Brinckerhoff., eds. Regulation of matrix metalloproteinase gene expression. Parks W, Mechan RP ed: San Diego, CA: Academic Press. 1998.
- [62] Matrisian LM. Metalloproteinases and their inhibitors in matrix remodeling. Trends Genet. 1990;6:121-5.
- [63] Toth M, Gervasi DC, Fridman R. Phorbol ester-induced cell surface association of matrix metalloproteinase-9 in human MCF10A breast epithelial cells. Cancer Res. 1997;57:3159-67.
- [64] Parsons SL, Watson SA, Brown PD, Collins HM, Steele RJ. Matrix metalloproteinases Br J Surg 1997;84:160-6.
- [65] Rooprai HK, McCormick D. Proteases and their inhibitors in human brain tumours: a review. Anticancer Res 1997;17:4151-62.
- [66] Tyagi SC. Proteinases and myocardial extracellular matrix turnover. Mol Cell Biochem. 1997;168:1-12.
- [67] Angel P, Imagawa M, Chiu R, Stein B, Imbra RJ, Rahmsdorf HJ, *et al.* Phorbol ester-inducible genes contain a common cis element recognized by a TPA-modulated trans-acting factor. Cell 1987;49:729-39.
- [68] Gaire M, Magbanua Z, McDonnell S, McNeil L, Lovett DH, Matrisian LM. Structure and expression of the human gene for the matrix metalloproteinase matrilysin. J Biol Chem. 1994;269:2032-40.
- [69] Benbow U, Rutter JL, Lowrey CH, Brinckerhoff CE. Transcriptional repression of the human collagenase-1 (MMP-1) gene in MDA231 breast cancer cells by all-trans-retinoic acid requires distal regions of the promoter. Br J Cancer. 1999;79:221-8.
- [70] Kirstein M, Sanz L, Quinones S, Moscat J, Diaz-Meco MT, Saus J. Cross-talk between different enhancer elements during mitogenic induction of the human stromelysin-1 gene. J Biol Chem. 1996;271:18231-6.
- [71] Delany A, Brinckerhoff C. Post-transcriptional regulation of collagenase and stromelysin gene expression by epidermal growth factor and dexamethasone in cultured human fibroblasts J Cell Biochem. 1992;50:400-10.
- [72] Overall C, Wrana J, Sodek J. Induction of formative and resorptive cellular phenotypes in human gingival fibroblasts by TGF-beta 1 and concanavalin A: regulation of matrix metalloproteinases and TIMP. J Periodontal Res 1991;26:279-82.
- [73] Murphy G, Stanton H, Cowell S, Butler G, Knauper V, Atkinson S. Mechanisms for pro matrix metalloproteinase activation AP-MIS 1999;107:38-44.
- [74] Nagase H. Activation mechanisms of matrix metalloproteinases. Biol Chem 1997;378:151-60.
- [75] Chen L, Noelken M, Nagase H. Disruption of the cysteine-75 and zinc ion coordination is not sufficient to activate the precursor of human matrix metalloproteinase 3 (stromelysin 1). Biochemistry. 1993;32:10289-95.
- [76] Van Wart H, Birkedal-Hansen H. The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. Proc Natl Acad Sci US A. 1990;87:5578-82.
- [77] Pepper M. Role of the matrix metalloproteinase and plasminogen activator plasmin systems in angiogenesis. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2001;21:1104-17.
- [78] Nie J, Pei D. Direct activation of pro-matrix metalloproteinase-2 by leukolysin/membrane-type 6 matrix metalloproteinase/matrix metalloproteinase 25 at the asn(109)-Tyr bond. Cancer Res. 2003;63:6758-62.
- [79] Lafleur M, Handsley MM, Edwards DR. Metalloproteinases and their inhibitors in angiogenesis. Exp Rev Mol Med. 2003;5:1-39.
- [80] Henriot P, Cornet PB, Lemoine P. Circulating ovarian steroids and endometrial matrix metalloproteinases. Ann N Y Acad Sci. 2002;955:119-38.

- [81] Marbaix E, Donnez J, Courtoy PJ, Eeckhout Y. Progesterone regulates the activity of collagenase and related gelatinases A and B in human endometrial explants. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89:11789-93.
- [82] Baker AH, Edwards DR, Murphy G. Metalloproteinase inhibitors : biological actions and therapeutic opportunities. *J Cell Sci*. 2002;115:3719-27.
- [83] Fernandez-Catalan C, Bode W, Huber R, Turk D, Calvete JJ, Lichte A. Crystal structure of the complex formed by the membrane type-1 matrix metalloproteinase with the tissue inhibitor of metalloproteinases-2, the soluble progelatinase A receptor. *EMBO J*. 1998;17:5238-48.
- [84] Gomis-Ruth FX, Maskos K, Betz M, Bergner A, Huber R, Suzuki K. Mechanism of inhibition of the human matrix metalloproteinase stromelysin-1 by TIMP-1. *Nature* 1997;389:77-81.
- [85] Lee M, Rapti M, Murphy G. Unveiling the surface epitopes that render tissue inhibitor of metalloproteinase-1 inactive against membrane-type 1 matrix metalloproteinase. *J Biol Chem*. 2003;278:40224-30.
- [86] Bond M, Murphy G, Bennett MR, Newby AC, Baker AH. Tissue inhibitor of metalloproteinase-3 induces a Fas-associated death domain dependent type II apoptotic pathway. *J Biol Chem* 2002;277:13787-95.
- [87] Hayakawa T, Yamashita K, Ohuchi E, Shinagawa A. Cell growth-promoting activity of tissue inhibitor of metalloproteinases-2 (TIMP-2). *J Cell Sci*. 1994;107 2373-9.
- [88] Murphy A, Unsworth E, Stetler-Stevenson W. Tissue inhibitor of metalloproteinases-2 inhibits bFGF-induced human microvascular endothelial cell proliferation. *J Cell Physiol* 1993;157:351-8.
- [89] Bronson RA, Fusi FM, Calzi F, Doldi N, Ferrari A. Evidence that a functional fertilin-like ADAM plays a role in human sperm-olemmal interactions. *Mol Hum Reprod*. 1999;5:433-40.
- [90] Nath D, Slocombe PM, Stephens PE, Warn A, Hutchinson GR, Yamada KM. Interaction of metargidin (ADAM-15) with alphavbeta3 and alpha5beta1 integrins on different haemopoietic cells. *J Cell Sci* 1999;112:579-87.
- [91] Wolfsberg TG, Bazan JF, Blobel CP, Myles DG, Primakoff P, White JM. The precursor region of a protein active in sperm-egg fusion contains a metalloprotease and a disintegrin domain: structural, functional, and evolutionary implications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90:10783-7.
- [92] DeClerk YA, Imren S. Protease inhibitors : role and potential therapeutic use in human cancer. *Eur J Cancer*. 1994;30A:2170-80.
- [93] Seo DW, Li H, Guedez L, Wingfield PT, Diaz T, Salloum R. TIMP-2 mediated inhibition of angiogenesis : an MMP independent mechanism. *Cell*. 2003;114:171-80.
- [94] Ahonen M, Baker AH, Kahari VM. Adenovirus-mediated gene delivery of tissue inhibitor of metalloproteinases-3 inhibits invasion and induces apoptosis in melanoma cells. *Cancer Res*. 1998;58 2310-5.
- [95] Jiang Y, Wang M, Celiker M, Liu Y, Sang Q, Goldberg I, *et al*. Stimulation of mammary tumorigenesis by systemic inhibitor of matrix metalloproteinase 4 gene delivery. *Cancer Res*. 2001;61:2365-70.
- [96] Hidalgo M, Eckhardt S. Development of matrix metalloproteinase inhibitors in cancer therapy. *J Natl Cancer Inst* 2001;93:178-93.
- [97] Hojilla C, Mohammed F, Khokha R. Matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors direct cell fate during cancer development. *Br J Cancer* 2003;89:1817-21.
- [98] Nelson AR, Fingleton B, Rothenberg ML, and Matrisian LM. Matrix metalloproteinases: biologic activity and clinical implications. *J Clin Oncol*. 2000;18:1135-49.

- [99] Fowlkes JL, Enghild JJ, Suzuki K, Nagase H. Matrix metalloproteinases degrade insulin-like growth factor-binding protein-3 in dermal fibroblast cultures. *J Biol Chem.* 1994;269:25742-6.
- [100] Manes S, Mira E, Barbacid MM, Cipres A, Fernandez-Resa P, Buesa JM. Identification of insulin-like growth factor-binding protein-1 as a potential physiological substrate for human stromelysin-3. *J Biol Chem* 1997;272:25706-12.
- [101] Boudreau N, Sympson CJ, Werb Z, Bissell MJ. Suppression of ICE and apoptosis in mammary epithelial cells by extracellular matrix. *Science* 1995;267:891-3.
- [102] Powell UC, Fingleton B, Wilson CL, Boothby M, Matrisian LM. The metalloproteinase matrilysin proteolytically generates active soluble fas ligand and potentiates epithelial cell apoptosis. *Curr Biol.* 1999;9:1441-7.
- [103] Lijnen HR, Uguw F, Bini A, Collen D. Generation of an angiostatin-like fragment from plasminogen by stromelysin-1 (MMP-3). *Biochemistry.* 1998;37:4699-702.
- [104] Patterson B, Sang Q. Angiostatin-converting enzyme activities of human matrilysin (MMP-7) and gelatinase B/type IV collagenase (MMP-9). *J Biol Chem.* 1997;272:28823-5.
- [105] Yoon SO, Park SJ, Yun CH, Chung AS. Roles of matrix metalloproteinases in tumor metastasis and angiogenesis. *J Biochem Mol Biol.* 2003;36:128-37.
- [106] Liotta LA, Tryggvason K, Garbisa S, Hart I, Foltz CM, Shafie S. Metastatic potential correlates with enzymatic degradation of basement membrane collagen. *Nature.* 1980;284:67-8.
- [107] Nabeshima K, Lane W, Biswas C. Partial sequencing and characterization of the tumor cell-derived collagenase stimulatory factor. *Arch Biochem Biophys* 1991;285:90-6.
- [108] Almholt K, Johnsen M. Stromal cell involvement in cancer. *Recent Results. Cancer Res.* 2003;162:31-42.
- [109] Basset P, Bellocq J, Wolf C, Stoll I, Hutin P, Limacher J, et al. A novel metalloproteinase gene specifically expressed in stromal cells of breast carcinomas. *Nature.* 1990;348:699-704.
- [110] Gilles C, Thompson EW. The epithelial to mesenchymal transition and metastatic progression in carcinoma. *Breast J* 1996;2:83-6.
- [111] Vaisanen A, Tuominen H, Kallioinen M, Turpeenniemi-Hujanen T. Matrix metalloproteinase-2 (72 kD type IV collagenase) expression occurs in the early stage of human melanocytic tumour progression and may have prognostic value. *J Pathol.* 1996;180:283-9.
- [112] MacDougall JR, Bani MR, Lin Y, Rak J, Kerbel RS. The 92-kDa gelatinase B is expressed by advanced stage melanoma cells: suppression by somatic cell hybridization with early stage melanoma cells. *Cancer Res.* 1995;55:4174-81.
- [113] Zinzindohoué F, Lecomte T, Laurent-Puig P. Métalloprotéases de la matrice extracellulaire et cancers du tractus digestif. *Gastroenterol Clin Biol* 2005;29:434-44.
- [114] Newell KJ, Witty JP, Rodgers WH, Matrisian LM. Expression and localization of matrix-degrading metalloproteinases during colorectal tumorigenesis. *Mol Carcinog.* 1994;10:199-206.
- [115] Seiki M. Membrane-type 1 matrix metalloproteinase: a key enzyme for tumor invasion. *Cancer Lett* 2003;194:1-11.
- [116] Itoh T, Tanioka M, Yoshida H, Yoshioka T, Nishimoto H, Itohara S. Reduced angiogenesis and tumor progression in gelatinase A-deficient mice. *Cancer Res.* 1998; 58:1048-51.
- [117] Wilson CL, Heppner KJ, Labosky PA, Hogan BL, Matrisian LM. Intestinal tumorigenesis is suppressed in mice lacking the metalloproteinase matrilysin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 Feb 18;94:1402-7.

- [118] Biswas C, Zhang Y, DeCastro R, Gui H. The human tumor cell derived collagenase stimulatory factor (renamed EMMPRIN) is a member of the immunoglobulin superfamily. *Cancer Res.* 1995;55:434-9.
- [119] Ronnov-Jessen L, Petersen OW. Induction of alpha smooth muscle actin by transforming growth factor type-beta 1 in quiescent human breast gland fibroblasts. Implications for myofibroblast generation in breast neoplasia. *Lab Invest* 1993;68:696-707.
- [120] Crawford HC, Fingleton BM, Rudolph-Owen LA, Goss KJ, Rubinfeld B, Polakis P. The metalloproteinase matrilysin is a target of beta-catenin transactivation in intestinal tumors. *Oncogene.* 1999;18:2883-91.
- [121] Lochter A, Galosy S, Muschler J, Freedman N, Werb Z, Bissell MJ. Matrix metalloproteinase stromelysin-1 triggers a cascade of molecular alterations that leads to stable epithelial-to-mesenchymal conversion and a premalignant phenotype in mammary epithelial cells. *J Cell Biol.* 1997;139:1861-72.
- [122] Bergers G, Coussens L. Extrinsic regulators of epithelial tumor progression: metalloproteinases. *Curr Opin Genet Dev* 2000;10:120-7.
- [123] Li M, Yamamoto H, Adachi Y, Maruyama Y, Shinomura Y. Role of matrix metalloproteinase-7 (matrilysin) in human cancer invasion, apoptosis, growth and angiogenesis. *Exp Biol Med.* 2006;231:20-7.
- [124] Martin DC, Fowlkes JL, Babic B, Khokha R. Insulin-like growth factor II signaling in neoplastic proliferation is blocked by transgenic expression of the metalloproteinase inhibitor TIMP-1. *J Cell Biol.* 1999;146:881-92.
- [125] Vargo-Gogola T, Fingleton B, Crawford HC, Matrisian LM. Matrilysin (matrix metalloproteinase-7) selects for apoptosis-resistant mammary cells in vivo. *Cancer Res* 2002;62:5559-63.
- [126] Folkman J. Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. *Semin Oncol* 2002;29:15-8.
- [127] Collen D, Lijnen H. Basic and clinical aspects of fibrinolysis and thrombolysis. *Blood* 1991;78:3114-24.
- [128] Roldan AL, Cubellis MV, Masucci MT, Behrendt N, Lund LR, Dano K. Cloning and expression of the receptor for human urokinase plasminogen activator, a central molecule in cell surface, plasmin dependent proteolysis. *EMBO J.* 1990;9:467-74.
- [129] Hotary K, Allen E, Punturieri A, Yana I, Weiss SJ. Regulation of cell invasion and morphogenesis in a three-dimensional type I collagen matrix by membrane-type matrix metalloproteinases 1, 2, and 3. *J Cell Biol Chem.* 2000;149:1309-23.
- [130] Collen A, Hanemaaijer R, Lupu F, Quax PH, van Lent N, Grimbergen J. Membrane-type matrix metalloproteinase-mediated angiogenesis in a fibrin-collagen matrix. *Blood.* 2003;101:1810-7.
- [131] Chan VT, Zhang DN, Nagaravapu U, Hultquist K, Romero LI, Herron GS. Membrane-type matrix metalloproteinases in human dermal microvascular endothelial cells: expression and morphogenetic correlation. *J Invest Dermatol* 1998;111:1153-9.
- [132] Mareel M, Leroy A. Clinical, cellular, and molecular aspects of cancer invasion. *Physiol Rev.* 2003;83:337-76.
- [133] Schultz RM, Silberman S, Persky B, Bajkowski AS, Carmichael DF. Inhibition by human recombinant tissue inhibitor of metalloproteinases of human amnion invasion and lung colonization by murine B16-F10 melanoma cells. *Cancer Res* 1988;48:5539-45.
- [134] Coussens LM, Tinkle CL, Hanahan D, Werb Z. MMP-9 supplied by bone marrow-derived cells contributes to skin carcinogenesis. *Cell.* 2000;103:481-90.
- [135] Martin M, Matrisian L. The other side of MMPs : protective roles in tumor progression. *Cancer Metastasis Rev.* 2007;26:717-24.

- [136] Vu T, Werb Z. Matrix metalloproteinases : effectors of development and normal physiology. *Genes Dev.* 2000;14:2123-33.
- [137] Witty JP, Lempka T, Coffey RJ, Matrisian LM. Decreased tumor formation in 7,12-dimethylbenzanthracene-treated stromelysin-1 transgenic mice is associated with alterations in mammary epithelial cell apoptosis. *Cancer Res.* 1995;55:1401-6.
- [138] Sheu BC, Hsu SM, Ho HN, Lien HC, Huang SC, Lin RH. A novel role of metalloproteinase in cancer-mediated immunosuppression. *Cancer Res.* 2001;61:237-42.
- [139] Belotti D, Paganoni P, Manenti L, Garofalo A, Marchini S, Taraboletti G. Matrix metalloproteinases (MMP-9 and MMP-2) induce the release of VEGF by ovarian carcinoma cells. *Cancer Res.* 2003;63:5224-9.
- [140] Ferreras M, Felbor U, Lenhard T, Olsen BR, Delaisse J. Generation and degradation of human endostatin proteins by various proteinases. *FEBS Lett.* 2000;486:247-51.
- [141] Hamano Y, Zeisberg M, Sugimoto H, Lively JC, Maeshima Y, Yang C. Physiological levels of tumstatin, a fragment of collagen IV alpha3 chain, are generated by MMP-9 proteolysis and suppress angiogenesis via alphaV beta3 integrin. *Cancer Cell.* 2003;3:589-601.
- [142] MacLachlan TK, Sang N, Giordano A. Cyclins, cyclin-dependent kinases and cdk-inhibitors : implications in cell cycle control and cancer. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 1995;5:127-56.
- [143] Kerr JF, Winterford CM, Harmon BV. Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer.* 1994 Apr 15;73:2013-26.
- [144] Hirsch T, Marchetti P, Susin SA. The apoptosis-necrosis paradox. Apoptogenic proteases activated after mitochondrial permeability transition determine the mode of cell death. *Oncogene.* 1997;15:1573-81.
- [145] Marchetti P. L'apoptose : bases fondamentales et applications médicales. *Gynecol Obstet Fertil.* 2005;33:632-41.
- [146] Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science.* 1995;267:1456-62.
- [147] Chen-Levy Z, Nourse J, Cleary ML. The bcl-2 candidate proto-oncogene product is a 24-kilodalton integral-membrane protein highly expressed in lymphoid cell lines and lymphomas carrying the t(14;18) translocation. *Mol Cell Biol.* 1989 Feb;9:701-10.
- [148] Kounelis S, Kapranos N, Kouri E, Coppola D, Papadaki H, Jones MW. Immunohistochemical profile of endometrial adenocarcinoma: a study of 61 cases and review of the literature. *Mod Pathol.* 2000 Apr;13:379-88.
- [149] Levine A. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell.* 1997;88:323-31.
- [150] Mosner J, Mummenbrauer T, Bauer C. Negative feedback regulation of wild-type p53 biosynthesis. *EMBO J.* 1995;14:4442-9.
- [151] Bargonetti J, Manfredi J. Multiple roles of the tumor suppressor P53. *Curr Opin Oncol.* 2002;14:86-91.
- [152] Soussi T. Cycle cellulaire et apoptose : le gène suppresseur de tumeur P53. *Med Sci.* 2000;16:469-72.
- [153] Soussi T, Kato S, Levy PP, Ishioka C. Reassessment of the TP53 mutation database in human disease by data mining with a library of TP53 missense mutations. *Hum Mutat.* 2005;25:6-17.
- [154] Pietenpol JA, Stewart ZA. Cell cycle checkpoint signaling : cell cycle arrest versus apoptosis. *Toxicology.* 2002;181-182:475-81.
- [155] Funk W, Pak DT, Karas RH. A transcriptionally active DNA-binding site for human p53 protein complexes. *Mol Cell Biol.* 1992;12:2866-71.
- [156] Teyssier F, Bay J, Dionet C. Régulation du cycle cellulaire des cellules exposées aux radiations ionisantes. *Bull Cancer.* 1999;86:345-57.

- [157] Agarwal ML, Agarwal A, Taylor WR, Stark GR. p53 control both the G2/M and the G1 cell cycle checkpoints and mediates reversible growth arrest in human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92:8493-7.
- [158] Miyashita T, Harigai M, Hanada M, Reed JC. Identification of a p53-dependent negative response element in the bcl-2 gene. *Cancer Res*. 1994;54:3131-5.
- [159] Owen-Schaub LB, Zhang W, Cusack JC. Wild-type human p53 and a temperature-sensitive mutant induce Fas/APO-1 expression. *Mol Cell Biol*. 1995;15:3032-40.
- [160] Sheikh M, Burns T, Huang Y. p53-dependent and -independent regulation of the death receptor KILLER/DR5 gene expression in response to genotoxic stress and tumor necrosis alpha. *Cancer Res*. 1998;58:1593-8.
- [161] Nakano K, Vousden K. PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Mol Cell* 2001;7:683-94.
- [162] Oda E, Ohki R, Murosawa H. Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science*. 2000;288:1053-8.
- [163] Caelles C, Helmborg A, Karin M. p53-dependent apoptosis in the absence of transcriptional activation of p53-target genes. *Nature*. 1994;370:220-3.
- [164] Alarcon-Vargas D, Ronai Z. p53-Mdm2 : the affair that never ends. *Carcinogenesis*. 2002;23:541-7.
- [165] Ragni N, Ferrero S, Prefumo F, Muschiato B, Gorlero F, Gualco M, *et al*. The association between p53 expression, stage and histological features in endometrial cancer. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2005 Nov 1;123:111-6.
- [166] Vousden KH. Switching from life to death: the Mizing link between Myc and p53. *Cancer Cell*. 2002 Nov;2:351-2.
- [167] Vousden KH. Activation of the p53 tumor suppressor protein. *Biochim Biophys Acta*. 2002 Mar 14;1602:47-59.
- [168] Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000;100:57-70.
- [169] Fearon ER. Human cancer syndromes : clues to the origin and nature of cancer. *Science*. 1997;278:1043-50.
- [170] Olivier M, Eeles R, Hollstein M, Khan MA, Harris CC, Hainaut P. The IARC TP53 database : new online mutation analysis and recommendations to users. *Hum Mutat*. 2002;19:607-14.
- [171] Sakuragi N, Watari H, Ebina Y, Yamamoto R, Steiner E, Koelbl H. Functional analysis of P53 gene and the prognostic impact of dominant-negative p53 mutation in endometrial cancer. *Int J Cancer*. 2005;116:514-9.
- [172] Nenutil R, Smardova J, Pavlova S. Discriminating functional and non-functional p53 in human tumors by p53 and mdm-2 immunohistochemistry. *J Pathol*. 2005;207:251-9.
- [173] Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. Surfing the p53 network. *Nature*. 2000;408:307-10.
- [174] Wynford-Thomas D. P53 in tumour pathology : can we trust immunohistochemistry ? *J Pathol*. 1992;166:329-30.
- [175] Dearth LR, Qian H, Wang T, Baroni TE, Zeng J, Chen SW, *et al*. Inactive full-length p53 mutants lacking dominant wild-type p53 inhibition highlight loss of heterozygosity as an important aspect of p53 status in human cancers. *Carcinogenesis*. 2007 Feb;28:289-98.
- [176] Varley JM, Thorncroft M, McGown G, Appleby J, Kelsey AM, Tricker KJ, *et al*. A detailed study of loss of heterozygosity on chromosome 17 in tumours from Li-Fraumeni patients carrying a mutation to the TP53 gene. *Oncogene*. 1997;14:865-71.
- [177] Konishi H, Takahashi T, Kozaki K, Yatabe Y, Mitsudomi T, Fujii Y, *et al*. Detailed deletion mapping suggests the involvement of a tumor suppressor gene at 17p13.3, distal to p53, in the pathogenesis of lung cancers. *Oncogene*. 1998;17:2095-100.
- [178] Laptenko O, Prives C. Transcriptional regulation by p53 : one protein, many possibilities. *Cell Death Differentiation*. 2006;13:951-61.

- [179] Oehler MK, Brand A, Wain GV. Molecular genetics and endometrial cancer. *J Br Menopause Soc.* 2003 Mar;9:27-31.
- [180] Coronado PJ, Vidart JA, Lopez-Asenjo JA, Fasero M, Furio-bacete V, Magrina J, *et al.* P53 overexpression predicts endometrial carcinoma recurrence better than HER-2/neu overexpression. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2001 Sep;98:103-8.
- [181] Matias-Guiu X, Catusus L, Bussaglia E, Lagarda H, Garcia A, Pons C, *et al.* Molecular pathology of endometrial hyperplasia and carcinoma. *Hum Pathol.* 2001 Jun;32:569-77.
- [182] Becker K, Pancoska P, Concin N. Patterns of p73 N-terminal isoform expression and p53 status have prognostic value in gynecological cancers. *Int J Oncol.* 2006;29:889-902.
- [183] Zheng W, Liang SX, Yi X. Occurrence of endometrial glandular dysplasia precedes uterine papillary serous carcinoma. *Int J Gynecol Pathol.* 2007;26:38-52.
- [184] Wu H, Goel V, Haluska FG. PTEN signaling pathways in melanoma. *Oncogene.* 2003;22:3113-22.
- [185] Salvesen HB, MacDonald N, Ryan A. PTEN methylation is associated with advanced stage and microsatellite instability in endometrial carcinoma. *Int J Cancer* 2001;91:22-6.
- [186] Risinger JI, Hayes K, Maxwell GL, Carney ME, Barrett JC, Berchuck A. PTEN mutation in endometrial cancers is associated with favorable clinical and pathologic characteristics. *Clin Cancer Res.* 1998;4:3005-10.
- [187] Chen Z, Trotman LC, Shaffer D, Lin HK, Dotan ZA, Niki M. Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of PTEN-deficient tumorigenesis. *Nature.* 2005;436:725-30.
- [188] Catusus L, Machin P, Matias-Guiu X, Prat J. Microsatellite instability in endometrial carcinomas : clinicopathologic correlations in a series of 42 cases. *Hum Pathol.* 1998;29:1160-4.
- [189] Salvesen HB, MacDonald N, Ryan A, Iversen OE, Jacobs IJ, Akslen LA. Methylation of hMLH1 in a population-based series of endometrial carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2000;6:3607-13.
- [190] Esteller M, Levine R, Baylin SB, Ellenson LH, Herman JG. MLH1 promoter hypermethylation is associated with the microsatellite instability phenotype in sporadic endometrial carcinomas. *Oncogene.* 1998;17:2413-7.
- [191] Maxwell GL, Risinger JI, Alvarez AA, Barrett JC, Berchuck A. Favorable survival associated with microsatellite instability in endometrioid endometrial cancers. *Obstet Gynecol.* 2001;97:417-22.
- [192] Semczuk A, Schneider-Stock R, Berbec H, Marzec B, Jakowicki JA, Roessner A. K-ras exon 2 point mutations in human endometrial cancer. *Cancer Lett* 2001;164:207-12.
- [193] Sasaki H, Nishii H, Takahashi H. Mutation of the Ki-ras protooncogene in human endometrial hyperplasia and carcinoma. *Cancer Res.* 1993;53:1906-10.
- [194] Ikeda T, Yoshinaga K, Suzuki A, Sakurada A, Ohmori H, Horii A. Anticorresponding mutations of the KRAS and PTEN genes in human endometrial cancer. *Oncol Res* 2000;7:567-70.
- [195] Lagarda H, Catusus L, Arguelles R, Matias-Guiu X, Prat J. K-ras mutation in endometrial carcinoma with microsatellite instability. *J Pathol* 2001;193:193-9.
- [196] Bullions LC, Levine AJ. The role of beta-catenin in cell adhesion, signal transduction, and cancer. *Curr Opin Oncol* 1998;10 81-7.
- [197] Moreno-Bueno G, Hardisson D, Sanchez C, Sarrio D, Cassia R, Garcia-Rostan G. Abnormalities of the APC/beta-catenin pathway in endometrial cancer. *Oncogene.* 2002;21:7981-90.
- [198] Morin PJ. Beta-catenin signaling and cancer. *Bioessays.* 1999;21:1021-30.

- [199] Schlosshauer PW, Ellenson LH, Soslow RA. Beta-catenin and E-cadherin expression patterns in high-grade endometrial carcinoma are associated with histological subtype. *Mod Pathol.* 2002 Oct;15:1032-7.
- [200] Saegusa M, Hashimura M, Yoshida T, Okayasu I. beta- Catenin mutations and aberrant nuclear expression during endometrial tumorigenesis. *Br J Cancer.* 2001;84 209-17.
- [201] Tashiro H, Isacson C, Levine R, Kurman RJ, Cho KR, Hedrick L. p53 gene mutations are common in uterine serous carcinoma and occur early in their pathogenesis. *Am J Pathol.* 1997 Jan;150:177-85.
- [202] Tashiro H, Lax SF, Gaudin PB, Isacson C, Cho KR, Hedrick L. Microsatellite instability is uncommon in uterine serous carcinoma. *Am J Pathol.* 1997 Jan;150:75-9.
- [203] Lax SF, Kendall B, Tashiro H, Slebos RJ, Hedrick L. The frequency of p53, K-ras mutations, and microsatellite instability differs in uterine endometrioid and serous carcinoma: evidence of distinct molecular genetic pathways. *Cancer* 2000;88:814-24.
- [204] Erkanli S, Eren F, Pekin S, Bagis T. BCL-2 and P53 expression in endometrial carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res.* 2004;23 97-103.
- [205] Zheng W, Cao P, Zheng M, Kramer EE, Godwin TA. p53 overexpression and bcl-2 persistence in endometrial carcinoma: comparison of papillary serous and endometrioid subtypes. *Gynecol Oncol.* 1996;61:167-74.
- [206] Doll A, Abal M, Rigau M, Monge M, Gonzalez M, Demajo S, *et al.* Novel molecular profiles of endometrial cancer-new light through old windows. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2008 Feb;108:221-9.
- [207] Dougall WC, Qian X, Peterson NC, Miller J, Samanta A, Greene MI. The neu-oncogene: signal transduction pathways, transformation mechanisms and evolving therapies. *Oncogene.* 1994;9:2109-23.
- [208] Williams JA, Jr., Wang ZR, Parrish RS, Hazlett LJ, Smith ST, Young SR. Fluorescence in situ hybridization analysis of HER-2/neu, c-myc, and p53 in endometrial cancer. *Exp Mol Pathol.* 1999 Dec;67:135-43.
- [209] Halperin R, Zehavi S, Habler L, Hadas E, Bukovsky I, Schneider D. Comparative immunohistochemical study of endometrioid and serous papillary carcinoma of endometrium. *Eur J Gynaecol Oncol.* 2001;22:122-6.
- [210] Rolitsky CD, Theil KS, McGaughy VR, Copeland LJ, Niemann TH. HER-2/neu amplification and overexpression in endometrial carcinoma. *Int J Gynecol Pathol* 1999;18:138-43.
- [211] Pearce ST, Jordan VC. The biological role of estrogen receptors alpha and beta in cancer. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2004 Apr;50:3-22.
- [212] Enmark E, Peltö-Huikko M, Grandien K, Lagercrantz S, Lagercrantz J, Fried G, *et al.* Human estrogen receptor beta-gene structure, chromosomal localization, and expression pattern. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997 Dec;82:4258-65.
- [213] Leslie KK, Stein MP, Kumar NS, Dai D, Stephens J, Wandinger-Ness A, *et al.* Progesterone receptor isoform identification and subcellular localization in endometrial cancer. *Gynecol Oncol.* 2005 Jan;96:32-41.
- [214] Murphy LC, Dotzlaw H, Leygue E, Douglas D, Coutts A, Watson PH. Estrogen receptor variants and mutations. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1997 Aug;62:363-72.
- [215] Jazaeri AA, Nunes KJ, Dalton MS, Xu M, Shupnik MA, Rice LW. Well-differentiated endometrial adenocarcinomas and poorly differentiated mixed mullerian tumors have altered ER and PR isoform expression. *Oncogene.* 2001;20 6965-9.
- [216] De Vivo I, Huggins GS, Hankinson SE, Lescault PJ, Boezen M, Colditz GA, *et al.* A functional polymorphism in the promoter of the progesterone receptor gene associated with endometrial cancer risk. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Sep 17;99:12263-8.

- [217] Hanekamp EE, Gielen SC, Smid-Koopman E, Kuhne LC, de Ruiter PE, Chadha-Ajwani S, *et al.* Consequences of loss of progesterone receptor expression in development of invasive endometrial cancer. *Clin Cancer Res.* 2003 Sep 15;9:4190-9.
- [218] Famili A, Liu G, Liu Z. Evaluation and Optimization of Clustering in Gene Expression Data Analysis. *J Bioinformatics.* 2003;2:1-7.
- [219] Sandberg AA. Cancer cytogenetics for clinicians. *CA Cancer J Clin.* 1994 May-Jun;44:136-59.
- [220] Kokorine I, Marbaix E, Henriot P, Okada Y, Donnez J, Eeckhout Y, *et al.* Focal cellular origin and regulation of interstitial collagenase (matrix metalloproteinase-1) are related to menstrual breakdown in the human endometrium. *J Cell Sci.* 1996 Aug;109 (Pt 8):2151-60.
- [221] Soini Y, Alarakkola E, Autio-Harmainen H. Expression of messenger RNAs for metalloproteinases 2 and 9, type IV collagen, and laminin in nonneoplastic and neoplastic endometrium. *Hum Pathol.* 1997 Feb;28:220-6.
- [222] Goffin F, Frankenne F, Beliard A, Perrier D'Hauterive S, Pignon MR, Geenen V, *et al.* Human endometrial epithelial cells modulate the activation of gelatinase a by stromal cells. *Gynecol Obstet Invest.* 2002;53:105-11.
- [223] Salamonsen LA, Lathbury LJ. Endometrial leukocytes and menstruation. *Hum Reprod Update.* 2000 Jan-Feb;6:16-27.
- [224] Wilson CL, Heppner KJ, Labosky PA, Hogan BL, Matrisian LM. Intestinal tumorigenesis is suppressed in mice lacking the metalloproteinase matrilysin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:1402-7.
- [225] Bruner-Tran KL, Eisenberg E, Yeaman GR, Anderson TA, McBean J, Osteen KG. Steroid and cytokine regulation of matrix metalloproteinase expression in endometriosis and the establishment of experimental endometriosis in nude mice. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002 Oct;87:4782-91.
- [226] Polette M, Nawrocki-Raby B, Gilles C, Clavel C, Birembaut P. Tumour invasion and matrix metalloproteinases. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2004 Mar;49:179-86.
- [227] Uzan C, Cortez A, Dufournet C, Fauvet R, Siffroi JP, Darai E. Eutopic endometrium and peritoneal, ovarian and bowel endometriotic tissues express a different profile of matrix metalloproteinases-2, -3 and -11, and of tissue inhibitor metalloproteinases-1 and -2. *Virchows Arch.* 2004 Dec;445:603-9.
- [228] Maatta M, Soini Y, Liakka A, Autio-Harmainen H. Localization of MT1-MMP, TIMP-1, TIMP-2, and TIMP-3 messenger RNA in normal, hyperplastic, and neoplastic endometrium. Enhanced expression by endometrial adenocarcinomas is associated with low differentiation. *Am J Clin Pathol.* 2000 Sep;114:402-11.
- [229] Nomura H, Sato H, Seiki M, Mai M, Okada Y. Expression of membrane-type matrix metalloproteinase in human gastric carcinomas. *Cancer Res.* 1995 Aug 1;55:3263-6.
- [230] Tokuraku M, Sato H, Murakami S, Okada Y, Watanabe Y, Seiki M. Activation of the precursor of gelatinase A/72 kDa type IV collagenase/MMP-2 in lung carcinomas correlates with the expression of membrane-type matrix metalloproteinase (MT-MMP) and with lymph node metastasis. *Int J Cancer.* 1995 Oct 20;64:355-9.
- [231] Tokuraku M, Sato H, Watanabe Y, Seiki M. [Expression of membrane-type matrix metalloproteinase (MT-MMP) and activation of MMP-2 in lung cancer]. *Nippon Rinsho.* 1995 Jul;53:1822-6.
- [232] Davies B, Miles DW, Happerfield LC, Naylor MS, Bobrow LG, Rubens RD, *et al.* Activity of type IV collagenases in benign and malignant breast disease. *Br J Cancer.* 1993 May;67:1126-31.

- [233] Aglund K, Rauvala M, Puistola U, Angstrom T, Turpeenniemi-Hujanen T, Zackrisson B, *et al.* Gelatinases A and B (MMP-2 and MMP-9) in endometrial cancer-MMP-9 correlates to the grade and the stage. *Gynecol Oncol.* 2004 Sep;94:699-704.
- [234] Guo W, Chen G, Zhu C, Wang H. [Expression of matrix metalloproteinase-2, 9 and it's tissue inhibitor-1, 2 in endometrial carcinoma]. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi.* 2002 Oct;37:604-7.
- [235] Iurlaro M, Loverro G, Vacca A, Cormio G, Ribatti D, Minischetti M, *et al.* Angiogenesis extent and expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 correlate with upgrading and myometrial invasion in endometrial carcinoma. *Eur J Clin Invest.* 1999 Sep;29:793-801.
- [236] Park DW, Ryu HS, Choi DS, Park YH, Chang KH, Min CK. Localization of matrix metalloproteinases on endometrial cancer cell invasion in vitro. *Gynecol Oncol.* 2001 Sep;82:442-9.
- [237] Honkavuori M, Talvensaaari-Mattila A, Soini Y, Turpeenniemi-Hujanen T, Santala M. MMP-2 expression associates with CA 125 and clinical course in endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol.* 2007;104:217-21.
- [238] DiNezza LA, Jobling T, Salamonsen LA. Progestin suppresses matrix metalloproteinase production in endometrial cancer. *Gynecol Oncol.* 2003;89:325-33.
- [239] Curran S, Dundas SR, Buxton J, Leeman MF, Ramsay R, Murray GI. Matrix metalloproteinase/tissue inhibitors of matrix metalloproteinase phenotype identifies poor prognosis colorectal cancers. *Clin Cancer Res.* 2004 Dec 15;10:8229-34.
- [240] Fan YZ, Zhang JT, Yang HC, Yang YQ. Expression of MMP-2,TIMP-2 protein and the ratio of MMP-2/TIMP-2 in gallbladder carcinoma and their significance. *World J Gastroenterol.* 2002 Dec;8:1138-43.
- [241] Giannelli G, Bergamini C, Marinosci F, Fransvea E, Quaranta M, Lupo L, *et al.* Clinical role of MMP-2/TIMP-2 imbalance in hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer.* 2002 Feb 1;97:425-31.
- [242] Nakopoulou L, Katsarou S, Giannopoulou I, Alexandrou P, Tsirmpa I, Panayotopoulou E, *et al.* Correlation of tissue inhibitor of metalloproteinase-2 with proliferative activity and patients' survival in breast cancer. *Mod Pathol.* 2002 Jan;15:26-34.
- [243] Xiao M, Zhou NX, Huang ZQ, Lu YL, Chen LH, Wang DJ, *et al.* The ratio of MMP-2 to TIMP-2 in hilar cholangiocarcinoma: a semi-quantitative study. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int.* 2004 Nov;3:599-602.
- [244] Ferguson SE, Olshen AB, Viale A, Awtrey CS, Barakat RR, Boyd J. Gene expression profiling of tamoxifen-associated uterine cancers: evidence for two molecular classes of endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol.* 2004 Feb;92:719-25.
- [245] Li G, Fridman R, Kim HR. Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 inhibits apoptosis of human breast epithelial cells. *Cancer Res.* 1999 Dec 15;59:6267-75.
- [246] Heppner KJ, Matrisian LM, Jensen RA, Rodgers WH. Expression of most matrix metalloproteinase family members in breast cancer represents a tumor-induced host response. *Am J Pathol.* 1996 Jul;149:273-82.
- [247] Muller D, Breathnach R, Engelmann A, Millon R, Bronner G, Flesch H, *et al.* Expression of collagenase-related metalloproteinase genes in human lung or head and neck tumours. *Int J Cancer.* 1991 Jun 19;48:550-6.
- [248] Wang FQ, So J, Reierstad S, Fishman DA. Matrilysin (MMP-7) promotes invasion of ovarian cancer cells by activation of progelatinase. *Int J Cancer.* 2005 Mar 10;114:19-31.
- [249] Misugi F, Sumi T, Okamoto E, Nobeyama H, Hattori K, Yoshida H. Expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinase in uterine endometrial carcinoma and a correlation between expression of matrix metalloproteinase-7 and prognosis. *Int J Mol Med.* 2005;16:541-6.

- [250] Lopata A, Agresta F, Quinn MA, Smith C, Ostor AG, Salamonsen LA. Detection of endometrial cancer by determination of matrix metalloproteinases in the uterine cavity. *Gynecol Oncol.* 2003 Aug;90:318-24.
- [251] Zhang J, Hampton AL, Nie G, Salamonsen LA. Progesterone inhibits activation of latent matrix metalloproteinase (MMP)-2 by membrane-type 1 MMP: enzymes coordinately expressed in human endometrium. *Biol Reprod.* 2000 Jan;62:85-94.
- [252] Leong AS. Quantitation in immunohistology: fact or fiction? A discussion of variables that influence results. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2004 Mar;12:1-7.
- [253] Liokumovich P, Goldberg I, Davidson B, Gotlieb WH, Zahavi T, Ben-Baruch G, *et al.* Expression of metalloproteinases endometrial stromal sarcoma: immunohistochemical study using image analysis. *J Clin Pathol.* 1999 Mar;52:198-202.
- [254] Wiegand S, Dunne AA, Muller HH, Mandic R, Barth P, Davis RK, *et al.* Metaanalysis of the significance of matrix metalloproteinases for lymph node disease in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer.* 2005 Jul 1;104:94-100.
- [255] Li W, Savinov AY, Rozanov DV, Golubkov VS, Hedayat H, Postnova TI, *et al.* Matrix metalloproteinase-26 is associated with estrogen-dependent malignancies and targets alpha1-antitrypsin serpin. *Cancer Res.* 2004 Dec 1;64:8657-65.
- [256] Zhao YG, Xiao AZ, Newcomer RG, Park HI, Kang T, Chung LW, *et al.* Activation of pro-gelatinase B by endometase/matrilysin-2 promotes invasion of human prostate cancer cells. *J Biol Chem.* 2003 Apr 25;278:15056-64.
- [257] Henderson GS, Brown KA, Perkins SL, Abbott TM, Clayton F. bcl-2 is down-regulated in atypical endometrial hyperplasia and adenocarcinoma. *Mod Pathol.* 1996 Apr;9:430-8.
- [258] Oreskovic S, Babic D, Kalafatic D, Barisic D, Beketic-Oreskovic L. A significance of immunohistochemical determination of steroid receptors, cell proliferation factor Ki-67 and protein p53 in endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol.* 2004 Apr;93:34-40.
- [259] Ambros RA, Sheehan CE, Kallakury BV, Ross JS, Malfetano J, Paunovich E, *et al.* MDM2 and p53 protein expression in the histologic subtypes of endometrial carcinoma. *Mod Pathol.* 1996 Dec;9:1165-9.
- [260] Semczuk A, Marzec B, Skomra D, Roessner A, Cybulski M, Rechberger T. Allelic loss at TP53 is not related to p53 protein overexpression in primary human endometrial carcinomas. *Oncology.* 2005;69:317-25.
- [261] Inoue M, Okayama A, Fujita M, Enomoto T, Sakata M, Tanizawa O, *et al.* Clinicopathological characteristics of p53 overexpression in endometrial cancers. *Int J Cancer.* 1994 Jul 1;58:14-9.
- [262] Ito K, Watanabe K, Nasim S, Sasano H, Sato S, Yajima A, *et al.* Prognostic significance of p53 overexpression in endometrial cancer. *Cancer Res.* 1994 Sep 1;54:4667-70.
- [263] Engelsen IB, Stefansson I, Akslen LA, Salvesen HB. Pathologic expression of p53 or p16 in preoperative curettage specimens identifies high-risk endometrial carcinomas. *Am J Obstet Gynecol.* 2006;195:979-86.
- [264] Hamel NW, Sebo TJ, Wilson TO, Keeney GL, Roche PC, Suman VJ, *et al.* Prognostic value of p53 and proliferating cell nuclear antigen expression in endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol.* 1996 Aug;62:192-8.
- [265] Kohler MF, Carney P, Dodge R, Soper JT, Clarke-Pearson DL, Marks JR, *et al.* p53 overexpression in advanced-stage endometrial adenocarcinoma. *Am J Obstet Gynecol.* 1996 Nov;175:1246-52.
- [266] Lundgren C, Auer G, Frankendal B, Nilsson B, Nordstrom B. Prognostic factors in surgical stage I endometrial carcinoma. *Acta Oncol.* 2004;43:49-56.

- [267] Biesterfeld S, Leitloff M, Rath W, Schroder W. DNA image cytometry in the differential diagnosis of endometrial hyperplasia and adenocarcinoma. *Anal Quant Cytol Histol.* 2001 Apr;23:123-8.
- [268] Larson DM, Berg R, Shaw G, Krawisz BR. Prognostic significance of DNA ploidy in endometrial cancer. *Gynecol Oncol.* 1999 Sep;74:356-60.
- [269] Santala M, Talvensaari-Mattila A. DNA ploidy is an independent prognostic indicator of overall survival in stage I endometrial endometrioid carcinoma. *Anticancer Res.* 2003 Nov-Dec;23:5191-6.
- [270] Orbo A, Rydningen M, Straume B, Lysne S. Significance of morphometric, DNA cytometric features, and other prognostic markers on survival of endometrial cancer patients in northern Norway. *Int J Gynecol Cancer.* 2002 Jan-Feb;12:49-56.
- [271] Susini T, Ammuni G, Molino C, Carriero C, Rapi S, Branconi F. Ten-Year Results of a Prospective Study on the Prognostic Role of Ploidy in Endometrial Carcinoma. *Cancer.* 2007;109:882-90.
- [272] Miyamoto T, Watanabe J, Hata H, Jobo T, Kawaguchi M, Hattori M, *et al.* Significance of progesterone receptor-A and -B expressions in endometrial adenocarcinoma. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2004 Oct;92:111-8.
- [273] Pertschuk LP, Masood S, Simone J, Feldman JG, Fruchter RG, Axiotis CA, *et al.* Estrogen receptor immunocytochemistry in endometrial carcinoma: a prognostic marker for survival. *Gynecol Oncol.* 1996 Oct;63:28-33.
- [274] Sivridis E, Giatromanolaki A. Prognostic aspects on endometrial hyperplasia and neoplasia. *Virchows Arch.* 2001 Aug;439:118-26.
- [275] Sivridis E, Giatromanolaki A, Koukourakis M, Anastasiadis P. Endometrial carcinoma: association of steroid hormone receptor expression with low angiogenesis and bcl-2 expression. *Virchows Arch.* 2001 May;438:470-7.
- [276] Fukuda K, Mori M, Uchiyama M, Iwai K, Iwasaka T, Sugimori H. Prognostic significance of progesterone receptor immunohistochemistry in endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol.* 1998 Jun;69:220-5.
- [277] Iwai K, Fukuda K, Hachisuga T, Mori M, Uchiyama M, Iwasaka T, *et al.* Prognostic significance of progesterone receptor immunohistochemistry for lymph node metastases in endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol.* 1999 Mar;72:351-9.
- [278] Fujimoto J, Sakaguchi H, Aoki I, Khatun S, Toyoki H, Tamaya T. Steroid receptors and metastatic potential in endometrial cancers. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2000 Dec 31;75:209-12.
- [279] Sasaki M, Dharia A, Oh BR, Tanaka Y, Fujimoto S, Dahiya R. Progesterone receptor B gene inactivation and CpG hypermethylation in human uterine endometrial cancer. *Cancer Res.* 2001 Jan 1;61:97-102.
- [280] Prasad M, Wang H, Douglas W, Barakat RR, Ellenson LH. Molecular genetic characterization of tamoxifen-associated endometrial cancer. *Gynecol Oncol.* 2005 Jan;96:25-31.
- [281] Santin AD, Bellone S, Van Stedum S, Bushen W, De Las Casas LE, Korourian S, *et al.* Determination of HER2/neu status in uterine serous papillary carcinoma: Comparative analysis of immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization. *Gynecol Oncol.* 2005 Jul;98:24-30.

