

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION.....	1
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	4
Le cancer du sein.....	5
I. La glande mammaire.....	5
I.1 Anatomie de la glande mammaire	5
I.2 Hormones et sein.....	6
I.2.1 Les œstrogènes	7
I.2.2 La progestérone	8
I.2.3 Action combinée des hormones stéroïdiens sur le sein.....	9
I.2.4 La prolactine	10
II. Le cancer mammaire	10
II.1 Le processus de cancérisation.....	10
II.1.1 Indépendance vis-à-vis des signaux de prolifération :	11
II.1.2 Insensibilité aux signaux anti-prolifératifs :.....	11
II.1.3 Acquisition d'une résistance à l'apoptose :	11
II.1.4 Potentiel illimité de réplication :.....	12
II.1.5 Stimulation de l'angiogenèse :.....	12
II.1.6 Pouvoir d'invasion et de dissémination (métastases) :	13
II.2 Les gènes impliqués dans la cancérisation	14
Cycle cellulaire et Cyclines.....	19
I. Le cycle cellulaire	19
I.1 Les étapes du cycle cellulaire.....	19
I.2 Régulation du cycle cellulaire.....	22
I.2.1 CCND1 et cycle cellulaire	25
Les Cyclines.....	27
I. Les cyclines D.....	28
I.1 La Cycline D1	29
I.1 Cyclines D2 et D3	30
I.2 CycD1 et œstrogène	31
I.1 CycD1 et cancer.....	32
II. Cycline E.....	35
III. Les cyclines mitotiques :	36
III.1 La Cycline A.....	36
III.2 Les cyclines B	36
IV. Les Cyclines virales	37
V. Les Kinases Dépendantes des Cyclines (CDK).....	38
MATERIEL ET METHODES.....	41
I. Matériel biologique	42
II. Méthodes.....	42
II.1 Préparation des échantillons	42
II.2 Échantillonnage	42
II.3 Reconnaissance des antigènes : principe et méthodologie.....	42
II.3.1 Quantification du marquage.....	44
II.4 L'hybridation chromogénique <i>in situ</i> (CISH).....	44
II.4.1 Réalisation de la technique	45

II.4.2	Évaluation des signaux	47
II.4.3	Évaluation de l'état du gène CCND1	47
<i>II.5</i>	<i>Analyse statistique</i>	48
RESULTATS.....		49
I.	Résultats descriptifs.....	50
II.	Résultats qualitatifs	51
<i>II.1</i>	<i>Expression des marqueurs détectés par immunohistochimie</i>	51
<i>II.2</i>	<i>Amplification du gène CCND1 détectée par CISH</i>	53
III.	Résultats quantitatifs.....	53
<i>III.1</i>	<i>Expression des marqueurs</i>	53
<i>III.2</i>	<i>Amplification du gène CCND1.....</i>	56
IV.	Relation CycD1-paramètres clinicopathologiques	56
V.	Relation gène CCND1-paramètres clinicopathologiques	57
VI.	Relation CycD1-gène CCND1	58
DISCUSSION		60
CONCLUSION		72
BIBLIOGRAPHIE		75
ANNEXES		91

ABREVIATIONS

AEC:	Azoethylcarbazol
ATM:	Ataxia-telangiectasia mutated
BRCA1:	Breast Cancer 1.
BRCA2:	Breast Cancer 2.
CCI :	Carcinome Canalaire Infiltrant
CCND1 :	Gène de la Cycline D1
CDC :	Cell Division Cycle
CDK :	Cyclin Dependant Kinase
CISH :	Hybridation chromogénique <i>in situ</i>
CRM1 :	Chromosomal Maintenance 1
CRS :	Signal de Rétention Cytoplasmique
CycD1:	Cycline D1
DAB:	Di-aminobenzidine
G1/S:	Growth 1/Synthèse.
G2/M:	Growth 2/Mitose.
HATs:	Histones Acétyle Transférases
HES:	Hémalun-Eosine-Safran
IHC:	Immunohistochimie
KDa:	KiloDalton
NF-kB:	Nuclear Factor-kappa B
PBS:	Phosphate Buffer Saline
PBS:	Phosphate Buffer Saline
PDGF:	Platelet Derived Growth Factor
PM:	Poids Moléculaire
Rb :	Rétinoblastome
RE :	Récepteur aux Oestrogènes
RP :	Récepteur à la Progestérone
SBR:	Scarff-Bloom Richardson
STAT 3:	Signal Transducer and Activator of Transcription 3
TGF :	Transforming Growth Factor

Résumé

La cellule progresse dans le cycle cellulaire grâce à l'action coordonnée de complexes protéiques constitués de cyclines et de leurs partenaires. Parmi ces cyclines, la cycline D1 (CycD1) est l'une des molécules régulatrices de ce processus, surexprimée dans un large éventail de néoplasmes humains. Certains articles ont fait le point des connaissances sur les molécules de régulation du cycle cellulaire dans le but d'une meilleure compréhension des mécanismes responsables des cancers. Néanmoins la valeur pronostique de la CycD1 reste encore à confirmer et demeure à l'étude. La CycD1 est solidement établie en tant qu'oncogène ayant un rôle pathogénique important dans les carcinomes du sein. Elle régule la croissance des tissus sensibles aux œstrogènes en activant les récepteurs aux œstrogènes (RE) de façon indépendante du ligand entraînant une régulation positive des RE. Ceci lui confère un rôle oncogénique possible dans les cancers du sein RE positif qui finissent par présenter une résistance aux traitements anti-œstrogéniques par des mécanismes extrêmement complexes. L'objectif de ce travail est d'une part, d'étudier la relation entre l'expression de CycD1 et l'amplification du gène CCND1 et avec d'autres paramètres biologiques (les récepteurs à l'œstrogène et à la progestérone (RP), le Ki-67 et la P53) chez 138 patientes atteintes du carcinome canalaire infiltrant (CCI) du sein dans le but d'évaluer la dépendance de CycD1 des autres paramètres et le degré de son implication dans ce type de cancer. D'une autre part, nous nous sommes intéressés à définir la prévalence et la signification clinique de la surexpression de CycD1 et l'amplification du CCND1 dans les cancers du sein RE positif afin de les cibler directement comme protocole anticancéreux et par conséquent, augmenter les chances de guérison. Afin d'évaluer l'expression de CycD1 et des paramètres biologiques, l'immunohistochimie a été réalisée sur des prélèvements tumoraux. L'amplification du gène CCND1 a été mesurée par la méthode d'hybridation chromogénique *in situ*. Les résultats ont montré que CycD1 est surexprimée dans 56,5% des cas alors que le gène CCND1 est amplifié dans seulement 12,3%. Les RE et RP sont surexprimés respectivement dans 79,7% et 68,8% des cas. Une corrélation significative a été trouvée entre l'amplification du CCND1 et la surexpression de CycD1 ($P<0,001$). Cette corrélation est encore beaucoup plus élevée dans les tumeurs RE+ ($P<0,0001$). Une forte corrélation a été constatée également entre les niveaux d'expression de CycD1 et ceux des récepteurs hormonaux (RE : $P<0,0001$; RP : $P=0,002$). Ce qui n'est pas le cas avec les autres paramètres clinicopathologiques, Ki-67 et P53. La compréhension du processus moléculaire de l'expression de CycD1 dans une grande proportion de tumeurs et son profile vis-à-vis des paramètres biologiques mettent en lumière l'intérêt d'intégration de ce biomarqueur dans les pratiques oncologiques. Ceci permet non seulement de fournir un nouvel outil de diagnostic et de pronostic aux cliniciens, mais également d'envisager l'utilisation ciblée de nouvelles thérapeutiques anticancéreuses en testant de nouvelles molécules inhibitrices.

Mots clés: Cancer du sein, CCND1, CISH, CyclineD1, Immunohistochimie, Récepteurs hormonaux.

ملخص

تحضر الخلية حين دخولها ونموها أثناء دورة الخلية للعمل المنسق لمركبات بروتينية مشكلة من سيكلينات وشركائها. من بين أنواع السيكلينات، بحد السيكلين D1 الذي يعتبر من أهم البروتينات المنظمة لهذه العملية والمتواجد بنسب مرتفعة في العديد من الأورام البشرية. سلطت بعض الدراسات الضوء على الجزيئات المنظمة لدورة الخلية وهذا من أجل الفهم الجيد للآليات المسئولة عن السرطان. ومع ذلك فإن قيمة السيكلين D1 كأداة تشخيص للسرطان لم يتم تأكيدها بعد ولازال قيد الدراسة. السيكلين D1 معترف به على أنه جين مسبب للسرطان وله دور أساسي وهام في مرض سرطان الثدي. يمكن له أن ينظم نمو الأنسجة الحسابة لهرمون الأستروجين من خلال تفعيل مستقبلات هرمون الأستروجين بشكل مستقل مما يؤدي إلى تنظيم إيجابي للأستروجين. وهذا ما يجعله يلعب دورا محتملا في سرطان الثدي ذو الهرمونات الأستروجينية الموجبة والتي تظهر في نهاية المطاف مقاومة للعلاجات المضادة للأستروجين من خلال آليات معقدة للغاية. المدف من هذا العمل هو دراسة العلاقة بين نسبة السيكلين D1 وتضاعف عدد نسخ الجين CCND1 وكذلك علاقاته مع العوامل البيولوجية الأخرى مثل مستقبلات هرمون الأستروجين، مستقبلات هرمون البروجسترون، مؤشر التضاعف Ki-67 عند 138 p53 و 3,12% CCND1 مريضة تعاني من سرطان قنوات الحليب المتسلل للثدي وذلك بهدف تقييم مدى علاقة السيكلين D1 بالعوامل البيولوجية الأخرى ومدى تدخله في إحداث هذا النوع من السرطان. ومن جهة أخرى، اهتمنا بتحديد انتشار زيادة نسبة السيكلين D1 وتضاعف عدد نسخ الجين CCND1 وكذا دلالتهما الإكلينيكية في سرطان الثدي ذو الهرمونات الأستروجينية الموجبة لاستهدافهما مباشرة كأدوية مضادة للسرطان وبالتالي زيادة فرص الشفاء. لقياس نسبة السيكلين D1 والعوامل البيولوجية الأخرى، تم إستعمال الكيماء النسيجية المنشاعية على كتل البرافين التي تحتوي على الورم. وقد تم قياس تضاعف عدد نسخ الجين CCND1 بواسطة طريقة التهجين اللوني الموضعي. أظهرت النتائج زيادة مفرطة في نسبة السيكلين D1 عند 56,5% من الحالات وأن عدد نسخ الجين CCND1 متضاعف في 7,79% و 68,8% حالة على التوالي. يوجد إرتباط معنوي بين تضاعف نسخ الجين CCND1 والزيادة المفرطة للسيكلين D1 (P<0,0001). تبين النتائج أيضا وجود إرتباط هام بين الزيادة المفرطة للسيكلين D1 وزيادة نسب المستقبلات الهرمونية (مستقبل هرمون الأستروجين P<0,0001)، مستقبل هرمون البروجسترون (P=0,002). هذا لا ينطبق على العوامل البيولوجية الأخرى Ki-67 و p53. إن فهم السير الجزيئي لنشاط السيكلين D1 في عدد كبير من الأورام وكيفية تعامله مع العوامل البيولوجية الأخرى يسلط الضوء على أهمية دمج السيكلين D1 في التحاليل الروتينية لتشخيص السرطان. هذا لا يوفر فقط وسيلة تشخيصية جديدة للأطباء ولكن أيضا للنظر في الإستخدام المستهدف لعلاجات جديدة مضادة للسرطان عن طريق اختبار جزيئات مثبتة جديدة.

الكلمات المفتاحية: سرطان الثدي، CCND1 ، التهجين اللوني الموضعي CISH ، سيكلين D1 ، الكيماء النسيجية المناعية (IHC) ، المستقبلات الهرمونية.

Abstract

The cell starts and progresses in the cell cycle via coordinated action of protein complexes consisting of cyclins and their partners. Among these cyclins, Cyclin D1 (CycD1) is one of the regulatory molecules of this process overexpressed in a wide range of human neoplasms. Some papers have taken stock of knowledge on cell cycle regulation molecules in order to better understand the mechanisms responsible for cancers. Nevertheless, the prognostic value of cycD1 remains under study and to be confirmed. CycD1 is substantially established as an oncogene with an important pathogenic role in breast carcinomas. It regulates the growth of estrogen sensitive tissues by activating estrogen receptors (ER) independently of the ligand resulting in upregulation of ER. This gives it a possible oncogenic role in ER positive breast cancers that end up showing resistance to anti-estrogen treatments by extremely complex mechanisms. The aim of this work is firstly to study the relationship between the CycD1 expression and the CCND1 amplification and with other biological parameters (Estrogen and progesterone receptors (RP), Ki-67 and p53) in 138 patients with invasive ductal breast carcinoma (IDC) in order to evaluate the dependence of CycD1 on other parameters and the degree of its involvement in this type of cancer. On the other hand, we were interested in defining the prevalence and clinical significance of CycD1 overexpression and CCND1 amplification in ER positive breast cancers in order to target them directly as an anticancer protocol and consequently increase the chances of recovery. To evaluate the expression of CycD1 and biological parameters, immunohistochemistry was performed on tumor samples. Chromogenic *in situ* hybridization (CISH) was used to identify CCND1 amplification. The results showed that CycD1 is overexpressed in 56.5% of cases while the CCND1 gene is amplified in only 12.3%. The ER and RP are overexpressed in 79.7% and 68.8% respectively. A significant correlation was found between CCND1 amplification and CycD1 overexpression ($P<0.001$). This correlation is still much higher in ER+ tumors ($P<0.0001$). A strong correlation was also found between CycD1 and hormone receptor expression levels (RE: $P<0.0001$, RP: $P=0.002$). This is not the case with the other clinicopathological parameters, Ki-67 and p53. The understanding of the molecular process of the CycD1 expression in a large proportion of tumors and its profile towards the biological parameters highlight the interest of integration of this biomarker in oncological practices. This provides, not only a new diagnostic and prognostic tool for clinicians, but also allows the targeted use of new anti-cancer therapies by testing new inhibitory molecules.

Keywords: Breast cancer, CCND1, CISH, Cyclin D1, Immunohistochemistry, Hormonal receptors.

INTRODUCTION

Les cancers du sein sont fréquemment associés à des amplifications des proto-oncogènes tel que CCND1 dont la protéine est la Cycline D1(CycD1) surexprimée dans plusieurs cancers par son implication dans la régulation positive du cycle cellulaire. La CycD1 est jugée responsable d'engager directement les facteurs de transcription ou les co-activateurs, incluant les Histones Acétyle Transférases (HATs) de réguler la transcription et les modifications épigénétiques qui jouent un rôle important dans le métabolisme des cancers humains. Elle est aussi associée à d'autres oncogènes tels que *neu* et *ras* qui agissent sur le promoteur du gène CCND1 régulant son expression.

L'association de CycD1, qui est un médiateur de la réparation de l'ADN endommagé, aux cancers est au premier vu d'œil contradictoire, puisque la réparation de l'ADN empêche les mismatches durant la réPLICATION de l'ADN. Cependant, la réparation de l'ADN assure aux cellules cancéreuses de survivre plus longtemps et de devenir plus résistantes à la thérapie. Par l'activation des complexes CDK4/CDK6, CycD1 est essentielle à l'apparition et à la progression tumorale. Ainsi, des inhibiteurs spécifiques de CDK4/6 ont été développés contre le cancer du sein mais malheureusement, certaines patientes restent insensibles à ce traitement. La CycD1 peut être également impliquée, indépendamment de CDK4/6, dans la survie des cellules cancéreuses. Son impact sur la sensibilité des cellules cancéreuses aux chimiothérapies et le maintien tumoral reste mal compris. À ce titre, le ciblage spécifique de CycD1 pourrait représenter une alternative clinique.

La surexpression de CycD1 a été rapportée dans 40 à 90% des cas de cancer du sein invasif en présence ou en absence de l'activation du gène CCND1 amplifié dans environ 20% des tumeurs (ELSHEIKH *et al.*, 2008 ; LI *et al.*, 2016 ; AHLIN *et al.*, 2017). La CycD1 est qualifiée, en tant que l'une des protéines les plus couramment surexprimée dans le cancer du sein. Malgré toutes les preuves de la surexpression de CycD1 dans différents types de cancers, sa valeur pronostique n'est pas encore confirmée et demeure à l'étude. Il était donc important de comprendre et d'évaluer ces dérégulations pour déterminer les conséquences de la surexpression de CycD1 et l'amplification du gène CCND1 dans l'évolution de ces tumeurs. Ce qui constitue le premier objectif de ce travail.

Bien qu'il existe une bonne corrélation entre l'amplification du gène CCND1 et la surexpression de la protéine CycD1, cette surexpression n'est pas toujours secondaire à l'amplification génique du CCND1. Cela implique que d'autres mécanismes participent à la surexpression de CycD1. Il est suggéré que les tumeurs surexprimant CycD1 ont un potentiel de croissance plus élevé et favorisent la progression du cycle cellulaire entraînant la surexpression de Ki-67 utilisé pour définir l'agressivité du cancer du sein. Bien que la p53, en tant que "gardien du génome", joue le rôle d'inhibiteur de la fonction du complexe CycD1/CDK dans les cellules normales, l'expression anormale de CycD1 dans les cellules cancéreuses ne répond pas nécessairement au dysfonctionnement de la p53 ou à l'expression positive dans sa forme mutée. Le second objectif que nous avions défini dans cette étude avait pour but

justement de vérifier cette relation entre l'expression de CycD1 et l'amplification de son gène CCND1 d'une part et avec les autres paramètres biologiques notamment, les récepteurs d'œstrogène (RE) et de progestérone (RP), le marqueur de prolifération Ki-67 et la protéine p53.

Nous nous sommes attachés également, à définir la prévalence et la signification clinique de la surexpression de CycD1 et de l'amplification du gène CCND1 dans les cancers du sein RE positif. La CycD1 semble jouer un rôle primordial dans ces derniers en régulant la croissance des tissus sensibles aux œstrogènes en activant les RE indépendamment du ligand. Ceci entraîne une régulation positive des RE en induisant la transcription par un mécanisme indépendant des complexes cyclines/CDK (ZWIJSEN *et al.*, 1997 ; NEUMAN *et al.*, 1997). Cette activité agoniste des RE indépendante de CycD1 pourrait indiquer un rôle oncogénique possible dans les cancers du sein RE positif.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

LE CANCER DU SEIN

I. La glande mammaire

I.1 Anatomie de la glande mammaire

La glande mammaire permet en période d'allaitement de produire le lait maternel dont se nourrit l'enfant pendant les premiers mois de sa vie. Durant la lactation, le lait est sécrété par la glande mammaire puis acheminé par un réseau de canaux galactophores au niveau du mamelon. Ces canaux galactophores sont présents à l'état rudimentaire chez les femmes et les hommes jusqu'à l'âge adulte. Seules les femmes ont un développement de la glande mammaire sous l'influence d'hormones sexuelles (œstrogène et progestérone) à partir de la puberté, le long des cycles menstruels, durant la grossesse, pendant l'allaitement et jusqu'à la ménopause.

Le sein est recouvert de peau s'étendant sans limite nette jusqu'à la région mamelonnaire, constituée du mamelon qui entouré d'une muqueuse pigmentée, l'aréole. La glande mammaire occupe la partie antéro-supérieure du thorax, de part et d'autre du sternum en avant des muscles pectoraux. Elle

est constituée de 15 à 20 lobes disposés en efflorescence et baignant dans du tissu adipeux. Chaque lobe se divise en de nombreux lobules, eux même constitués de 10 à 100 alvéoles (acini) qui se terminent par des canaux alvéolaires (canal galactophore de 3^{ème} ordre) qui sécrètent le lait. Plusieurs canaux alvéolaires se réunissent à leur tour et forme un canal lobulaire (canal de 2^{ème} ordre) qui draine un lobule. Plusieurs canaux lobulaires se réunissent à leur tour pour former un canal galactophore de premier ordre qui achemine le lait jusqu'au mamelon. (Figure 1).

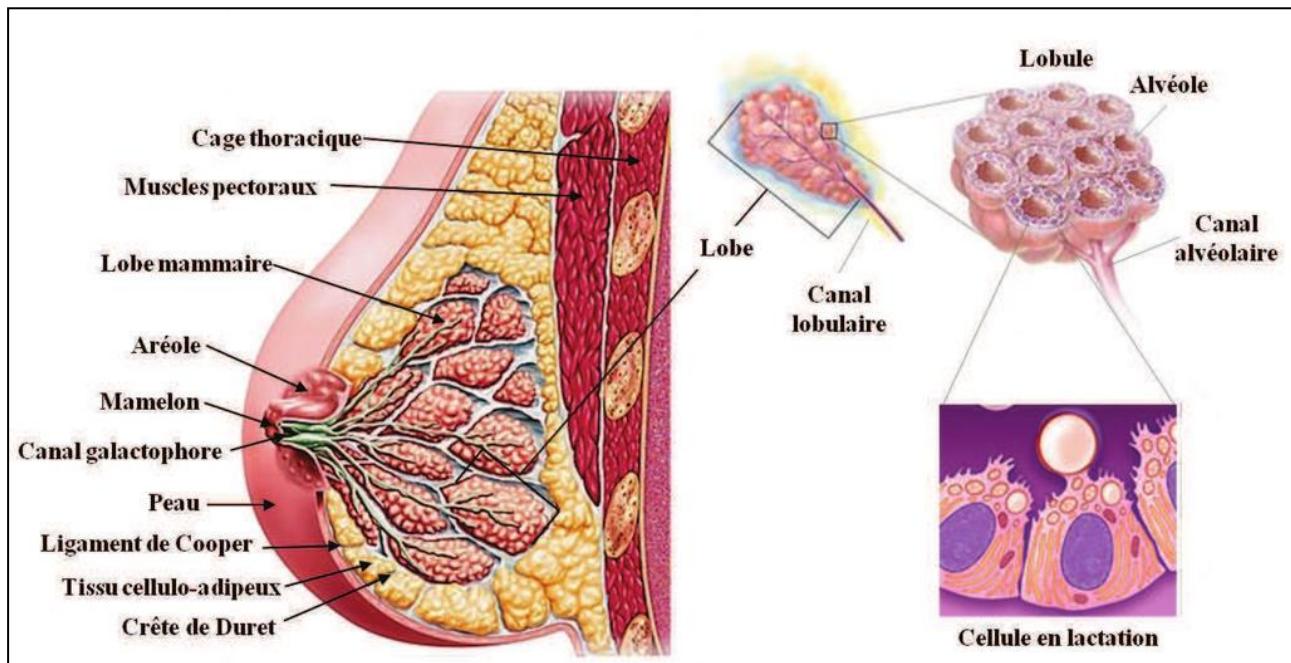


Figure 1 : Coupe sagittale de la glande mammaire (ELAMRANI *et al.*, 2013).

Le sein est soumis à d'importantes modifications tout le long de la vie de la femme et tout particulièrement au moment de la gestation, de la lactation et de l'involution. Ces étapes physiologiques s'accompagnent de trois mécanismes cellulaires très importants qui sont la prolifération, la différenciation et la mort cellulaire. (HARRIS *et al.*, 2006).

I.2 Hormones et sein

Le sein est sensible aux hormones stéroïdiennes (œstrogène, progesterone et androgènes) et peptidiques (prolactine, hormone de croissance et insuline).

1.2.1 Les œstrogènes

Les œstrogènes jouent un rôle important dans le développement de la glande mammaire au cours de la vie. Ces hormones sont fabriquées au cours de la première partie du cycle menstruel, après les menstruations. Elles pénètrent par voie passive dans la cellule, se fixent sur leurs récepteurs cytoplasmiques ou nucléaires, RE alpha et RE bêta. Les œstrogènes stimulent également la prolifération des cellules épithéliales, favorisent la croissance des canaux galactophores, augmentent la vascularisation du tissu conjonctif palléal et favorisent la croissance et la pigmentation de la plaque aréolomamelonaire. Ils n'ont pas d'effet prolifératif direct mais stimulent la production d'un certain nombre de facteurs de croissance (TGF alpha, IGF1, PDGF) par les éléments de la matrice extracellulaire. Cependant, cette matrice extracellulaire, abondante au repos est très réduite autour des cellules des bourgeons en croissance. Ceci suggère un autre mécanisme d'action sans doute prépondérant des œstrogènes : la matrice extracellulaire a un rôle inhibiteur sur la croissance du sein, les œstrogènes agiraient en favorisant sa destruction locale permettant aux bourgeons mammaires de proliférer. L'action stimulante des œstrogènes pourrait comporter son propre frein en permettant la synthèse d'éléments tel que le collagène IV inhibant la multiplication cellulaire (LESUR *et al.*, 2004).

Les œstrogènes existent en trois formes : E1 ou l'estrone, E2 ou le 17 β -œstradiol (la forme active) et E3 ou l'œstriol (MANGELSDORF *et al.*, 1995). Dans la glande mammaire, les œstrogènes régule, suite à la liaison de 17 β -œstradiol, la croissance cellulaire et la différenciation tout en contrôlant l'expression de ses gènes cibles. Cette liaison favorise le recrutement des corégulateurs: les coactivateurs/les corépresseurs pour activer/inhiber la transcription des gènes cibles. Le mécanisme classique génomique de l'œstrogène implique sa liaison à l'ADN soit directement via un ERO (Elément de Réponse aux Œstrogènes), localisé sur des régions régulatrices des gènes cibles, soit indirectement via des facteurs de transcription, AP-1 (Activator Protein-1), Sp1 (Specificity Protein1), NF- κ B (Nuclear Factor κ B), C/EBP β (CCAAT/Enhancer Binding Protein β) et STAT5 (Signal Transducer and Activator of Transcription 5) (BJORNSTROM et SJOBERG, 2005 ; THOMAS et GUSTAFSSON, 2015). L'œstrogène peut activer la transcription même en absence de 17 β -œstradiol via les récepteurs des facteurs de croissance EGFR (Epidermal Growth Factor Recepteur) et IGFR (Insulin-like Growth Factor 1 Receptor). Ces récepteurs stimulent les cascades des protéines kinases qui phosphorylent et activent les œstrogènes (BRITTON *et al.*, 2006). Le récepteur d'œstrogène α (RE α) est exprimé dans 70 % des cancers de sein à un niveau d'expression plus élevé que le récepteur d'œstrogène (RE β). Cette caractéristique permet de considérer les RE comme une cible thérapeutique privilégiée dans le cancer du sein et la variation de son expression a un impact sur la réponse au traitement. Les RE régulent l'expression des gènes liés au développement de la glande mammaire et toute altération de l'expression de ces gènes est associée à une progression de cancer de sein (WELBOREN *et al.*, 2009).

RE α stimule la prolifération et la survie des cellules cancéreuses mammaires tout en induisant l'expression des gènes *myc* et CCND1 (GIULIANELLI *et al.*, 2013).

Les RE sont retrouvés à la surface ou à l'intérieur des cellules normales du sein et de certains types de cellules du cancer du sein. C'est sur ces récepteurs que les hormones se fixent aux cellules. Une fois qu'elles s'y sont fixées, les hormones peuvent affecter le comportement ou la croissance des cellules. Les cellules du cancer du sein qui ont des récepteurs RE ont besoin de cette hormone pour croître et se diviser. Le statut des récepteurs hormonaux indique aux médecins si l'hormonothérapie risque de ralentir ou d'interrompre la croissance des cellules cancéreuses. Les tumeurs RE positives sont souvent traitées par hormonothérapie (HAMMOND *et al.*, 2010). Le cancer du sein hormono-dépendant est lié à un dérèglement du fonctionnement des œstrogènes et leurs récepteurs. En effet, près de 60 % des tumeurs cancéreuses mammaires présentent initialement une croissance dépendante des œstrogènes. En revanche, alors que les effets prolifératifs des œstrogènes semblent clairement impliquer RE α , RE β exercerait plutôt des effets anti-prolifératifs. Paradoxalement, les tumeurs RE α -positives sont souvent moins invasives que les tumeurs RE négatives et leur pronostic est généralement meilleur (ELWOOD et CRAIG, 2003).

1.2.2 La progestérone

La progestérone a une action complémentaire à celle des œstrogènes. Elle est principalement secrétée pendant la deuxième partie du cycle, avant les menstruations. Elle est nécessaire à la différentiation lobulo-alvéolaire du sein. *In vivo* et contrairement à ce qui se passe au niveau de l'endomètre, l'index mitotique des cellules épithéliales est maximal en phase lutéale. En fait, l'action de la progestérone n'est probablement pas univoque, elle a un effet mitogène sur les cellules dont la prolifération dépend de l'EGF, un effet anti-mitogène sur celles dont la prolifération ne dépend pas de l'EGF. Elle est dotée également d'une action antiproliférative sur l'épithélium canalaire et acineux, et une action proliférative sur les terminaisons ductulo-lobulaires. Elle exerce un effet biphasique dans le temps : prolifératif en phase lutéale précoce puis antiprolifératif (LESUR *et al.*, 2004).

Le récepteur de la progestérone (RP) est une protéine de la superfamille des récepteurs nucléaires et de la famille des récepteurs des stéroïdes, liant naturellement la progestérone, qui est la principale hormone progestative dans l'organisme. Le RE est exprimé dans les tissus des organes reproducteurs, particulièrement dans les ovaires, car la progestérone est avant tout un stéroïde ovarien et placentaire (LEE *et al.*, 2006). Il se présente sous la forme de deux isoformes, PRA et PRB, qui diffèrent en taille et poids moléculaire. Dans une cellule dite normale, PRA et PRB coexistent selon un ratio de 1 afin de permettre le contrôle physiologique de l'action de la progestérone. Cependant, il existe un lien entre le récepteur de la progestérone et la cancérogenèse mammaire. En effet, il peut survenir un débordement de ce ratio où PRA prédomine. Cette situation fut observée chez des patientes

porteuses d'une mutation sur les gènes BRCA1/BRCA2 ou d'hyperplasies mammaires qui sont des lésions précancéreuses. De plus, une augmentation de PRA par rapport à PRB provoquerait une diminution de l'adhésion cellulaire, donc une perte d'inhibition de contact des cellules. Le débalancement du ratio PRA/PRB s'avère une situation observée dans 50% des tumeurs. De plus, si l'expression de PRA/PRB augmente, la résistance au tamoxifène, sera plus forte (JACOBSEN *et al.*, 2012).

1.2.3 Action combinée des hormones stéroïdiens sur le sein

Les deux hormones, œstradiol et progestérone, agissent en synergie et sont nécessaires au développement de la glande mammaire apte à la lactation (REID *et al.*, 1996). Au cours du cycle menstruel, la phase proliférative (première moitié du cycle sous l'effet des œstrogènes) est marquée par une multiplication des cellules épithéliales, une augmentation de la synthèse d'ARN et de la production protéique, une réduction de la lumière des acini et un afflux de lymphocytes dans le tissu conjonctif (VOGEL *et al.*, 1992). La phase lutéale (seconde moitié du cycle sous l'effet de la progestérone) est caractérisée par une dilatation de la lumière des acini (différenciation des cellules épithéliales en cellules sécrétoires), un épithélium quiescent, une vacuolisation des cellules myoépithéliales et un œdème du tissu conjonctif. Toutes ces modifications entraînent une modification du volume du sein qui apparaît généralement plus tendu voire sensible ou douloureux (LONGACRE et BARTOW, 1986).

Pendant la grossesse, période d'inflation œstrogénique, progestative et prolactinique, la glande mammaire est modifiée considérablement. Les œstrogènes ont une action proliférative sur l'épithélium qui débute dès le premier trimestre de la grossesse. La progestérone a également une action proliférative, permet la différenciation de l'épithélium mammaire et s'oppose à l'action sécrétoire de la prolactine avant l'accouchement. Ainsi, en fin de grossesse, les cellules épithéliales des acini sont pleinement différencierées en cellules sécrétrices (RUSSO *et al.*, 2004). Pendant la lactation, les effets inhibiteurs de l'œstrogène et de la progestérone sur la prolactine disparaissent après l'accouchement, permettant la lactation. Les acini sont distendus par un matériel de sécrétions à la fois dans les cellules et dans la lumière des unités ductulo-lobulaires. Après la fin de l'allaitement, le sein retrouve son état latent antérieur tout en conservant un réseau canalaire plus développé, prolongé par des unités terminales ductulo-lobulaires (CLEVENGER, 2003). A la ménopause, la chute des taux d'œstrogène et de progestérone provoque une raréfaction des acini (TAVASSOLI, 1992). Les cellules épithéliales et myoépithéliales s'atrophient alors que la membrane basale s'épaissit. Le tissu conjonctif subit aussi une évolution avec altération des fibres élastiques et collagènes aboutissant à une ptôse mammaire. Le sein de la femme ménopausée devient essentiellement constitué de tissu adipeux.

Parmi les autres hormones stéroïdiennes, les androgènes sécrétés par la glande surrénale, agissent sur le sein. Chez la femme les androgènes s'opposent à la croissance et à la différenciation cellulaire et

chez le fœtus mâle, ils provoquent la nécrose de l'ébauche mammaire. A l'état physiologique, la testostérone circulante est le seul androgène réellement actif biologiquement chez la femme. Un tiers de la testostérone provient de la conversion périphérique d'androgènes ovariens et surréaliens (HOUDEBINE, 1993).

I.2.4 La prolactine

Pendant la période de croissance mammaire qui débute à la puberté, la prolactine est indispensable pour assurer une croissance des canaux alvéolaires. Cette action se fait en association avec les œstrogènes, la progestérone et les glucocorticoïdes. La prolactine est nécessaire au développement lobulo-alvéolaire qui s'effectue au terme de la première grossesse. La lactogenèse ou initiation de la sécrétion lactée correspond à la différenciation finale de la cellule mammaire et nécessite l'association de la prolactine, des glucocorticoïdes, de l'insuline et des hormones thyroïdiennes. Enfin, la prolactine participe au maintien de la sécrétion lactée. Au niveau de la cellule mammaire, la prolactine stimule la biosynthèse des protéines, des lipides et des glucides du lait (RUI *et al.*, 1992).

II. Le cancer mammaire

Le cancer du sein est une tumeur maligne se développant à partir des cellules constituant la glande mammaire. Assez souvent, cette prolifération commence par la transformation d'une seule cellule qui constitue, au bout de dix doublements, une population d'environ 1000 cellules tumorales. Au bout du vingtième doublement cellulaire, il y a environ 1 million de cellules tumorales, ce qui correspond pourtant à une très petite quantité de tissu cancéreux, soit environ 1mg (GAILLARD, 2007).

La notion de « Cancer du sein » relève d'une nomenclature générique qui fait référence à tout un ensemble de proliférations néoplasiques de la glande mammaire qui diffèrent tant du point de vue histologique qu'en ce qui concerne leur comportement évolutif (CROUÉ, 1999). Suivant que les cellules cancéreuses se développent dans les canaux ou dans les lobules, on parlera de cancers canalaire ou de cancers lobulaires. Lorsque les cancers restent limités à l'intérieur des canaux ou des lobules, on parle de cancers *in situ*. A ce stade, les cancers peuvent encore régresser spontanément dans un certain nombre de cas. Lorsque les cellules cancéreuses infiltrent les tissus autour des canaux ou des lobules, on parle de cancers infiltrants. Les cellules des cancers infiltrants peuvent se détacher de la tumeur d'origine et se propager via les vaisseaux sanguins ou lymphatiques. Elles s'accumulent alors dans les ganglions lymphatiques voisins. Les cellules cancéreuses ont tendance à migrer dans d'autres organes ou parties du corps, et à y développer des métastases (ARDIET, 2002).

II.1 Le processus de cancérisation

Le cancer du sein, comme tous les cancers, résulte d'altérations génétiques et épigénétiques affectant des cellules mammaires. Par la suite, ces changements touchent non seulement les cellules

cancéreuses mais peuvent également atteindre les cellules qui interagissent avec la tumeur telles que les cellules immunitaires, vasculaires et stromales (OSBORNE *et al.*, 2004). La plupart des modifications génétiques sont acquises, et ne sont présentes que dans les cellules cancéreuses, on parle alors de cancers du sein sporadiques. Dans seulement 10% des cas, ces altérations génétiques sont hérétées et prédisposent les individus à développer ce type de cancer. Dans tous les cas, ces événements permettent aux cellules d'acquérir un certain nombre de caractéristiques, il est suggéré que la progression vers un phénotype tumoral agressif passe par l'acquisition d'au moins six propriétés qui pourraient servir à dresser un portrait-robot de la cellule cancéreuse (HANAHAN et WEINBERG, 2000).

II.1.1 Indépendance vis-à-vis des signaux de prolifération :

Les cellules normales ont besoin de signaux de croissance pour passer d'un état de quiescence à un état de prolifération cellulaire. Ces signaux sont transmis grâce à des récepteurs transmembranaires qui lient des molécules de signalisation intracellulaire. Normalement, les cellules ne peuvent pas proliférer sans ces signaux de croissance. Les cellules tumorales perdent plus ou moins complètement cette dépendance aux signaux envoyés par le microenvironnement et peuvent générer leurs propres signaux de prolifération. En règle générale cette propriété est le fait d'activation de proto-oncogènes répartis dans les voies qui transmettent les signaux de proliférations (HANAHAN et WEINBERG, 2000 ; LAIRD, 2003).

II.1.2 Insensibilité aux signaux anti-prolifératifs :

Dans un tissu normal, des signaux anti-prolifératifs garantissent l'homéostasie tissulaire en maintenant les cellules dans un état de quiescence. Ces signaux permettent, en particulier, de contrôler la progression du cycle cellulaire de la phase G1 à la phase S. A cette étape, ces signaux peuvent forcer les cellules en prolifération à entrer en état de quiescence ou en état post-mitotique pour acquérir des caractéristiques spécifiques de cellules différenciées. Il existe plusieurs moyens, pour une cellule tumorale, d'échapper aux différents «freins» antiprolifératifs constitués par des et devient insensible à ces signaux et prolifère de façon incontrôlée. L'un de ces gènes suppresseurs de tumeurs est le gène RB1 qui commande l'entrée des cellules dans la phase S. dans les cellules cancéreuses, la délétion de ses deux allèles, ou leur inactivation par des mutations ponctuelles, supprime le blocage qui apparaît normalement lorsque les circonstances l'exigent (BLANCHARD, 2003).

II.1.3 Acquisition d'une résistance à l'apoptose :

Dans chacune de nos cellules, un compte à rebours est lancé. Toutes sont programmées pour mourir après un certain nombre de divisions. La mort cellulaire programmée par apoptose permet de contrôler la quantité de cellules dans un tissu. La machinerie apoptotique est composée de senseurs et

d'effecteurs. Les senseurs sondent l'environnement extracellulaire et intracellulaire afin de déterminer si une cellule doit «vivre» ou «mourir» selon les conditions. Ainsi, la capacité d'expansion des cellules tumorales est liée à la prolifération incontrôlée des cellules et à la résistance à l'apoptose. Cette propriété résulte, soit à la disparition/inactivation de gènes clés inducteurs de l'apoptose tels que TP53 ou de l'expression dérégulée de gènes qui exercent un effet anti-apoptotique tel que BCL-2 ou encore la perte d'expression des antagonistes pro-apoptotiques tels que BAX. En effet, ses défaillances sont à l'origine de la très grande majorité des cancers, les cellules deviennent immortelles et se divisent à l'infini (MOREAU, 2003).

II.1.4 Potentiel illimité de réPLICATION :

Aux extrémités de chaque chromosome se forme une chaîne d'ADN, le télomère, par le biais d'une enzyme appelée télomérase. Cette séquence représente le capital de vie de nos cellules. A chaque division, elle est raccourcie, et lorsqu'elle est épuisée, la cellule meurt. Cette réserve permet d'assurer environ 60 divisions pour la plupart des cellules. Normalement, nos cellules ne fabriquent plus de télomérase après l'embryogenèse, à l'exception des cellules souches. Mais il peut arriver qu'un gène mute et en réactive la production. Lors de la division cellulaire, le télomère est rallongé par l'ajout des séquences répétées. C'est cela même qui confère l'immortalité des cellules cancéreuses et les rendent capables de répliquer leur ADN de façon illimitée. Même si les cellules cancéreuses peuvent proliférer de façon incontrôlée, elles ont un programme interne qui limite leur multiplication. Après un certain nombre de multiplication, les cellules meurent par sénescence. Ce phénomène de sénescence est lié à l'érosion des télomères. A chaque cycle de division, les télomères perdent entre 50 et 100 paires de base. Le raccourcissement des chromosomes est dû à l'incapacité des ADN polymérasées à répliquer complètement les extrémités 3' des chromosomes durant chaque phase S. Lorsque les extrémités des chromosomes ne sont plus protégées par les télomères, des événements de fusion chromosomique peuvent affecter le caryotype de la cellule. Ces changements drastiques au niveau du caryotype vont causer la mort de la cellule en état de «crise» (SHEN *et al.*, 2011).

II.1.5 Stimulation de l'angiogenèse :

L'apport d'oxygène et de nutriments est essentiel pour le fonctionnement et la survie des cellules. Dans les tissus, Les cellules doivent être assez proches des vaisseaux sanguins pour être desservies par la circulation sanguine, c'est pourquoi le réseau vasculaire est fortement développé pour alimenter toutes les cellules du corps humain.

En situation saine, la prolifération cellulaire fait partie d'un vaste programme de construction du tissu qui s'accompagne naturellement d'une induction de l'angiogenèse. À l'inverse, la prolifération des cellules tumorales est anormale et par conséquent la croissance de la tumeur ne s'accompagne pas de l'angiogenèse. La prolifération de ces cellules provoque leur éloignement de la circulation sanguine à

cause de l'augmentation de l'épaisseur et de la taille du tissu. Lorsque la tumeur atteint une certaine taille, sa croissance s'arrête puisqu'elle n'est plus suffisamment alimentée par la circulation sanguine. Pour que la croissance tumorale continue, la tumeur doit acquérir la capacité à stimuler l'angiogenèse. Cette obligation constitue une barrière naturelle contre l'apparition de cancers.

Les tumeurs qui font l'acquisition de cette capacité induisent l'angiogenèse de façon permanente en sécrétant des facteurs angiogéniques tel que le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) qui active la prolifération des cellules endothéliales pour vasculariser la tumeur. Cette stimulation dérégulée donne naissance à un réseau vasculaire tumoral désorganisé et anarchique. Une tumeur qui est capable d'induire l'angiogenèse peut croître de façon démesurée puisqu'elle n'a plus de limite d'approvisionnement. Cette forte croissance tumorale peut asphyxier les tissus sains de l'organe que la tumeur occupe et peut provoquer leur mort, ce qui a pour conséquence de menacer la fonctionnalité de l'organe touché (HANAHAN et WEINBERG, 2000 ; WILDIERS *et al.*, 2003).

II.1.6 Pouvoir d'invasion et de dissémination (métastases) :

Au cours du développement tumoral, les cellules épithéliales, très organisées dans le tissu, subissent des changements morphologiques qui les transforment en cellules mésenchymales capables de migrer. La migration cellulaire est essentielle au cours de la progression tumorale pour disséminer les cellules tumorales au sein du tissu et à distance dans l'organisme. La migration cellulaire est dépendante des propriétés d'adhérences entre les cellules et avec la matrice extracellulaire. La perte d'adhérence de la cellule épithéliale avec les cellules adjacentes entraîne une perte de polarité qui est associée à la transition épithélio-mésenchymateuse et qui facilite l'initiation de la migration. Pour envahir les tissus adjacents, les cellules cancéreuses doivent se créer «un chemin» à travers la matrice extracellulaire.

L'invasion est un processus de dégradation de la matrice extracellulaire qui est réalisé par l'activité protéolytique de certaines métalloprotéases et dépend du microenvironnement. Elle doit être finement régulée: la matrice extracellulaire doit être suffisamment dégradée pour permettre le passage des cellules mais la matrice est aussi indispensable au soutien et à l'ancrage pour la traction des cellules.

Les cellules migrantes colonisent les vaisseaux sanguins et lymphatiques que la tumeur a recrutés, pour lui apporter les éléments nécessaires à son développement. Dans le système circulatoire, les cellules sont capables de survivre en suspension, sans ancrage à la matrice extracellulaire, car elles sont résistantes à l'anoikis (apoptose induite par la perte d'ancrage). Via la circulation, les cellules cancéreuses atteignent le lit vasculaire d'autres organes et en sortir pour coloniser le tissu cible et y former des métastases. Au final, par rapport au nombre de cellules qui se détachent de la tumeur primaire, peu de cellules réussissent toutes ces étapes pour former des métastases sur un site secondaire. Au niveau du site métastatique, les cellules tumorales se repolarisent au cours de la transition mésenchymato-épithéliale. Si ces métastases possèdent la capacité de proliférer de façon incontrôlée, elles forment des

tumeurs secondaires qui vont altérer la fonction normale des organes envahis. Les métastases sont la cause du décès dans 90% des cas.

Les cellules qui deviennent cancéreuses échappent à des mécanismes de surveillance qui éliminent les cellules tumorales. Cette multitude de mécanismes de surveillance peut expliquer que l'apparition d'un cancer soit relativement rare au cours d'une vie humaine (HANAHAN et WEINBERG, 2000).

De très nombreuses données tendent à prouver l'existence d'une hiérarchie cellulaire dans les tumeurs solides, dirigée par des cellules cancéreuses ayant des propriétés de cellules souches : les cellules souches cancéreuses. L'existence de cellules souches normales dans le sein à l'état adulte est très probable au regard même de la biologie de la glande. Les cellules souches normales épithéliales organisent le fonctionnement de la glande mammaire grâce à des propriétés intrinsèques spécifiques. Ces propriétés associent une longue durée de vie et une capacité à s'auto-renouveler et à produire des cellules filles capables de se différencier. La capacité d'auto-renouvellement permet de préserver et de réguler le *pool* de cellules souches normales dans la glande mammaire. Dans le cancer du sein, les cellules souches cancéreuses proviendraient directement des cellules souches normales adultes de l'épithélium mammaire qui seraient seules le siège des altérations génétiques tumorales (GINESTIER *et al.*, 2007).

II.2 Les gènes impliqués dans la cancérisation

Les oncogènes et les anti-oncogènes jouent un rôle prépondérant dans la carcinogenèse mammaire (Tableau I). Les oncogènes sont des gènes qui, activés ou surexprimés, induisent des signaux de prolifération cellulaire. Les anti-oncogènes ou gènes suppresseurs de tumeurs, freinent la prolifération cellulaire. Lorsqu'ils sont inactivés par une mutation, par exemple, ils n'exercent plus leur rôle de régulation négative. Schématiquement, à l'état normal, il existe un équilibre entre l'expression des oncogènes et des gènes suppresseurs de tumeurs. Des mutations successives de ces gènes rompent cet équilibre, entraînant une prolifération excessive des cellules tumorales mammaires. Les mutations des oncogènes sont souvent des mutations qui rendent ces gènes hyperactifs (PAUL et REGULIER, 2001).

Tableau I : Oncogènes et gènes suppresseurs de tumeurs impliqués dans les cancers du sein (OSBORNE *et al.*, 2004).

Oncogènes	Gènes suppresseurs de tumeur
HER-2	p53
PI3K	BRCA-1
Cycline D1	BRCA-2
Cycline E	Rb
<i>C-myc</i>	

Sur plus d'une centaine d'oncogènes identifiés, certains sont connus pour induire un cancer mammaire lorsqu'ils sont surexprimés dans des modèles de souris transgéniques.

❖ L'oncogène HER2

Connu également sous le nom de *erbB-2*, il est surexprimé dans 20 à 30% des cancers du sein invasifs. Ce gène est un membre de la famille des récepteurs aux facteurs de croissance épidermiques EGFR (Epidermal Growth Factor), famille de récepteurs transmembranaires à activité tyrosine kinase. Le gène HER2 code pour un récepteur qui n'a pas de domaine de liaison à un ligand. Toutefois, HER2 forme des hétérodimères avec les autres membres de la famille de l'EGFR, favorisant ainsi la stabilisation de la liaison au ligand et l'activation de la transmission du signal intracellulaire sous-jacent, tel que celui de la voie des Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) et des Phosphatidyl-Inositol-3 kinases (PI3K) (SALOMON, 2012). Son activation, en particulier dans les cancers du sein, est essentiellement liée à une amplification qui a pour conséquence d'entraîner une surexpression de la protéine à la surface des cellules (KAURANIEMI *et al.*, 2009 ; STAATF *et al.*, 2010). Les carcinomes HER2-amplifiés ont fait l'objet de nombreuses analyses génomiques, phénotypiques et transcriptomiques. Il s'avère que plusieurs types de carcinomes HER2-amplifiés existent, définis par le statut des RE, le type d'altérations génomiques associées ou la nature du stroma. Il a été montré que les carcinomes HER2-amplifiés, associés ou non à l'expression des récepteurs aux estrogènes, appartiennent à l'entité moléculaire apocrine, caractérisés entre autres par de nombreuses altérations de nombreux chromosomes et l'expression des récepteurs aux androgènes (GUEDJ *et al.*, 2011).

❖ L'oncogène PI3K

La voie de la phosphoinositide 3-kinase joue un rôle important dans les fonctions cellulaires clés telles que la croissance, la prolifération et la survie des cellules. L'aberration de la voie PI3K a été observée dans plusieurs tumeurs malignes humaines et peut résulter d'une mutation somatique, d'une amplification génique ou d'une modification épigénétique. Ces observations suggèrent un rôle significatif de la voie PI3K dans la carcinogenèse, la progression du cancer et la résistance au traitement. L'altération de PI3K est fréquente dans le cancer du sein. (SADEGHI et GERBER, 2012).

❖ L'oncogène *C-myc*

Le gène *c-myc* a été localisé sur le chromosome 8q24 et code pour une phosphoprotéine nucléaire qui agit comme un régulateur de transcription impliqué dans la prolifération cellulaire en formant un dimère avec la protéine Max, dans la différenciation et dans l'apoptose. Il est surexprimé dans 15 à 25% des tumeurs mammaires. (OSBORNE *et al.*, 2004).

❖ La protéine Rb

La protéine du rétinoblastome (pRb) est une protéine de séquestration qui exerce un contrôle négatif du cycle cellulaire. Cette fonction est essentielle dans les organismes pluricellulaires pour éviter la formation de tumeurs malignes qui mettraient en péril l'organisme, ce qui permet de qualifier cette protéine de « suppresseur de tumeur» (ALBERTS *et al.*, 2004). Elle régule la transition G1/S du cycle cellulaire en fonction de son état de phosphorylation. La pRb présente de nombreux sites de phosphorylation qui correspondent pour la plupart à des sérines ou des thréonines. Ces résidus sont la cible des Cycline dépendante de Kinase (CDK). En début de phase G1, pRb n'est pas phosphorylée puis subi une phosphorylation partielle. Dans ces 2 états, pRb inhibe le facteur de transcription E2F en interagissant avec lui. A la fin de la phase G1, pRb est complètement phosphorylée et ne peut plus interagir avec E2F. Ce dernier est alors libéré et permet la transcription des gènes nécessaires à la réalisation de la phase S. La phosphorylation de pRb suit l'apparition des complexes cycline/CDK. Dans un premier temps, seule CDK4 associée à la Cycline D phosphoryle pRb. Cette phosphorylation induit le changement de conformation de pRb et permet ainsi le recrutement du complexe Cycline E/CDK2 qui phosphoryle une deuxième fois pRb sur des sites différents de ceux utilisés par CDK4. Les complexes ; Cycline A/CDK2 et Cycline B/CDK1 permettrait de maintenir pRb dans un état phosphorylé (Figure 2) (GIACINTI et GIORDANO, 2006). La phosphorylation de la protéine RB1 par le complexe CycD1/CDK4 est inhibée par au moins trois protéines: la protéine p21WAF1 dont l'expression est contrôlée au niveau transcriptionnel par le gène suppresseur de tumeur P53, la protéine p16/MST1 et la protéine p15/MST2 (HUNTER *et al.*, 1994).

La voie de signalisation Rb est perturbée dans 3/4 des cancers. Le gène Rb n'est cependant directement en cause que dans une fraction faible des cancers du sein (7 à 37%) (JEANTEUR, 2002). Les mutations du gène suppresseur de tumeur Rb ou des composants régulant la voie CDK-Rb-E2F ont été identifiées dans presque toutes les tumeurs malignes humaines. Le rétablissement du contrôle du cycle cellulaire par inhibition des CDK est donc devenu une option attrayante dans le développement de thérapies ciblées contre le cancer. L'exemple le plus réussi aujourd'hui est l'utilisation du palbociclib inhibiteur de CDK4 et CDK6, associé à des inhibiteurs de l'aromatase dans le traitement des cancers du sein RE+ (JOHNSON *et al.*, 2016). Des études ont mis en évidence des rôles supplémentaires de la voie CDK-Rb-E2F dans la prolifération, l'angiogenèse et les métastases. Cette notion justifie l'utilisation précoce des inhibiteurs de CDK4/CDK6 qui s'imposent comme un traitement incontournable dans le cancer du sein afin de réduire non seulement la prolifération, mais aussi la diffusion (FINN *et al.*, 2015 ; TREDAN *et al.*, 2017).

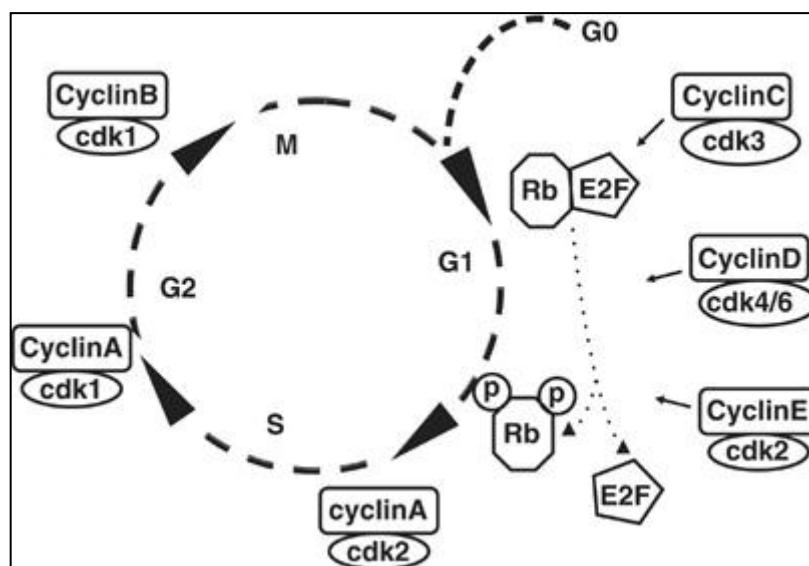


Figure 2 : La protéine Rb et régulation du cycle cellulaire (GIACINTI et GIORDANO, 2006).

❖ Le gène p53

Il code une phosphoprotéine de 53 KDa. Deux rôles particuliers sont dévolus à cette protéine : soit l'arrêt du cycle cellulaire entre la phase G1 et la phase S, soit la mort cellulaire par le phénomène d'apoptose. La protéine p53 se fixe sur une séquence spécifique d'ADN aboutissant à la transcription du gène WAF1/Cip1, (Wild Type p53-activated fragment et CDK2 inhibiting protein). La protéine, p21_{waf1} se lie à la kinase CDK2, et inhibe son activité. La cellule s'arrête alors avant la synthèse de l'ADN et peut réparer d'éventuels dommages. Lors d'une agression cellulaire, la concentration et la demi-vie de p53 s'accroissent par une diminution de sa dégradation physiologique. Il a été montré expérimentalement qu'une simple lésion double brin suffisait à induire une augmentation du taux de p53. Un autre mécanisme déclenchant est constitué par un mésappariement de bases ou une insertion/délétion de bases. En présence de P53 muté, l'ADN n'est plus réparé, il en résulte une instabilité génomique associée à une accumulation de mutations provoquant une croissance incontrôlée (JACK et SCOTT, 2009).

Une très grande proportion des cancers du sein portent des mutations dans le gène P53 qui est un acteur-clé de la décision d'une cellule de progresser dans le cycle cellulaire ou de s'engager dans la voie de l'apoptose et qui est lui-même régulée par des protéines telles que Pin1 et HOXA5. La conformation fonctionnelle du p53 est régulée par la Prolyl-isomérase Pin1 qui est un composant de la peptidyl-prolyl-isomérase, impliquée dans le domaine du cancer comme un régulateur important de nombreuses protéines impliquées dans le cycle cellulaire et l'apoptose. Pin1 agit sur des prolines succédant à un résidu sérine ou thréonine dès lors que celui-ci est phosphorylé. Or, il se trouve que p53 contient trois

sites de ce type (deux Ser-pro et un site Thr-Pro) qui sont phosphorylables par les MAPkinases ou les CDK (JEANTEUR, 2002).

Une équipe de scientifiques menée par le Dr Sukumar a cherché à déterminer quels mécanismes pouvaient expliquer la perte de fonction de p53 dans le cancer du sein. Ils ont ainsi montré que le taux d'ARNm de p53 était bas dans une grande proportion de tumeurs mammaires ce qui indiquait un trouble de la régulation de l'expression du gène. Dans cette optique, les auteurs ont mis en évidence plusieurs sites de fixation de protéines HOX sur la séquence promotrice du gène p53, ce qui revenait à dire que la transcription de p53 pouvait éventuellement être régulée par des protéines HOX. Cette hypothèse a été vérifiée par l'expression de HOXA5 dans ce type cellulaire, expression qui a activé le promoteur du gène p53. Restait alors à évaluer l'effet global de HOXA5 sur des cellules cancéreuses. Pour ce faire, les chercheurs ont exprimé HOXA5 dans des cellules épithéliales cancéreuses exprimant le gène p53 sauvage. Ceci a entraîné la mort cellulaire par apoptose. Par contre, l'apoptose n'a pas eu lieu dans le cas de cellules dépourvues de p53. Il semblait donc que HOXA5 déclenche indirectement l'apoptose en stimulant la transcription de p53. De ce fait, une diminution du taux de HOXA5 pouvait expliquer la perte d'activité de p53 dans des cellules dont le gène P53 était normal (RAMAN *et al.*, 2000).

❖ Les gènes *BRCA1* et *BRCA2*

Ce sont des anti-oncogènes à l'origine de la plupart des cancers du sein héréditaires. Ces deux gènes participent à la réparation des lésions que l'ADN subit régulièrement. La présence de mutations dans l'un de ces deux gènes perturbe cette fonction et fait augmenter fortement le risque de cancer du sein. Néanmoins, toutes les femmes porteuses de ces mutations génétiques ne développeront pas systématiquement un jour un cancer du sein (ANTONIOU *et al.*, 2003).

Un grand nombre de fonctions sont attribuées au gène BRCA1, notamment sa capacité à maintenir l'intégrité du génome, à contrôler le cycle cellulaire, ainsi que l'apoptose. Parmi toutes ses fonctions, le gène BRCA1 a celle d'interagir avec le proto-oncogène *c-myc*, et d'inhiber ainsi la transformation cellulaire induite par *c-myc*. BRCA1 bloque aussi l'activité transcriptionnelle du récepteur à l'œstrogène α en interagissant directement avec la partie N-terminale de ce dernier. BRCA1 se lie directement à p53 en provoquant une augmentation de l'activité de p53 (ROSEN *et al.*, 2003). Enfin, BRCA1 a une influence sur le cycle cellulaire en inhibant la phosphorylation de pRb et la progression du cycle cellulaire en phase S (PAVELIC et GALL-TROSELJ, 2001).

Le gène BRCA1 est donc un maillon essentiel dans le maintien de l'activité normale d'une cellule, c'est pourquoi les personnes qui possèdent une mutation héréditaire de ce gène présentent 50 à 80% de risque de développer un cancer du sein par la perte de l'allèle non muté du gène (KUBISTA *et al.*, 2002).

CYCLE CELLULAIRE ET CYCLINES

I. Le cycle cellulaire

L'un des enjeux de la recherche sur le contrôle de la prolifération cellulaire est de comprendre comment les réseaux de signalisation qui régulent la progression du cycle cellulaire et ses freins, ainsi que l'induction de la mort cellulaire programmée, sont mis en place, contrôlés et interconnectés, afin de garantir le maintien de l'intégrité du génome et de l'organisme (CHABALIER *et al.*, 2006).

I.1 Les étapes du cycle cellulaire

La division cellulaire est à la base du développement et de la maintenance d'un organisme vivant. Pour qu'une cellule en engende deux, elle doit accomplir un parcours complexe, composé de plusieurs phases caractérisées par des événements cellulaires distincts. Les eucaryotes, de la levure à l'homme, ont des cycles de division similaires. Les premières études par microscopie optique ont permis de définir cinq étapes dans le cycle cellulaire : les phases G0, G1, S, G2 et M (Figure 3).

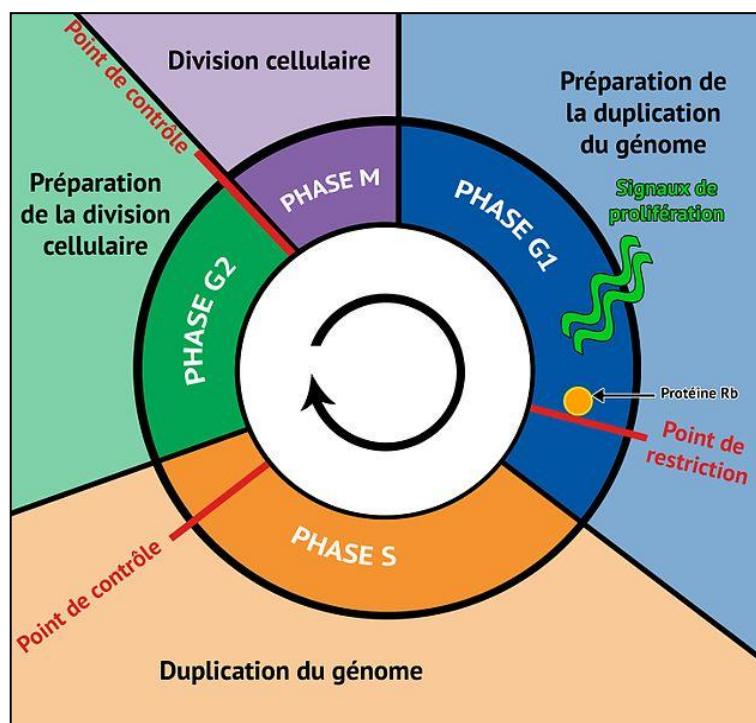


Figure 3 : Principales phases du cycle cellulaire (BLOTTIERE et BUECHER, 2001).

- **La phase G_0 :**

Les cellules sont dites au repos ou quiescentes. Soit elles se différencient pour accomplir des tâches spécifiques, nécessaires au fonctionnement de l'organisme, soit elles attendent un moment favorable pour s'engager dans une division, ou enfin, elles deviennent sénescantes et proches de la mort.

- **La phase G_1 :**

Elle est caractérisée par la mise en route du programme de division qui se traduit par la synthèse d'ARN et de protéines nécessaires à la réplication de l'ADN. Ce n'est que dans cette phase du cycle, que des mécanismes de régulation répondant à des signaux extracellulaires déterminent si la cellule s'engage dans une nouvelle division cellulaire ou si elle interrompt son cycle pour entrer en phase de repos G_0 . Au cours de cette phase les complexes Cycline D/CDK4 et Cycline D/CDK6 Phosphorylent et inactivent la protéine Rb, ce qui a pour effet de libérer les facteurs de transcription E2F qui contrôlent l'expression de gènes nécessaires pour la transition G_1/S et pour la progression de S (synthèse des cyclines E et A, entre autres).

La progression en phase G_1 nécessite une stimulation continue par des mitogènes et peut être stoppée par des cytokines antiprolifératives. Une fois qu'un point critique est franchi dans la phase G_1 ,

les cellules deviennent réfractaires à tout signal de régulation de la croissance cellulaire et s'engagent dans un processus autonome de division (SHERR, 1996).

- **La phase S :**

La transition G1/S est sous le contrôle du point de restriction R, lui-même sous le contrôle de plusieurs protéines, Rb, E2F, cdk2, cdk4. A la phase G1, Rb non phosphorylé se lie à E2F et l'inhibe. Pendant le passage G1/S, Cycline D/CDK4 et Cycline E/CDK2 hyperphosphorylent Rb et libère E2F qui forme un hétérodimère avec la protéine DP. Ensemble, ils jouent le rôle de facteur de transcription et induisent des gènes cibles, permettant la progression vers la phase S, au cours de laquelle a lieu une réplication semi-conservative de l'ADN qui assure la pérennité de l'information génétique dans les cellules filles. Elle se termine lorsque chaque chromosome est composé de 2 chromatides sœurs identiques.

- **La phase G₂:**

C'est une phase de transition entre la fin de la synthèse de l'ADN et la division même de la cellule, elle est sous le contrôle du complexe Cycline A/CDK1. Durant cette transition, les liaisons phosphates entre protéines augmentent considérablement, indiquant que la phosphorylation constitue un mécanisme important pour les profondes réorganisations structurelles qui accompagnent l'entrée des cellules dans la mitose (NIGG, 1995).

- **La phase M :**

Elle commence par une division nucléaire (mitose) et s'achève par une division cytoplasmique (cytodièrèse). Elle est divisée en prophase, métaphase, anaphase et télophase. La prophase est caractérisée par la fragmentation de l'enveloppe nucléaire, la formation du fuseau mitotique et la condensation des chromosomes. En métaphase, les chromosomes se rassemblent sur la ligne médiane du fuseau mitotique. En anaphase, les chromatides sœurs se séparent et migrent chacune d'un côté du fuseau. En télophase, le fuseau mitotique se défait, deux nouvelles enveloppes nucléaires se forment et le cytoplasme se scinde en deux pour donner naissance à deux cellules filles (MEIJER, 2006).

Le mode d'enchaînement et la durée des phases du cycle cellulaire peuvent varier grandement d'un type cellulaire à un autre. Des signaux extérieurs contrôlent à la fois l'entrée dans le cycle à partir de l'état de repos (phase G₀) et la sortie du cycle cellulaire vers la différentiation terminale. Plusieurs points de contrôle assurent le bon déroulement des événements dans le cycle cellulaire. En cas de problème, des mécanismes de régulation complexes provoquent l'arrêt du cycle au niveau de ces points de contrôle pour permettre, par exemple, la réparation de dommages dans l'ADN, le réajustement des chromosomes sur le fuseau mitotique ou encore pour enclencher un programme de suicide cellulaire en présence d'altérations trop importantes (MURRAY, 1992). Ces mécanismes ont donc pour but de

préserver l'intégrité de l'information génétique en éliminant tout risque de présence d'un génome muté ou instable dans les cellules filles. Ils doivent être tout particulièrement élaborés et performants chez les mammifères à durée de vie longue, comme l'être humain, où l'instabilité génétique, même limitée à quelques cellules, constitue une sérieuse menace pour la survie de tout l'organisme. Malgré les gardiens très performants que la nature a développés, il arrive parfois que des altérations génétiques se produisent dans des cellules et leur confèrent une résistance aux mécanismes de contrôle de la phase G₁. Ces cellules tendent à rester perpétuellement en division. Il en découle une perturbation considérable des processus de maturation et de différenciation cellulaire qui se produisent normalement lors de la phase G₀. Le processus de dégénérescence maligne est enclenché et entraîne de redoutables conséquences. La lutte contre le cancer passe donc forcément par une compréhension des mécanismes de régulation du cycle cellulaire, tout particulièrement en phase G₁ (NURSE, 2000).

I.2 Régulation du cycle cellulaire

La prolifération est nécessaire à la survie. Elle est contrôlée et elle se fait à des vitesses et selon des mécanismes propres à chaque type cellulaire. Les mécanismes de la régulation du cycle cellulaire reposent essentiellement sur les deux structures protéiques complémentaires CDK et cycline. La CDK est la composante de base, mais, comme son nom l'indique, elle a besoin d'une cycline pour activer ses fonctions. Les CDK et les cyclines s'associent et forment des complexes hétéro-dimériques et la régulation de la quantité et de l'activité de ces complexes contrôle la vitesse de la progression du cycle (LIM et KALDIS, 2013). Les cellules de mammifères ont 3 isoformes de CDC25 : CDC25A, CDC25B et CDC25C. Il semblerait que les 3 CDC25 soient capables d'agir à différents moments au cours du cycle cellulaire pour activer des complexes cyclines/CDK spécifiques. Les phosphatases CDC25 apparaissent comme des régulateurs majeurs des différentes transitions du cycle cellulaire, puisque leur invalidation ou leur surexpression conduit à des anomalies dans la progression du cycle cellulaire, et leur coopération conduit à une bonne activation temporelle des complexes cyclines/CDK (ARESSY ET DUCOMMUN, 2008) (Figure 4). Les composantes moléculaires du cycle cellulaire et de ses points de surveillance (*checkpoints*) sont importantes en cancérologie. En effet, leur connaissance peut servir à détecter les prédispositions familiales, à évaluer individuellement les tumeurs et à identifier leurs déterminants moléculaires, ainsi qu'à mettre au point de nouvelles approches thérapeutiques, éventuellement adaptées à chaque type de tumeurs en fonction de ses caractéristiques moléculaires. (GOTO *et al.*, 2012).

Un point de contrôle représente un moment critique du cycle cellulaire au cours duquel un stimulus dicte l'arrêt ou la poursuite de la progression dans le cycle. On peut distinguer le point de contrôle à la transition G₁/S, le point de contrôle intra-S, le point de contrôle à la transition G₂/M, et le point de contrôle d'assemblage du fuseau mitotique. L'activation d'un point de contrôle suite à

l'apparition de lésions au niveau de l'ADN entraîne le ralentissement voire un arrêt de la progression dans le cycle, ce qui permet de limiter le risque de transmettre des mutations géniques aux cellules filles. Si l'une des étapes du cycle est perturbée et selon le stade plus ou moins avancé dans lequel elle se trouve, la cellule revient en G0, s'arrête ou se suicide (apoptose). En cas de défaillance de ces mécanismes internes, le système immunitaire, via les lymphocytes T cytotoxiques, peut lui aussi intervenir et tuer les cellules ou leur ordonner de se suicider, ce qui revient au même (BARTEK et LUKAS, 2007).

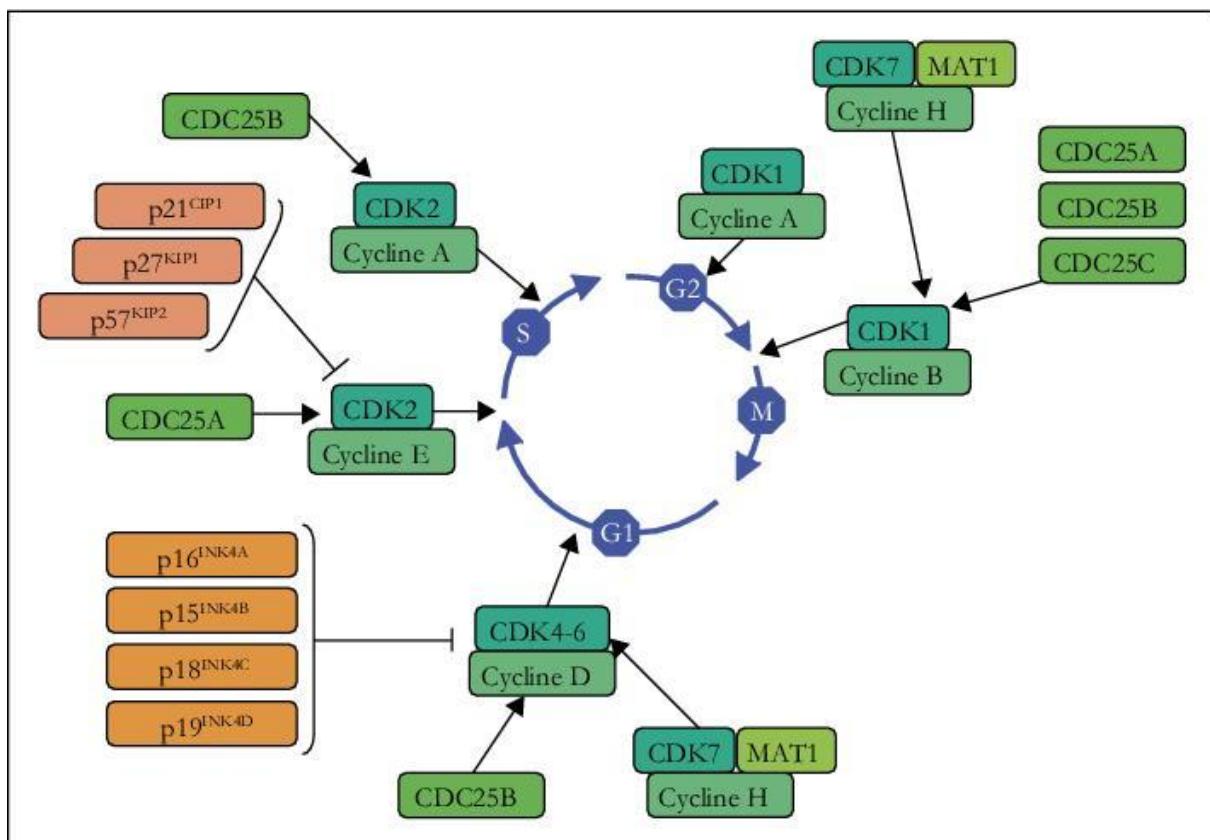


Figure 4 : Représentation schématique du cycle cellulaire et sa régulation par les complexes cyclines/CDK, eux-mêmes contrôlés par les phosphatases CDC25 (BRENNER *et al.*, 2014).

Cependant, pour qu'une cellule prolifère, le point critique qu'elle doit passer dans le cycle cellulaire est le point de restriction gardé par la protéine Rb. Les signaux de prolifération doivent être soutenus pour inactiver ce point de contrôle alors que le reste du cycle cellulaire progresse sans stimulation extérieure. Pour proliférer, les cellules cancéreuses sur-activent donc les signaux de prolifération cellulaire pour passer le point de restriction le plus rapidement possible en utilisant plusieurs stratégies.

Les cellules cancéreuses possèdent des mutations qui rendent les oncogènes constitutivement actifs. Par conséquent, ces oncogènes transmettent en permanence un signal de prolifération à la cellule indépendamment de la stimulation par un facteur de croissance normalement pré-requise. Les cellules cancéreuses peuvent aussi surproduire elles-mêmes le facteur de croissance qui active son propre récepteur à leur surface : c'est une stimulation autocrine de la prolifération cellulaire. À cause de ces signaux de prolifération permanents et intenses, la protéine Rb est maintenue inactive et le cycle cellulaire peut être initié à volonté. Les cellules cancéreuses bénéficient d'une prolifération autonome puisqu'elles ne dépendent plus des autres cellules pour obtenir l'autorisation de proliférer (prolifération «incontrôlée»). La protéine Rb est un suppresseur de tumeurs très important puisque c'est la dernière barrière que rencontrent les cellules cancéreuses pour pouvoir proliférer. Dans de nombreux cas de cancer, des mutations qui désactivent le gène Rb empêchent la protéine Rb de garder le point de restriction, ce qui confère aux cellules cancéreuses la capacité de proliférer librement (BERTOLI *et al.*, 2013).

Dans les cellules, la sur-activation des signaux de prolifération active la sénescence qui est un mécanisme naturel de défense contre les cellules qui bénéficient d'une stimulation de la prolifération anormalement élevée. La sénescence verrouille définitivement le point de restriction qui ne peut plus être inactivé par les signaux de prolifération et donc la cellule sénescante ne peut plus proliférer. Pour éviter la sénescence, les cellules cancéreuses ont recours à plusieurs solutions : générer des signaux de prolifération justement dosés pour inactiver le point de restriction mais ne pas activer la sénescence, ou bénéficier de mutations inactivant les gènes de la sénescence comme par exemple le gène suppresseur de tumeur p53 qui est inactivé dans la plupart des cancers (ANDERS *et al.*, 2011).

Au cours du cycle cellulaire, le gène suppresseur de tumeur Rb est la dernière barrière s'opposant à une prolifération incontrôlée mais d'autres barrières existent en amont de Rb, dans les voies mitogènes. Ces voies de signalisation sont composées de nombreuses protéines-relais qui transmettent le signal entre l'émetteur (le facteur de croissance) et le récepteur final de ce signal (la protéine Rb). Des gènes suppresseurs de tumeurs contrôlent certains de ces relais de signalisation en les inhibant, ce qui a pour conséquence d'inhiber la voie de signalisation de la prolifération. Parmi ces gènes, le gène suppresseur de tumeurs PTEN qui inhibe l'oncogène Akt dans la voie de signalisation de l'EGF. Ce contrôle permet de modérer les signaux de prolifération pour éviter une prolifération cellulaire trop intense ou cela permet de remettre la voie de signalisation au repos en l'absence de facteur de croissance. De cette façon, l'intensité des signaux de prolifération est contrôlée et la prolifération cellulaire reste dépendante d'une stimulation extérieure par un facteur de croissance, elle n'est pas autonome. Les cellules cancéreuses inactivent donc des gènes suppresseurs de tumeurs contrôlant les voies de signalisation de la prolifération cellulaire pour bénéficier d'une prolifération intense et autonome (SAGE, 2012).

1.2.1 CCND1 et cycle cellulaire

Le gène CCND1 appelé également, BCL1 ou PRAD1, est localisé en 11q13.3. Sa taille est de 13388 paires de bases (GILLETT *et al.*, 1998). Il est surexprimé dans 50% des cancers du sein, incluant le stade très précoce des carcinomes *in situ* (ABD EL-MAQSOUDE et ALY, 2010) (Figure 5).

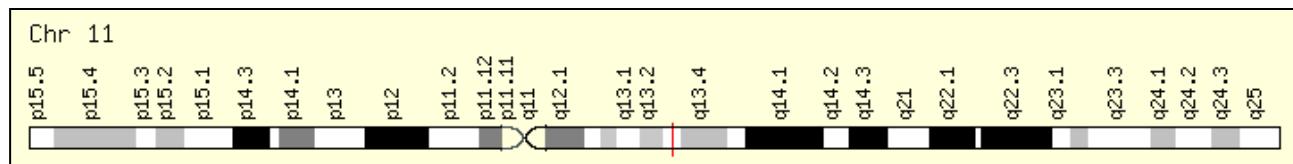


Figure 5 : Localisation du gène CCND1 sur le chromosome 11 (Gene cards®, base de donnée de gène Humain).

La nature même de la fonction du gène CCND1, constitue un argument supplémentaire en faveur de son implication dans la pathologie tumorale. Ce gène qui comporte cinq exons code pour CycD1, nécessaire au déroulement de la phase G1 du cycle cellulaire (SHERR, 1996). CCND1 est régulé positivement par le produit du gène suppresseur de tumeur RB1 sous sa forme hypophosphorylée, il existerait donc une boucle régulatrice où CycD1 joue un rôle essentiel dans le contrôle de la transition G1/S du cycle cellulaire (HUNTER *et al.*, 1994). L'expression de cette protéine est restreinte aux tissus non hématopoïétiques et n'a jamais pu être détectée dans les tissus lymphoïdes normaux. La micro-injection d'anticorps anti-CycD1 ou d'un vecteur d'expression antisens dans des fibroblastes diploïdes normaux empêche l'entrée des cellules en phase S. Inversement, l'expression constitutive de CCND1 accélère le transit cellulaire en G1 (QUELLE *et al.*, 1993, BALDIN *et al.*, 1993).

Au niveau moléculaire, CycD1 peut s'associer avec plusieurs protéines régulatrices du cycle cellulaire. En particulier, elle peut former des complexes multimériques avec la protéine CDK4, une kinase dépendante des Cyclines dont l'activité est restreinte à la phase G1 du cycle et avec la protéine anti-oncogénique RB1. L'association de CycD1 à CDK4 conduit à l'activation de l'activité kinasique de CDK4 et secondairement à la phosphorylation de la protéine RB1. Au début de la phase G1, la forme hypophosphorylée de la protéine RB1 fixe et inhibe les facteurs transcriptionnels de la famille E2F, protéines régulatrices nécessaires à l'expression de gènes associés à la transition G1/S. La phosphorylation de la protéine RB1 en fin de phase G1 par le complexe CycD1/CDK4 a pour conséquence de libérer les protéines E2F et de permettre la poursuite du cycle cellulaire (Figure 6) (TREDAN *et al.*, 2017).

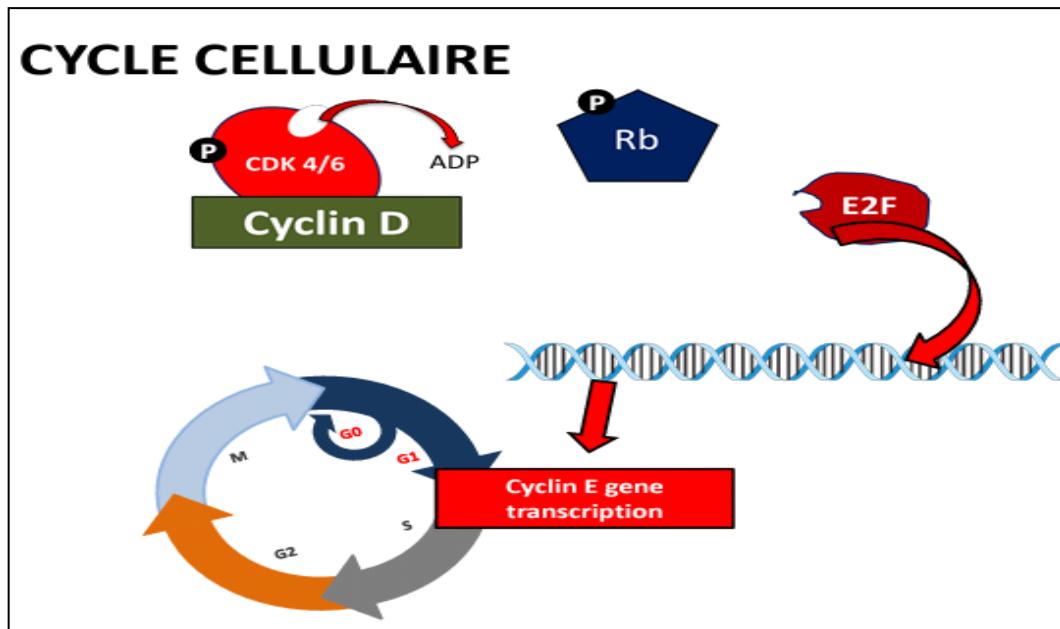


Figure 6 : Contrôle du cycle cellulaire par CycD1 et CDK4/6 (TREDAN *et al.*, 2017).

LES CYCLINES

Les cyclines sont des sous-unités régulatrices positives de kinases impliquées dans la régulation de la progression du cycle cellulaire. Chez les vertébrés, 9 cyclines (A à I) ont été découvertes et au moins 8 CDKs (CDK1 à 8) semblent impliquées dans la régulation du cycle cellulaire (HARDCASTLE *et al.*, 2002). Une cycline donnée peut s'associer à différents partenaires CDKs et vice-versa (PINES, 2005), ce qui rend l'attribution de fonctions pour chaque complexe CDK/Cycline très compliquée. La plupart des cyclines semblent plutôt ubiquitaires, exceptées les cyclines de type D : les cellules expriment, selon leur fonction, soit une association D2 et D1, soit une association D2 et D3, sans doute fonctionnellement non-équivalente (SHERR, 1996). L'apparition et la disparition périodiques de complexes Cycline/CDK distincts assurent l'alternance des phases S et M dans les cellules en division (NURSE et ORDERING, 1994). Le taux cellulaire en cyclines est déterminé d'une part au niveau transcriptionnel et d'autre part, par leur destruction, qui est sous la dépendance du système ubiquitine/protéasome (DULIC, 2012). La phosphorylation réversible des CDKs peut contrôler, en fonction du site de phosphorylation, soit positivement soit négativement l'activité de ces kinases.

L'activité des enzymes qui phosphorylent ou déphosphorylent les CDKs est, elle-même, contrôlée par phosphorylation (MORGAN, 1995).

Les cyclines sont une famille de protéines qui subissent des variations de leur taux au cours du cycle et qui partagent toutes un degré de similitude quant à leur composition en acides aminés. En effet, les cyclines sont définies par une région commune d'environ 100 acides aminés appelée *cyclin box* qui sert à lier et à activer les CDK (KOBAYASHI *et al.*, 1992 ; LEES *et al.*, 1993). On distingue d'une part les cyclines dites START ou G1 qui atteignent leur pic d'expression en phase G₁ (Cycline C, cyclines D : D1, D2 et D3) ou à la transition G₁/S (Cycline E) et d'autre part les cyclines dites mitotiques (Cyclines A et B) dont le pic d'expression se situe en G₂/M (PINES, 1998). Ces deux types de cyclines varient dans leur structure générale : les cyclines mitotiques ont environ 200 acides aminés situés dans la partie N-terminale alors que les cyclines START s'étendent en C-terminal pour former une région riche en proline, acide glutamique, sérine et thréonine appelée « PEST ». Cette dernière joue un rôle dans le renouvellement rapide de ces cyclines et leur confère une demi-vie très courte (PISCOPO et HINDS, 2008).

I. Les cyclines D

Les cyclines de type D sont au nombre de trois et sont les premières à apparaître lors de stimuli par des mitogènes. Elles sont synthétisées tout au long de la stimulation tant que le facteur de croissance reste dans le milieu. Si bien que les taux des cyclines D varient peu au cours du cycle, avec néanmoins un pic d'expression en G₁/S. Inversement, dès que le mitogène est retiré du milieu, les cyclines D sont rapidement détruites, quelle que soit la position de la cellule dans le cycle (SHERR, 1995) : si la cellule a dépassé le point R, leur destruction est sans effet, si la cellule est en G₁, la destruction des cyclines D empêche la cellule d'aller plus loin dans le cycle. Leur synthèse débute en début de G₁ et leur activité sur les kinases ne se fait qu'en milieu de G₁ et augmente au fur et à mesure que les cellules approchent de la transition G₁/S (MATSUSHIME *et al.*, 1994). Les partenaires catalytiques majeurs des cyclines D sont CDK4 et CDK6 (MEYERSON *et al.*, 1994). La fonction primaire des cyclines D est de stimuler la progression en phase G₁. En dépit de leur similitude, les membres de la famille des cyclines D sont différemment exprimés selon la lignée cellulaire (AJCHENBAUM *et al.*, 1993).

La progression dans la phase G₁ peut être soit stimulée par des mitogènes ou facteurs de croissance soit bloquée par des cytokines antiprolifératives. Pour permettre l'entrée de la cellule dans le cycle cellulaire depuis la phase G₀, un mitogène doit stimuler l'expression des cyclines D. Ces cyclines vont s'assembler, toujours sous stimulation mitogénique, avec des kinases dépendantes des cyclines D (CDK4 et CDK6), pour former un holoenzyme cataboliquement actif dès le milieu de la phase G₁ avec un maximum atteint lors de la transition de G₁/S (SHERR, 1996). Bien que l'activité du complexe

n'influence le cycle que pendant le point critique de la phase G1, elle persiste tout au long du premier cycle et des cycles suivants si la stimulation mitogénique continue. Par contre, en l'absence de stimulation mitogénique, l'activité enzymatique chute rapidement à cause de la nature particulièrement labile des Cyclines D et les cellules en phase G1 sortent rapidement du cycle (HALL et PETERS, 1996).

I.1 La Cycline D1

CycD1, protéine de 36 kDa et possédant 295 acides aminés, est constituée de différents domaines : un motif de liaison à RB1, une boîte cycline (cyclin-box) pour la liaison avec CDK4/6, un motif LxxLL qui est important pour le recrutement de cofacteurs nécessaires à l'activation de la transcription. Ce motif LxxLL est assez semblable au domaine riche en leucine retrouvé dans la famille des récepteurs nucléaires (dont font partie les RE) et permet également la liaison de co-activateurs (ZWIJSEN *et al.*, 1998). La séquence PEST impliquée dans les mécanismes de dégradation de CycD1, contrôle également un résidu thréonine (T286) qui contrôle à son tour l'export nucléaire et la stabilité de la protéine (KNUDSEN *et al.*, 2006) (Figure 7). La CycD1 a été découverte chez l'Homme en essayant d'identifier l'oncogène Bcl-1 localisé dans le chromosome humain 11q13. Cet oncogène appelé également PRAD1 est suggéré être une cycline (MOTOKURA *et al.*, 2005). La CycD1 s'associe et active les CDK4 et CDK6 (DONNELLAN *et al.*, 1998) (Figure 8).

La protéine fonctionne comme un régulateur du cycle cellulaire dépendant des CDK en phosphorylant et en inactivant la protéine du rétinoblastome (pRb), permettant ainsi la progression à travers la phase G1/S du cycle cellulaire (LUKAS *et al.*, 1994). La CycD1 est également impliquée dans le cycle cellulaire ou dans des fonctions indépendantes des CDK, notamment l'association avec divers facteurs de transcription et co-régulateurs transcriptionnels ainsi que la régulation des dits facteurs et co-régulateurs. Il a également été montré que CycD1 est impliquée dans la régulation du métabolisme cellulaire, la différenciation des cellules graisseuses et la migration cellulaire (FU *et al.*, 2004). La surexpression de CycD1 est associée à une tumorigénèse et peut jouer un rôle important dans le développement d'un grand nombre de tumeurs avec un chromosome anormal. Une amplification et/ou une surexpression de CycD1 ont été mises en évidence dans diverses tumeurs humaines, y compris les lymphomes du manteau, les carcinomes mammaires, les carcinomes spinocellulaires de la tête et du cou et les cancers de l'œsophage (REIS-FILHO *et al.*, 2006).

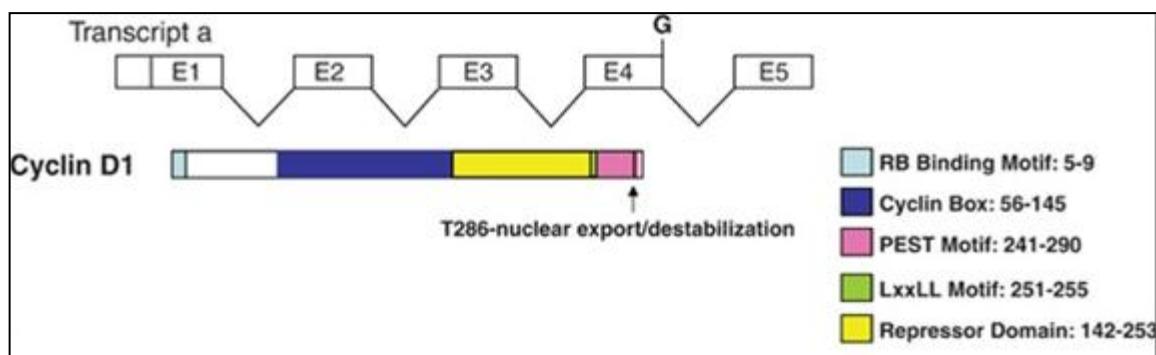


Figure 7 : Structure de CycD1 et localisation des domaines prédominants (KNUDSEN *et al.*, 2006).

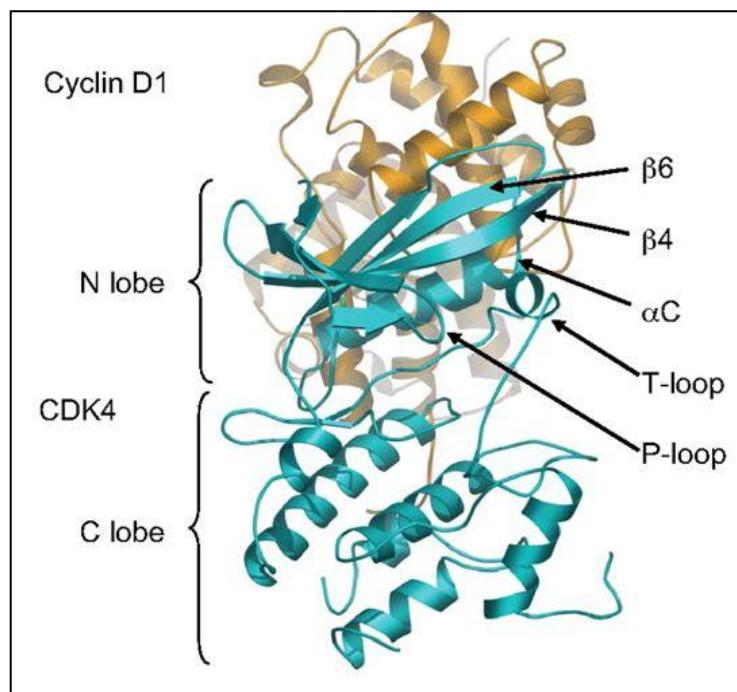


Figure 8 : Schémas en ruban de l'hétérodimère CycD1/CDK4 (DAY *et al.*, 2009).

I.1 Cyclines D2 et D3

La Cycline D2 est codée par un gène situé sur le chromosome 12p13 (INABA, 1992). Ce gène a été identifié comme le site d'intégration d'un provirus murin responsable d'une leucémie T chez la souris et qui entraîne une surexpression de la Cycline D2 (HANNA *et al.*, 1993). Elle s'exprime tardivement en phase G1 du cycle cellulaire (LUKAS *et al.*, 1995, LESLI *et al.*, 2006). La Cycline D2 est amplifiée et surexprimée dans certaines proliférations malignes telles que les hémopathies lymphoïdes

chroniques B (DELMER *et al.*, 1995), dans les lymphocytes B transformés par l'EBV (SINCLAIR *et al.*, 2004), dans certaines lignées cellulaires de carcinomes colorectaux (LEACH *et al.*, 1993) et elle semblerait aussi impliquée dans le cancer gastrique (TAKANO *et al.*, 2000). Elle joue un rôle crucial dans la prolifération des cellules de type B murin (GLASSFORD *et al.*, 2001 ; MOHAMEDALI *et al.*, 2003). En effet, la surexpression de la Cycline D2 et de CDK4 est reliée à la progression du cancer et corrèle étroitement avec un mauvais pronostique (TAKANO *et al.*, 2000).

La Cycline D3 est codée par un gène situé sur le chromosome 6p21 (HANNA *et al.*, 1993). Ce gène n'a pas été identifié comme un proto-oncogène bien qu'il soit réarrangé dans de multiples désordres lymphoprolifératifs (SINCLAIR *et al.*, 2004). Elle s'exprime en phase S du cycle cellulaire (LUKAS *et al.*, 1995, LESLI *et al.*, 2006). La Cycline D3 est surexprimée dans plusieurs lignées cellulaires de type gliomes (DONNELLIAN et CHETTY, 1998). Elle aurait un rôle dans la transformation cellulaire vers un phénotype malin plutôt que dans l'initiation et la progression de la tumeur (ZHANG *et al.*, 2005). Elle est requise et essentielle pour le développement des cellules précurseurs des cellules B (pre-B cell) (COOPER *et al.*, 2006).

1.2 CycD1 et œstrogène

Les effets mitogènes d'œstradiol (E2) sont obtenus par médiation d'au moins deux gènes cibles, *c-myc* et CycD1 (ALTUCCI *et al.*, 1996 ; SAID *et al.*, 1997 ; TONG et POLLARD, 1999) travaillant indépendamment (PRALL *et al.*, 1998). Parmi les deux gènes régulateurs, le gène *myc* est activé plus tôt par E2 que CycD1 dans la phase G1 (PRALL et SARCEVIC, 1997).

E2 régule l'activation de la transcription du *c-myc* et CycD1, qui inhibe à son tour le CDKI p21 de s'associer à la Cycline E qui se trouve donc libre. Les complexes CycD1/CDK4 et Cycline E/CDK2 seront par conséquent activés et phosphorylent le pRB libérant le facteur de transcription E2F nécessaires pour la synthèse d'ADN et la progression G1/S du cycle cellulaire (DOISNEAU-SIXOU *et al.*, 2003 ; POMMIER et KOHN, 2003) (Figure 9). Pendant que E2 incite *myc* via le RE, par médiation de signaux en se liant à l'élément de réponse présent dans la région du promoteur de *myc* (DUBIK et SHIU, 1992), le gène de CycD1 (CCND1) ne contient pas un élément de réponse dans son promoteur (SABBAH *et al.*, 1999 ; FOSTER *et al.*, 2001) et l'activation de sa transcription est probablement obtenue par des interactions entre la protéine et l'élément de réponse de APMc situé près du site de début de transcription. Cependant, le rôle de la voie des RE a aussi été suggéré dans la croissance des tumeurs œstrogéno-dépendantes (FELTY *et al.*, 2005).

L'expression précoce de CycD1 est régulée par les espèces réactives de l'oxygène (ROS) (JANSSEN *et al.*, 1997 ; GALLI *et al.*, 2003), les derniers travaux suggèrent qu'E2 incite les ROS mitochondriaux en activant la progression G1/S des cellules cancéreuses mammaires via l'activation du facteur de transcription AP-1, que l'on connaît pour être impliqué dans la transcription de CycD1.

L'obstruction de la fonction mitochondriale interrompe E2 d'induire la progression du cycle cellulaire, accompagnée par la diminution de l'expression des Cyclines D et E (FELTY *et al.*, 2005).

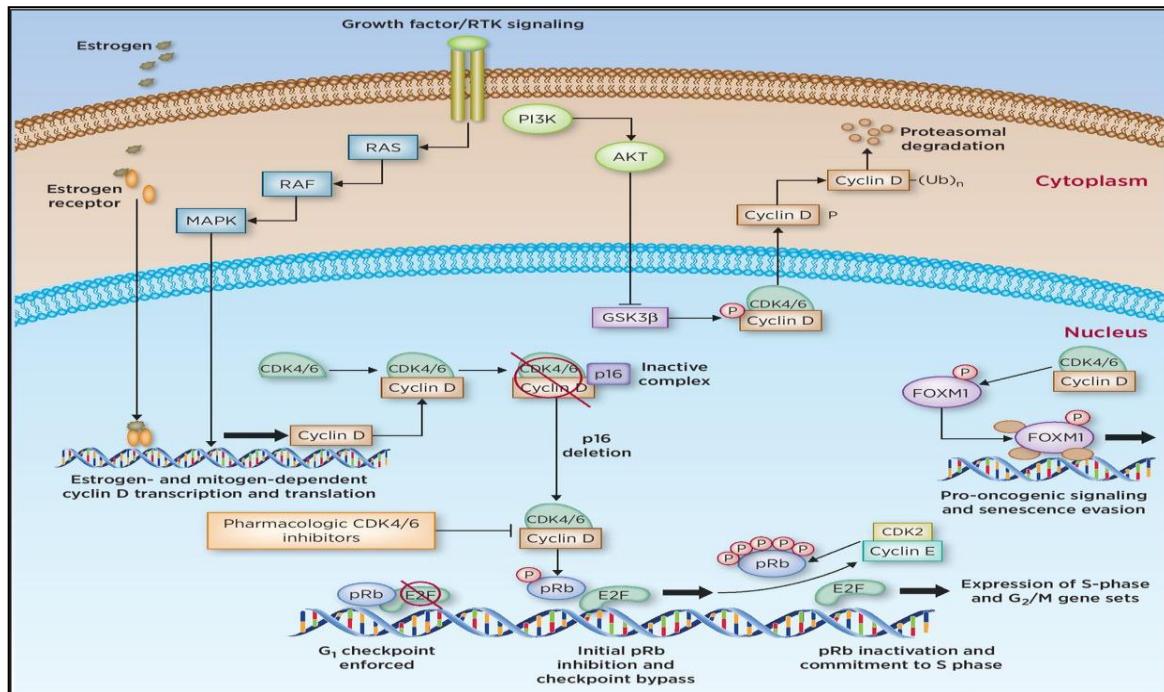


Figure 9 : Mécanismes d'action d'œstrogène dans la régulation du cycle cellulaire (VANARSDALE *et al.*, 2015).

I.1 CycD1 et cancer

La CycD1 a été la première cycline D à être identifiée dans les macrophages de souris (REN *et al.*, 2002). Elle a également été identifiée comme le produit du gène PRAD1 dans les adénomes humains parathyroïdiens (MOTOKURA *et al.*, 1991). Plusieurs groupes ont étudié le rôle de CycD1 comme un oncogène humain connu d'être amplifié dans des tumeurs spécifiques. Le Tableau II résume certaines dérégulations dans les différents cancers (MUSGROVE *et al.*, 2011). La CycD1 est surexprimée dans beaucoup de cancers soit par amplification de son gène soit par translocations ciblant le locus de D1 sur le chromosome 11q13 (HALL et PETERS, 1996). L'exemple le plus marquant est l'expression ectopique de CycD1 dans les lymphomes B notamment les lymphomes du manteau folliculaire (SETO *et al.*, 1992). Cette expression anormale est le plus souvent la conséquence de la juxtaposition du gène de CycD1 aux régions régulatrices des chaînes lourdes des immunoglobulines par une translocation t (11;14) (q13;q32) qui déplace l'*enhancer* du gène codant pour la chaîne lourde des immunoglobulines dans le locus D1, laissant le codage de CycD1 ininterrompu.

La CycD1 est jugée responsable d'engager directement les facteurs de transcription ou les co-activateurs, incluant les Histones Acétyle Transférases (HATs) de réguler la transcription et les modifications épigénétiques qui jouent un rôle important dans le métabolisme des cancers humains (FU *et al.*, 2004). La CycD1 est aussi associée à d'autres oncogènes tels que *neu* et *ras* qui agissent sur le promoteur du CCND1 régulant son expression dans des modèles de tumeurs mammaires de souris. Cependant, les transformations malignes sont exclusivement dépendante de CycD1, ce qui mène à conclure que CycD1 connecte la voie *neu-ras* à la machinerie cellulaire (YU *et al.*, 2003).

Tableau II : Implication de CycD1 dans les cancers humains (MUSGROVE *et al.*, 2011).

Siège de la tumeur	Mécanisme de dérégulation	Fréquence (%)
Tête et cou	Amplification du CCND1	26-39
	Surexpression de la Cycline D	20-68
Poumon	Amplification du CCND1	5-30
	Surexpression de la Cycline D	18-76
Endomètre	Amplification du CCND1	26
	Surexpression de la Cycline D	40-56
Peau	Amplification du CCND1	0-25
	Surexpression de la Cycline D	30-65
Pancréas	Amplification du CCND1	25
	Surexpression de la Cycline D	42-82
Sein	Amplification du CCND1	15-20
	Surexpression de la Cycline D	50-70
Rectum	Amplification du CCND1	2,5
	Surexpression de la Cycline D	55

La fonction de CycD1 dans les cellules cancéreuses n'est pas limitée à la phosphorylation du Rb. Elle joue aussi un rôle dans la réparation de l'ADN par liaison au RAD51 et au BRCA2 qui sont des recombinases qui pilotent la réparation des cassures double brin par recombinaison homologue (JIRAWATNOTAI *et al.*, 2011). La réduction des taux de CycD1 dans les cellules cancéreuses humaines empêche la réparation de l'ADN induite par la recombinaison homologue et conduit à l'augmentation de la sensibilité des cellules aux radiations à la fois *in vivo* et *in vitro*. Cet effet a été observé dans des cellules cancéreuses Rb-négatives. Cette découverte révèle une fonction inattendue, d'une protéine clé du cycle cellulaire, dans la réparation de l'ADN et suggère que le ciblage de CycD1 pourrait également être bénéfique dans les cancers Rb-négatifs dont on pense qu'ils ne sont pas affectés par l'inhibition de CycD1 (JIRAWATNOTAI *et al.*, 2011). L'association de CycD1 comme médiateur de la réparation de l'ADN endommagé est au premier vu d'œil contradictoire à son association aux cancers, puisque la réparation de l'ADN empêche les mismatches durant la réPLICATION de l'ADN. L'augmentation de la fréquence des erreurs dans les gènes cibles est souvent associée à la carcinogenèse

(MASUDA *et al.*, 2011). D'une autre part, la réparation de l'ADN assure aux cellules cancéreuses une survie plus longue et une résistante à la thérapie génotoxique (PONTANO *et al.*, 2008 ; KUNTZ et O'CONNEL, 2011 ; YAN *et al.*, 2012).

Les dommages d'ADN activent GSK3B connue surtout pour sa phosphorylation de CycD1 au résidu thréonine T286, faisant de lui un exportateur nucléaire et médiateur de dégradation (DIEHL *et al.*, 2002 ; PANTANO et DIEHL, 2009). GSK3B à son tour, est inactivé par AKt pour permettre la continuation du cycle cellulaire après réparation des dommages de l'ADN (Figure 10). Il est à noter que la phosphorylation du T286 est exclusive de CycD1, ce qui appuie l'idée du rôle unique dans le cycle cellulaire en arrêtant les radiations qui induisent les dommages de l'ADN. La dégradation de CycD1 est réalisée à travers le site de destruction box par la ligase E3 ubiquitine, complexe promoteur de l'anaphase (Figure 11). Ce dernier est constitutivement associé au complexe CycD1/CDK4, cette destruction mène à libérer le p21 et à inhiber le CDK2 d'arrêter la phase G1 jusqu'à ce que les dommages de l'ADN seront résolu (AGAMI et BERNARDS, 2000). La dégradation de CycD1 joue un rôle important dans l'arrêt du cycle cellulaire suite à des dommages de l'ADN dans les réseaux complexes des interconnections moléculaires (MORI *et al.*, 2005).

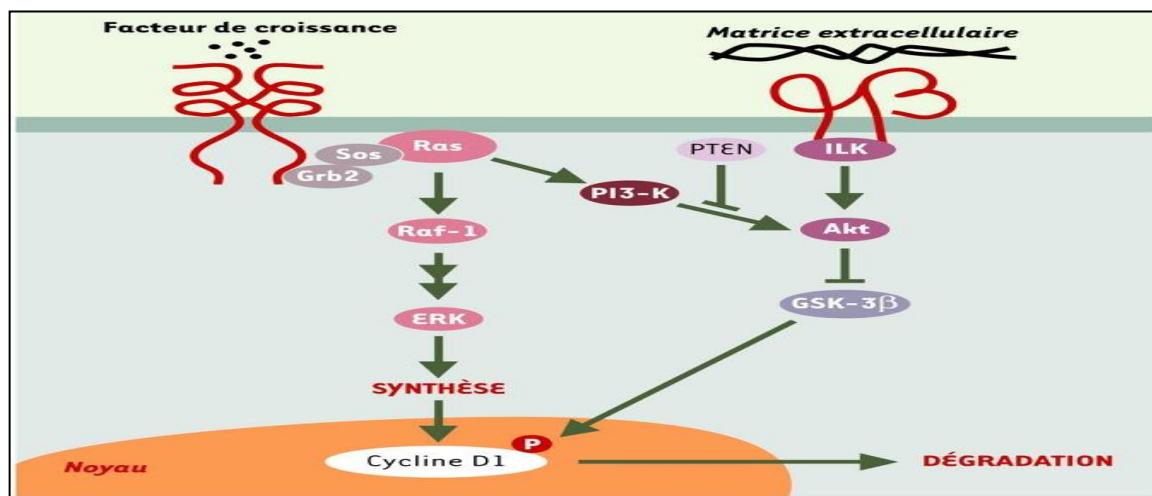


Figure 10 : Production de Cycline D1 et sa dégradation sous le contrôle de stimuli externes (BLANCHARD, 2003).

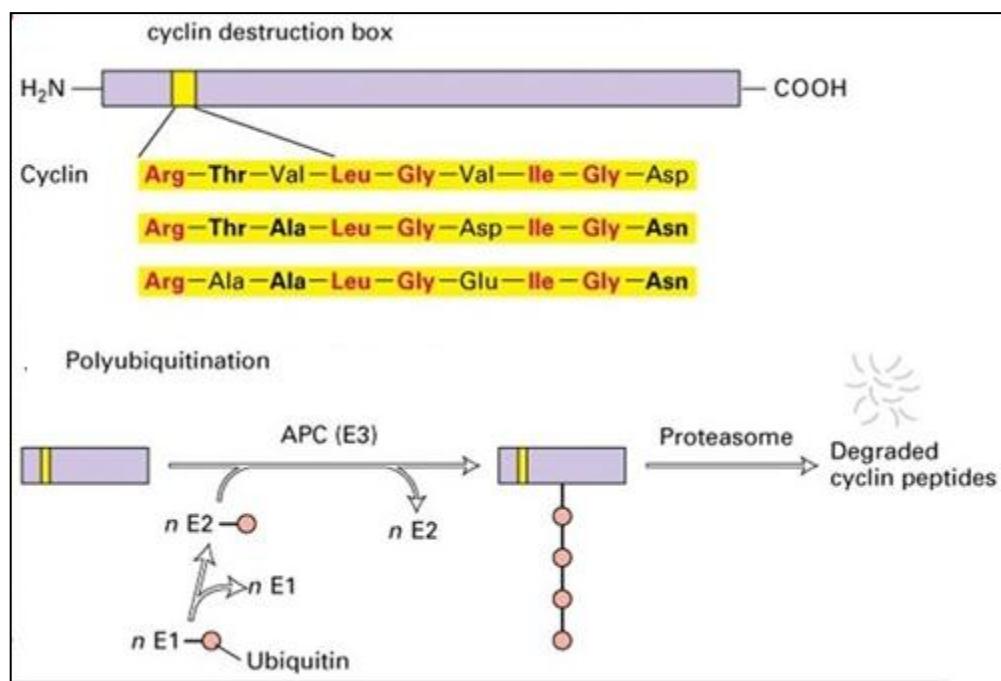


Figure 11 : Dégradation des cyclines à travers le site de destruction box par le complexe promoteur de l'anaphase (CPA) (HIROYUKI *et al.*, 2004).

Les molécules NF-kB, STAT3 et E2F1 qui interviennent dans la réponse au dommage de l'ADN interagissent avec CycD1 donnant un potentiel additionnel de régulation (BARRE *et al.*, 2010). L'activité transcriptionnelle STAT3 est inhibée par CycD1 (BIENVENU *et al.*, 2010), mais d'un autre côté, elle est responsable de l'induction de l'expression du CCND1 suite aux signaux mitogènes (VIGNERON *et al.*, 2008). NF-kB induit la transcription du CCND1 mais il est à son tour rétro-régulé par CycD1 (RUBIO *et al.*, 2012). Finalement, CycD1 est connue pour relier la région du promoteur de E2F1 qui doit réguler la transcription des gènes (CASIMIRO *et al.*, 2013), et d'un autre côté, E2F1 est connu pour son rôle inhibiteur de l'activité du promoteur du CCND1 (WATANABE et ROBBINS, 1998).

II. Cycline E

La Cycline E est une protéine nucléaire de 50 kD dont l'expression est maximale en fin de phase G1, après l'augmentation des cyclines D (KOFF, 1991 ; DULIC *et al.*, 1992). Le complexe Cycline E/CDK2 a une forte activité kinase juste avant l'entrée des cellules en phase S et phosphoryle la protéine Rb (HATAKEYAMA *et al.*, 1994). La surexpression de la Cycline E raccourcit la durée de la phase G1, diminue la taille de la cellule et sa dépendance aux facteurs de croissance et prolonge la durée de la phase S (OHTSUBO *et al.*, 1995). Des cellules bloquées en phase G1 initient quand même la réplication de leur ADN quand la Cycline E est surexprimée (RESNITZKY *et al.*, 1994). Des anticorps dirigés contre la Cycline E injectés dans des cellules en phase G1 inhibent l'entrée en phase S. Cette

inhibition n'a pas lieu si l'injection se fait dans des cellules en phase S ce qui signifie que la Cycline E est indispensable à la transition G1/S. Au cours de la phase S, l'expression de la Cycline E diminue car elle est dégradée par le protéasome. Cette dégradation est aussi dépendante d'ubiquitylation et semble cruciale pour le bon déroulement de la réplication car son expression constitutive provoque une instabilité génomique. La Cycline E est surexprimée dans de nombreuses lignées cancéreuses indiquant que sa dégradation ordonnée doit être strictement contrôlée (DULIC, 2012).

III. Les cyclines mitotiques :

Les cyclines mitotiques comprennent la Cycline A et la Cycline B. Elles possèdent une séquence d'acides aminés partiellement conservée (dénommée *destruction box*) située en partie N-terminale, indispensable à leur destruction rapide et soudaine spécifiquement pendant la mitose (GLOTZER *et al.*, 1993). Cette destruction se fait par la voie de la protéolyse dépendante de l'ubiquitine (SUDAKIN *et al.*, 1995). Le taux des cyclines mitotiques augmente progressivement au cours des phases S et G2 pour atteindre un pic à la phase M. Les Cyclines A et B interagissent avec la kinase CDK1 pour déclencher la mitose et leur dégradation est nécessaire pour que la cellule sorte de la mitose. Cependant, la synthèse et la destruction de la Cycline A ont toujours lieu en avance par rapport à la Cycline B (ROY *et al.*, 1991).

III.1 La Cycline A

La Cycline A est une protéine de 60 kD qui apparaît à la transition G1/S. C'est la première cycline qui a été clonée et séquencée (BARTEK *et al.*, 2001). Elle est située en position nucléaire (PINES *et al.*, 2004). Elle a d'abord été considérée comme une cycline mitotique jouant un rôle qu'à la transition G2/M.

Cependant, plusieurs expériences ont permis de démontrer que la Cycline A agissait plus précocement dans le cycle cellulaire, étant détectée et activée dès la fin de la phase G1 juste avant l'entrée en phase S (YU *et al.*, 2001). L'activité kinase associée à la Cycline A à la transition G1/S est celle de CDK2 (ELLEDGE, 1996). La surexpression de la Cycline A entraîne une entrée prématuée en phase S (ROSENBERG, 1995). Les Cyclines E et A sont nécessaires au passage en phase S mais ont des fonctions différentes ; la Cycline A serait utile pour débuter la réplication de l'ADN. Le complexe Cycline A/CDK2 se lie au facteur de transcription PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*) au niveau de certains sites de réplication de l'ADN et l'inhibition de la Cycline A par des anticorps inhibe la synthèse de l'ADN dans des cellules humaines (BORGNE *et al.*, 1999).

III.2 Les cyclines B

Il existe trois Cyclines B : B1, B2, B3. La Cycline B1 est la mieux connue et joue un rôle important dans les mécanismes de déclenchement de la mitose. La Cycline B1 est cytoplasmique pendant l'interphase (en association avec les microtubules et les centrosomes) jusqu'à la fin de la prophase où

elle est transférée brutalement dans le noyau (PINES et HUNTER, 1994 ; HAGTING *et al.*, 1999). Elle s'accumule dans le cytoplasme car l'import nucléaire est contrebalancé par l'export nucléaire qui est plus rapide. En effet, pendant l'interphase, Le complexe Cycline B1/CDK1 est maintenu dans le cytoplasme grâce à l'activité d'un facteur nucléaire d'exportation appelé CRM1 (Maintenance de la Région Chromosomal) ou exportine qui reconnaît le CRS (Signal de Rétention Cytoplasmique) en position N-terminale de la Cycline B1 (NILSSON et HOFFMANN, 2000). Le CRS possède une région hydrophobe de 11 acides aminés hautement conservée parmi les Cyclines de type B chez les mammifères. Dans cette région, il existe quatre résidus sérine lesquels, s'ils sont phosphorylés, empêchent la reconnaissance du CRS par CRM1. En conséquence, c'est la phosphorylation de ces quatre résidus sérine qui stoppe la sortie de la Cycline B1 du noyau en prophase. Dès que la Cycline B1 devient nucléaire, l'enveloppe nucléaire explose, signifiant que le complexe Cycline B1/CDK1 agit comme une kinase des lamines nucléaires. La Cycline B1 se lie alors à l'appareil mitotique, en particulier aux pôles du fuseau et à ses fibres principales. En début de métaphase, la Cycline B1 s'associe transitoirement aux chromosomes condensés. Dès l'entrée en anaphase, la destruction de la Cycline B1 est initiée par le cyclosome, elle s'opère par la voie de la polyubiquitination ce qui est indispensable à l'inactivation du complexe Cycline B1/CDK1 et à la sortie de la mitose (GLOTZER *et al.*, 1993 ; KING, 1995).

IV. Les Cyclines virales

Les virus du groupe herpès dérèglent le cycle cellulaire. Ainsi, l'EBV (*Epstein-Barr Virus*) immortalise les lymphocytes B en exprimant deux protéines, EBNA1 et EBNA2 qui permettent une surexpression de la Cycline D2 (TAKEUCHI *et al.*, 1995). Le génome de l'herpès virus 8 (HHV8) agent du sarcome de Kaposi, associé également à la maladie de Castleman et à certains lymphomes survenant notamment chez les sujets infectés par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH), contient plusieurs gènes qui partagent de grandes similitudes avec des gènes impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire et de l'apoptose (RUSSO *et al.*, 1996). Un de ces gènes qui code pour une protéine homologue aux cyclines de mammifères est dénommé cycline K (CHANG *et al.*, 1996).

Deux autres cyclines virales ont été également identifiées : la Cycline V et Cycline M qui sont codées par des herpès virus contaminant des animaux (SWANTON *et al.*, 1999). Ces cyclines ont une homologie de séquence étroite avec les cyclines D. Par ailleurs, les Cyclines K et V forment préférentiellement des complexes avec la kinase CDK6. Les cyclines virales ressemblent donc aux cyclines D tant par leur fonction que par leur séquence. Leur expression entraîne des dérèglements du cycle cellulaire donnant un avantage prolifératif aux cellules infectées (GODDEN-KENT *et al.*, 1997).

V. Les Kinases Dépendantes des Cyclines (CDK)

Les CDK sont une famille de protéines kinases qui jouent un rôle majeur dans la régulation du cycle cellulaire. Elles sont également impliquées dans la régulation de la transcription, le traitement des ARN messagers et la différenciation des cellules nerveuses. Elles sont relativement petites avec des poids moléculaires variant entre 34 et 40 KDa. Une CDK peut s'associer à différentes cyclines. Sans sa cycline cible, la protéine CDK a très peu d'activité kinase : c'est l'association de la CDK et de la cycline qui confère son activité au complexe. Les protéines CDK phosphorylent leurs substrats sur les séries et les thréonines, ce qui leur donne le nom de sérine-thréonine kinases (MORGAN, 2007). Chez l'homme 11, CDKs (CDK1 à CDK11) ont été caractérisées et au moins 29 gènes codant pour des protéines apparentées à la famille des cyclines par la présence d'une séquence conservée de 150 acides-aminés : «la Cycline box» (MURRAY et MARKS, 2001).

CDK1 (p34 ou cdc2) de poids moléculaire de 34KDa, est la première CDK décrite chez l'Homme. Son gène est localisé sur le chromosome 10q21.2 et contient 5 exons. Elle est absente des cellules quiescentes. Dans les cellules en prolifération, elle peut être détectée tout au long du cycle mitotique, mais son ARN messager (ARNm) varie au cours du cycle, avec un minimum en phase G1 (FISHER et MORGAN, 1994). A la fin de la phase S, CDK1 s'associe avec la Cycline A et assure la progression tout au long de la phase G2, puis la cycline A est dégradée alors que la Cycline B est activement synthétisée. CDK1 s'associe alors avec la cycline B constituant le complexe CDK1/Cycline B ou MPF (M-phase Promoting Factor) et conduit à la progression des cellules en mitose (NIGG, 2001).

CDK2 a une masse moléculaire de 33 KDa. Son gène est localisé sur le chromosome 12 en 12q13 (SENDEROWICZ et SAUSVILLE, 2000). Elle acquiert une activité kinase en association avec la Cycline A ou E. Le complexe CDK2/Cycline A développe une activité kinase en phase G1 tardive jusqu'à la métaphase. L'activité kinase du complexe CDK2/Cycline E se manifeste aussi dès la phase G1, atteint son maximum en début de phase S, puis disparaît (SENDEROWICZ et SAUSVILLE, 2000). CDK2, en association avec la Cycline E est indispensable à la mise en route de la réplication de l'ADN (TSAY *et al.*, 1993). Durant la phase S, le complexe CDK2/Cycline E est remplacée par CDK2/Cycline A (LEES *et al.*, 2002).

CDK3 a une masse moléculaire de 35 KDa. Son gène est localisé sur le chromosome 17q25.1 et contient 8 exons. CDK3 peut, elle aussi, phosphoryler et inhiber la protéine Rb. Il semblerait aussi que le complexe CDK3/Cycline C permette aux cellules de sortir de l'état de quiescence G0 et assure le retour des cellules à l'état prolifératif lors de la transition G0/G1 (REN et ROLLINS, 2004). Par ailleurs, CDK3 associée aux Cyclines A et E est peut-être aussi impliquée dans la transition G1/S (JINPING *et al.*, 2016).

À la différence de la plupart des CDK connues, CDK4 n'a pas d'activité kinase sur les histones H1. Son gène est localisé sur le chromosome 12q13, dans la même région que CDK2. Ses partenaires régulateurs sont les cyclines D. Le complexe CycD1/CDK4 devient actif comme kinase au milieu de la phase G1, avec une activité maximale à la transition G1/S et reste détectable jusqu'à la mitose (SENDEROWICZ et SAUSVILLE, 2000). Les souris dont le gène CDK4 est invalide (souris *knock-out*) sont viables, mais sont de petites tailles et stériles. Ces souris développent un diabète en raison d'un déficit en cellules pancréatiques. CDK4 pourrait être un régulateur spécifique de certains types de cellules (RANE *et al.*, 1999).

CDK5 est une protéine de 33 KDa. Elle a été détectée active à des taux élevés dans les neurones où elle aurait un rôle dans la phosphorylation de protéines comme celles des neurofilaments et joue un rôle essentiel dans le métabolisme cérébral. CDK5 est particulière car elle n'est pas activée par une cycline et possède des activateurs qui lui sont propres (SMITH et TSAI, 2002). La dérégulation de CDK5 est impliquée dans plusieurs maladies neurodégénératives et en particulier, la maladie d'Alzheimer (CRUZ et TSAI, 2004 ; KESAVAPANY *et al.*, 2004).

CDK6 est une protéine de 40 KDa formant des complexes avec toutes les cyclines D. Elle phosphoryle et inhibe la protéine Rb qui libère alors le facteur de transcription E2F et permet la transcription des gènes nécessaires à la transition G1/S. Après la stimulation des lymphocytes T par la PHA, cette activité se manifeste dès le milieu de la phase G1 (MALUMBRES et BARBACID, 2005).

CDK7 phosphoryle CDK1, CDK2 et CDK4 respectivement sur les résidus thréonine (Thr) 161, 160 et 172, ce qui conditionne leur activation comme kinase des histones. Elle se lie à la cycline H et subit une phosphorylation sur la Thr 170 pour acquérir l'activité kinase (homologie avec les Thr 161 de CDK1, 160 de CDK2 et 172 de CDK4 toutes faisant l'objet de phosphorylations activatrices). Le complexe Cycline H/CDK7 est dénommé CAK (CAK : CDK activating kinase). Ni l'expression de la protéine CDK7, ni son activité enzymatique ne varient au cours du cycle mitotique des cellules proliférantes, ce qui suggèrerait un mécanisme particulier gouvernant son action sur les autres CDK (DARBON *et al.*, 1994). Le complexe Cycline H/CDK7 est différent car il joue un rôle à la fois dans la transcription et dans le contrôle du cycle cellulaire (HARPER et ELLEDGE, 1998). Les CDKs 7, 8, 9, 10 et 11 ne sont pas impliquées dans la progression proprement dite du cycle cellulaire. Elles sont impliquées dans le contrôle de la transcription avec néanmoins pour certaines d'entre-elles un rôle direct dans le contrôle du cycle cellulaire (LOYER *et al.*, 2005). Les CDKs jouent un rôle dans le contrôle du cycle cellulaire (CDK1, CDK2, CDK3, CDK4, CDK6 et CDK7), dans l'apoptose (CDK1, CDK2, CDK5), dans la différenciation (CDK2, CDK5, CDK9), dans le fonctionnement du système nerveux central (CDK5) et dans la transcription (CDK7, CDK8, CDK9) (SMITH et TSAI, 2002) (Figure 12).

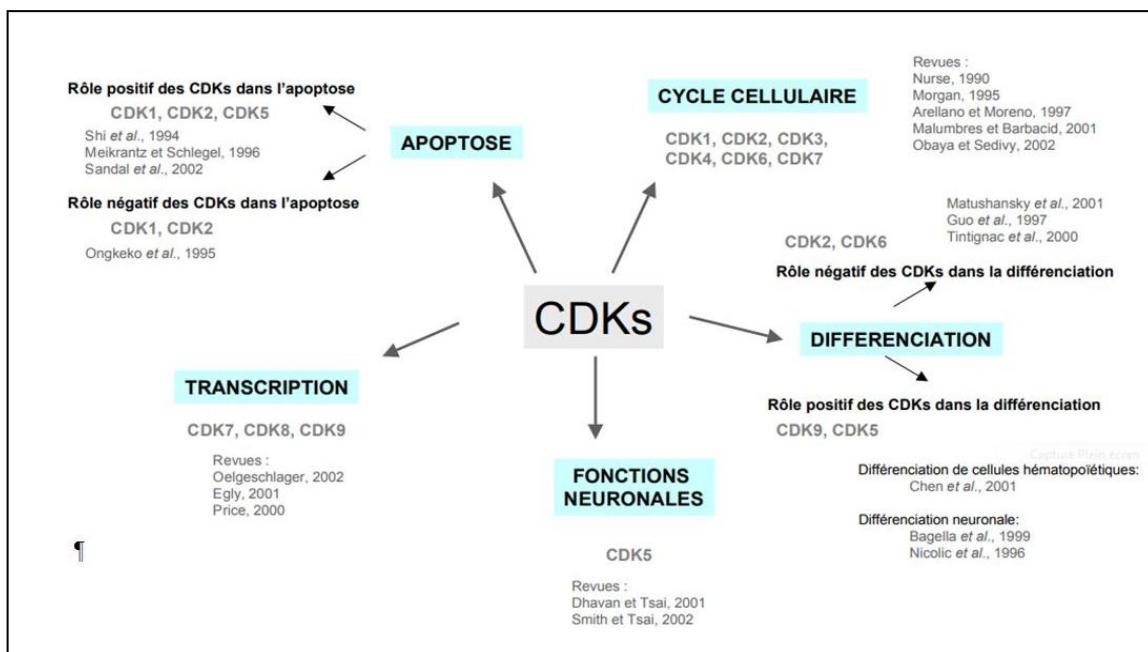


Figure 12 : Les CDKs et les réponses cellulaires (LOYER *et al.*, 2005).

MATERIEL ET METHODES

Rapport Gratuit.Com

I. Matériel biologique

Notre étude a porté sur 138 patientes atteintes d'un carcinome canalaire infiltrant (CCI) du sein. Les patientes recrutées entre 2011 et 2015 au niveau de l'hôpital militaire régional universitaire d'Oran (HMRUO) ont été répertoriées. Les tumeurs ont été classées selon le score du Bloom-Richardson (BLOOM et RICHARDSON, 1957) modifié par Elston et Ellis (ELSTON et ELLIS, 1991). La taille a été classée selon la classification TNM proposée par le chirurgien français Denoix et valable jusqu'à 2017 (DENOIX, 1946). Les caractéristiques cliniques et histopathologiques des patientes ont été extraites des dossiers médicaux et un consentement éclairé a été signé par toutes les patientes.

II. Méthodes

II.1 Préparation des échantillons

Les blocs de paraffine utilisés pour l'étude ont été préparés selon les techniques standards utilisées dans les laboratoires d'anatomopathologie à savoir : fixation au formol 1/10^{ème}, déshydratation dans des bains d'acétone, et enfin enrobage des échantillons dans de la paraffine.

II.2 Échantillonnage

Un bloc par patiente a été étudié. Pour chaque bloc, 6 lames ont été effectuées, 5 lames pour réaliser le marquage immunohistochimique (IHC) des RE, RP, de la p53, du Ki-67 et de CycD1. La 6^{ème} lame a été utilisée pour mesurer l'amplification du gène CCND1 par l'hybridation chromogénique *in situ* (CISH). Soit un total de 828 lames préparées. (La protéine Rb n'a pas été étudiée, pour manque de produit).

II.3 Reconnaissance des antigènes : principe et méthodologie

L'examen immunohistochimique consiste à révéler sur coupe histologique, par réaction antigène-anticorps, la présence de récepteurs antigéniques cellulaires intranucléaires, membranaires ou cytoplasmiques. La détection du marquage a été réalisée par la technique d'immunopéroxydase indirecte: l'anticorps primaire non couplé n'est pas spontanément visible quand il est fixé à l'échantillon. Pour être détectable, l'anticorps est associé à la peroxydase qui a comme substrat l'eau oxygénée (H_2O_2) laquelle oxyde une molécule de colorant du milieu d'incubation donnant un précipité brun pour le 3-3' di-aminobenzidine tetrahydrochloride (DAB). La caractéristique du système biotine avidine peroxydase du kit Dako utilisé est la haute affinité de l'avidine (protéine glycosylée PM=68000) pour la biotine (vitamine soluble PM=244) et l'utilisation des complexes préformés (Figure 13).

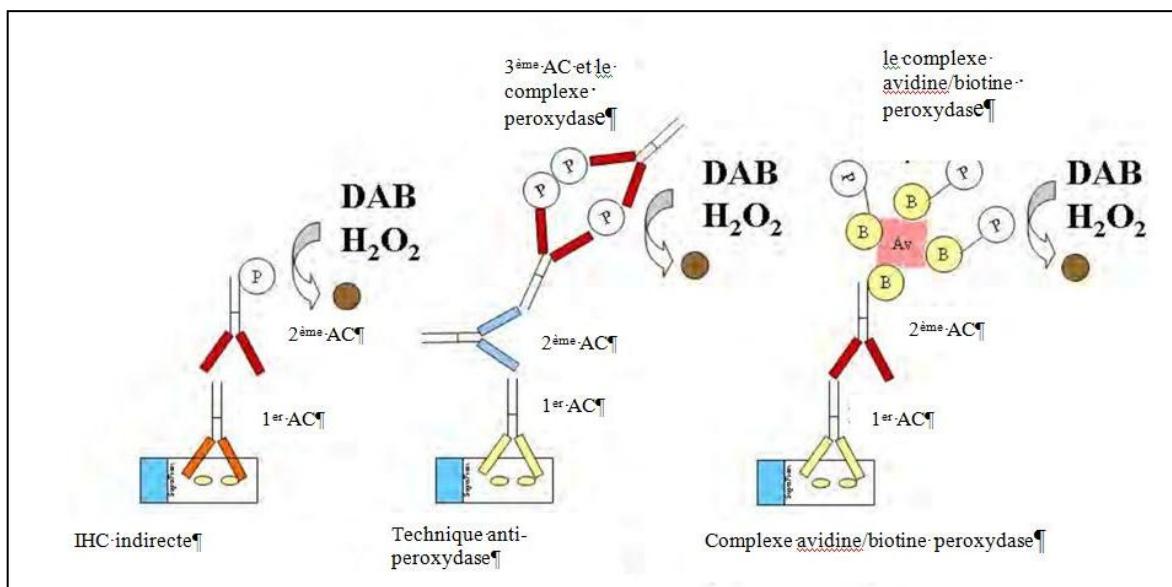


Figure 13 : Schéma de la technique d'immunopéroxydase indirecte et le complexe avidine/biotine-peroxydase (GARCIA-AYALA et CHAVES-POZO, 2012).

Les techniques classiques utilisées au centre Pierre et Marie Curie (CPMC) d'Alger ont été utilisées pour préparer les lames à l'IHC. Les blocs de paraffine sont coupés à l'aide d'un microtome semi-automatique (Leica Biosystems RM 2245). Les coupes histologiques de 2 µm d'épaisseur sont étalées sur des lames silanisées (Superfrost). Après déparaffinage dans des bains de xylène suivi d'une réhydratation dans des bains d'alcool décroissants, les lames sont rincées dans de l'eau distillée. Les lames sont ensuite immergées dans une solution de 3% de H_2O_2 pendant 10 mn. Le démasquage du site antigénique se fait par chauffage au micro-onde à 650W. Les lames sont incubées dans une solution de citrate de sodium (10mM pH6) pendant deux fois 5 mn afin d'éviter le décollement de l'échantillon. Après refroidissement (20 à 30 mn), les lames sont rincées dans de l'eau distillée.

L'immunomarquage des différents anticorps a été réalisé selon les instructions fournies avec les kits. Les anticorps primaires prédilués CycD1 (monoclonal de lapin, clone EP12, Dako), Ki-67 (Mib-1, monoclonal de souris, Dako), RE (ER α monoclonal de lapin, clone SP1, Dako), P53 (DO7, Dako) et RP (PR monoclonal de souris, clone 16, Dako) sont déposés directement sur l'échantillon. Un deuxième anticorps est appliqué, susceptible de se fixer à l'anticorps primaire et complexé au système Avidine-biotine-péroxydase permettant la révélation. La réaction est révélée par le DAB (K3468, Dako) qui, oxydée en présence d' H_2O_2 , forme un précipité brun. Pour recolorer les échantillons et rendre possible la détermination topographique du marquage, une contre-coloration douce avec l'hématoxyline de Mayer a été réalisée pendant 5 mn. Après trois rinçages dans de l'eau distillée, de l'eau ammoniaquée

et ensuite dans de l'eau distillée, les lames sont montées dans le glycérol (Mounting Medium Glycerol Dako).

II.3.1 Quantification du marquage

L'intensité de marquage a été quantifiée selon la méthode d'Allred (ALLRED *et al.*, 1998). Elle est considérée négative (0) quand aucun noyau n'est coloré à fort grossissement ; faible (1) quand la coloration des noyaux est visible seulement à fort grossissement ; modérée (2) quand les noyaux colorés sont facilement visibles à faible grossissement ou bien fort (3) quand la coloration des noyaux est hautement positive, même à faible grossissement.

Selon la coloration des noyaux tumoraux, le chiffre zéro (0) est donné dans le cas où aucun noyau n'est coloré ; (1) si la proportion des noyaux colorée est inférieur à 1% ; (2) si la proportion des noyaux colorés, est comprise entre 1 et 10% ; (3) quand la proportion des noyaux colorés est comprise entre 11 et 33% ; (4) quand elle est comprise entre 34 et 66% et (5) quand la fréquence des noyaux colorés fluctue entre 67 et 100%. La proportion des noyaux colorés et les scores d'intensité ont été ensuite associés pour obtenir un score final (total des scores), qui varie de 0 à 8. Les tumeurs ont été classées en 3 groupes: négatif/faible quand le score total se situe entre 0 et 2 ; modéré si ce score est entre 3 et 5 et fort quand il est de 6 à 8 (HARVEY *et al.*, 1999 ; REIS-FILHO *et al.*, 2006).

II.4 L'hybridation chromogénique *in situ* (CISH)

La CISH a été utilisée pour détecter les amplifications de gènes, les translocations de chromosomes et le nombre de chromosomes en utilisant des réactions catalysées par peroxydase sous le microscope à fond clair sur des tissus fixés dans du formol et incorporés dans de la paraffine. La CISH a été réalisée en utilisant la sonde d'amplification Cycline D1 SPoT-Light® marquée à la digoxigénine (Invitrogen™ Zymed, 84-1900).

Le caractère essentiel de la CISH est la capacité des sondes à acide nucléique marquées de s'hybrider (se lier), *in situ*, à des sections spécifiques supplémentaires d'acide nucléique dans l'échantillon. Les résultats d'hybridation avec sonde sont bien visibles sous un microscope à fond clair standard pourvu d'une lentille sèche 40x. Comme le signal DAB est permanent, les résultats peuvent être conservés à long terme. Le principal avantage de la CISH est le fait de pouvoir détecter les aberrations génétiques et vérifier l'histopathologie en même temps.

Le schéma technique est représenté sur la (Figure 14) dont le principe général repose sur l'hybridation d'une séquence d'ADN spécifique (une sonde complémentaire) avec le gène des cellules tumorales (le segment d'ADN à identifier). Son originalité tient au mode de révélation qui met en jeu un chromogène, comme en immunohistochimie. Pour la CISH, la sonde est marquée soit à la digoxygénine (DIG) repérée ensuite par un anticorps antidigoxigénine couplé à un système

d'amplification ou à la biotine, identifiée quant à elle par la streptavidine couplée, elle aussi, à un système d'amplification. La peroxydase du raifort (HRP: HorseRadish Peroxidase) est le système d'amplification le plus utilisé, il permet de détecter une faible quantité d'une protéine particulière et de produire un signal facilement détectable. Sa vitesse de réaction très élevée permet en outre de produire des signaux forts en peu de temps. L'hybridation se déroule en 2 étapes : l'hybridation proprement dite et les lavages. Les lavages permettent d'éliminer les molécules de sonde faiblement fixées sur l'échantillon en fonction de la température et de la force ionique du milieu de lavage. Pour cela, une solution 4xSSC (Standard Saline Citrate) est utilisée. La révélation des hybrides est effectuée par le chromogène DAB.

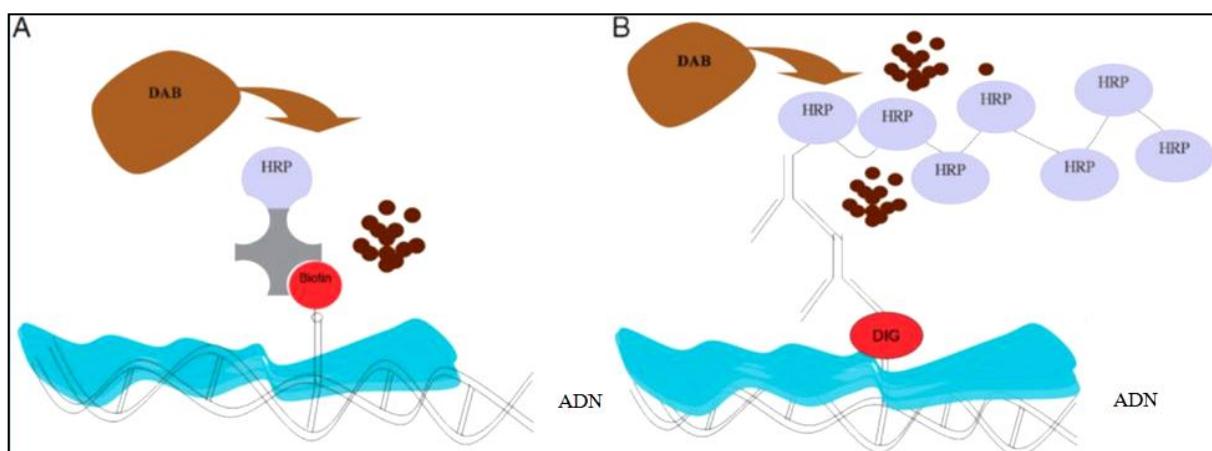


Figure 14 : Principe de l'hybridation chromogénique *in situ* (HAMARD *et al.*, 2018).

Les tumeurs présentant une amplification du gène CCND1 apparaissent sous forme de grands groupes de gènes intranucléaires positifs à la peroxydase, de nombreux petits signaux individuels positifs à la peroxydase ou d'un mélange de groupes et de copies de gènes individuels. Les tumeurs à faible amplification de CCND1 présentent entre 6 et 12 copies de gènes par noyau. Les tumeurs dont l'état du gène CCND1 est normal manifestent 1 à 2 points par noyau, alors que les tumeurs ayant une polysomie du chromosome manifestent entre 3 et 5 copies de gène par noyau (MRHALOVA *et al.*, 2002).

II.4.1 Réalisation de la technique

II.4.1.1 Préparation de l'échantillon

Les coupes histologiques de 4 à 5 µm d'épaisseur réalisées à l'aide d'un microtome semi-automatique, ont été étalées sur des lames Superfrost/Plus® (LABOMDERNE, ML1149). Les lames sont ensuite séchées à 37°C puis cuites entre 2 et 4 heures à 60°C dans un four.

Préparation des réactifs

Le PBS (Soluté de tampon phosphate) est préparé en mélangeant un paquet de poudre de PBS (80 gr) avec 1 litre d'eau distillée. Pour préparer le tampon PBS/tween 20 (0,025%), 1 part de tween 20 à 50% est mélangée à 1999 parts de PBS préalablement préparé. La solution de substrat-chromogène (DAB) doit être préparée extemporanément. Une série d'alcools est préparée : éthanol 70%, 85%, 95% et 100%. Pour préparer le substrat de la peroxydase, une part de l'eau oxygénée, H₂O₂ à 3% est diluée dans 9 parts de méthanol absolu. La solution tampon 2xSSC est préparée en mélangeant 1 part de solution tampon 20x SSC à 9 parts de l'eau distillée.

II.4.1.2 Protocole CISH

Hormis la sonde (Cycline D1 SPoT-Light® 84-1900) qui peut être utilisée à froid, tous les réactifs doivent être amenés à température ambiante (20 à 25°C) avant d'être utilisés.

Prétraitement des sections de tissu :

Les lames sont déparaffinées en les submergeant dans des bains de xylène 2 fois 5 mn chacun, et dans de l'éthanol (100%) 3 fois 3 mn. Les lames (échantillons) sont chauffées à plus de 98°C pendant 15 mn dans une solution de prétraitement des tissus à la chaleur (SPoT-Light® 00-8402). Elles sont ensuite lavées dans des bains d'eau distillée à température ambiante (20 à 25°C) 3 fois 2 mn chacun. Une digestion enzymatique de 10 mn est ensuite réalisée. Après cette étape, les lames sont lavées 3 fois dans de l'eau distillée 2 mn chacun puis déshydratées dans une série de bains d'éthanol à concentration croissante (70%, 80%, 95%, 100%) 2 mn chacun, puis séchées à l'air.

Dénaturation et hybridation :

Dans le centre de chaque lame, 15 µl de sonde est ajoutée et ensuite recouverte d'une lamelle. La sonde est dénaturée en incubant les lames à une température entre 94 et 95°C pendant 5 mn. Les lames sont laissées dans une chambre d'humidification réglée à 37 °C pendant plus de 10 heures.

Lavage :

Après hybridation, les lames sont rincées brièvement dans une solution de SSC à température ambiante, ensuite submergées pendant 5 mn dans le SSC à 75°C et enfin lavées dans de l'eau distillée (3 fois, 2 mn).

Procédure d'immunodétection :

Les lames sont submergées dans du H₂O₂ à 3% pendant 10 mn, puis lavées dans des bains de PBS/Tween 20 (0,025%) 3 fois pendant 2 mn. 2 à 3 gouttes de l'anticorps anti-digoxygénine de souris ont été ajoutées à chaque lame. Après un deuxième lavage des lames dans du PBS/Tween 20 (0,025%),

2 à 3 gouttes de l'anticorps HRP anti-souris polymérisé sont ajoutées. Les lames sont lavées une 3^{ème} fois dans du PBS/Tween 20 (0,025%) avant de les incubées dans la solution de substrat-chromogène DAB (2 à 3 gouttes) pendant 30 mn. Enfin un dernier lavage sous l'eau de robinet est effectué.

Coloration de contraste :

Les lames sont contre-colorées à l'hématoxyline de Mayer pendant 6 secondes à 60 secondes, ensuite lavées sous l'eau du robinet. Après une déshydratation dans une série de bains d'éthanol à concentration croissante (70%, 85%, 95%, 100%) pendant 2 mn dans chaque bain d'éthanol, les lames sont submergées dans 2 bains de xylène pendant 2 mn chacun. Enfin, les lames sont recouvertes d'une lamelle couvre-objet en utilisant la solution de fixation HistomountTM (Dako).

II.4.2 Évaluation des signaux

Les points (signaux) doivent être petits mais aisément discernables à l'aide d'un objectif x40 d'un microscope à fond clair. Les points apparaissent sous différentes formes : (MRHALOVA *et al.*, 2002).

- Point unique : possédant un pourtour arrondi qui représente une seule copie du gène.
- Un doublet : résultant de la division des chromosomes, les points apparaissent comme des paires et ne constituent pas de vrais petits agrégats. Si les deux points sont situés à une distance inférieure au diamètre d'un signal (point), ils doivent être comptabilisés comme point unique.
- Un petit agrégat : c'est un groupe de signaux de forme irrégulière avec un diamètre de 3 à 5 fois plus grand que celui d'un point unique.
- Un agrégat important : est considéré comme un groupe de signaux de forme irrégulière avec un diamètre 5 fois plus grand que celui d'un point unique.

II.4.3 Évaluation de l'état du gène CCND1

Les cellules apparaissent sous différentes formes selon l'état du gène : (MRHALOVA *et al.*, 2002).

Cellules normales (diploïdes) : Normalement les cellules diploïdes ont deux gènes CCND1. Des copies supplémentaires (3 à 5 copies) peuvent être observées, à cause d'une polysomie du chromosome.

Cellules aneuploïdes : Les cellules aneuploïdes présentent soit plus soit moins de deux signaux de CCND1.

Cellules amplifiées : Les cellules ayant un gène CCND1 amplifié peuvent avoir plus de 6 copies du gène. Des niveaux intermédiaires d'amplification, soit entre 3 et 5 copies de CCND1, peuvent provenir d'une polypliodisation cellulaire plutôt que d'une amplification ciblée de CCND1. La présence d'un ou de plusieurs amplicons est clairement l'indication d'une amplification du gène (Tableau III).

Tableau III : Évaluation de l'état du gène CCND1 par la méthode CISH (MRHALOVA *et al.*, 2002).

Degrés d'amplification	Conséquences
Aucune	1 à 5 copies du gène CCND1 présentes par noyau dans 50% des cellules cancéreuses, dues à une polysomie du chromosome.
Faible	6 à 10 copies du gène CCND1 présentes par noyau, dans 50% des cellules cancéreuses, ou présence d'un petit agrégat
Forte	Plus de 10 copies du gène CCND1 présentes par noyau dans 50% des cellules cancéreuses, ou présence d'un agrégat important.

II.5 Analyse statistique

L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du logiciel IBM SPSS Advanced Statistics 20.0. Le coefficient de corrélation de Pearson (r) a été utilisé pour évaluer la corrélation entre CycD1 et les autres paramètres. La valeur $P \leq 0,05$ a été considérée comme seuil de signification.

RESULTATS

Dans cette étude, 138 tumeurs présentant des CCI mammaires ont été traitées pour démontrer d'une part, l'association entre CycD1 et les paramètres clinicopathologiques, (la taille de la tumeur, le grade SBR et l'invasion lymphatique) et les paramètres biologiques (les récepteurs hormonaux RE et RP, le marqueur de prolifération Ki-67 et la p53). D'une autre part, nous avons évalué l'amplification du gène CCND1 par hybridation chromogénique *in situ* (CISH) et démontré son association avec les différents paramètres clinicopathologiques, les paramètres biologiques et sa protéine CycD1.

I. Résultats descriptifs

Les données clinicopathologiques présentées sur le (Tableau IV) montrent que les 138 patientes recrutées dans cette étude étaient âgées de 30 à 88 ans dont 39,2% ont été âgées de moins de 50 ans. Seulement 8% des tumeurs sont de taille T1 (< de 2 cm), 73,2% sont classées T2 (2-5 cm) et 18,8% dépassent la taille de 5 cm sur le plus grand axe et classées en T3 et T4. Les résultats relatifs au grade SBR montrent que la majorité des patientes (63,1%) sont de grade II suivi du grade III (35,5%). Le grade I termine le podium avec seulement (1,4%) cas. 60,9% des patientes présentent une invasion lymphatique. Le marquage des RE montre que 79,7% des tumeurs sont RE+. 68,8% des tumeurs présentaient une positivité des RP. Quant au marquage du Ki-67 et de p53, les tumeurs expriment une positivité estimée à 66,7% et 58,7% respectivement. La surexpression de CycD1 est observée chez 78 (56,5%) patientes. Mais le gène CCND1 est amplifié dans seulement 17 (12,3%) cas.

Tableau IV: Caractéristiques clinicopathologiques des patientes recrutées.

Caractéristiques		Nombre (%) de patientes
Age des patientes (ans)	<50	54 (39,2)
	≥50	84 (60,8)
Taille de la tumeur (cm)	T1<2	11 (8)
	2≤T2<5	101 (73,2)
	T3 et T4 ≥5	26 (18,8)
Grade SBR	I	2 (1,4)
	II	87 (63,1)
	III	49 (35,5)
Invasion lymphatique	Négative	54 (39,1)
	Positive	84 (60,9)
Statut des RE	Négatif	28 (20,3)
	Positif	110 (79,7)
Statut des RP	Négatif	43 (31,2)
	Positif	95 (68,8)
Statut du marqueur Ki-67	Négatif	46 (33,3)
	Positif	92 (66,7)
Statut de la p53	Négatif	56 (40,6)
	Positif	82 (59,4)
Statut de CycD1	Négatif	60 (43,5)
	Positif	78 (56,5)
Statut du gène CCND1	Non Amplifié (<5 signaux)	121 (87,7)
	Amplifié (>5 signaux)	17 (12,3)

II. Résultats qualitatifs

II.1 Expression des marqueurs détectés par immunohistochimie

Toutes les lames histologiques des 138 patientes incluses dans cette étude présentaient un CCI du sein. La visualisation du marquage a montré des noyaux colorés présentant une expression nucléaire de CycD1 (Figure 15), des RE (Figure 16), des RP (Figure 17), du Ki-67 (Figure 18) et de p53 (Figure 19).

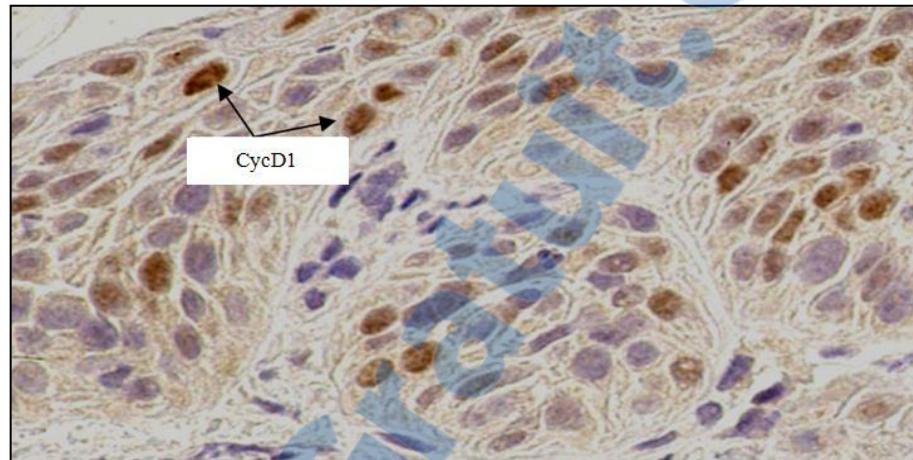


Figure 15 : Marquage nucléaire de CycD1 associé à la coloration à l'hématoxyline de Mayer (Gx40) (patiente 2).

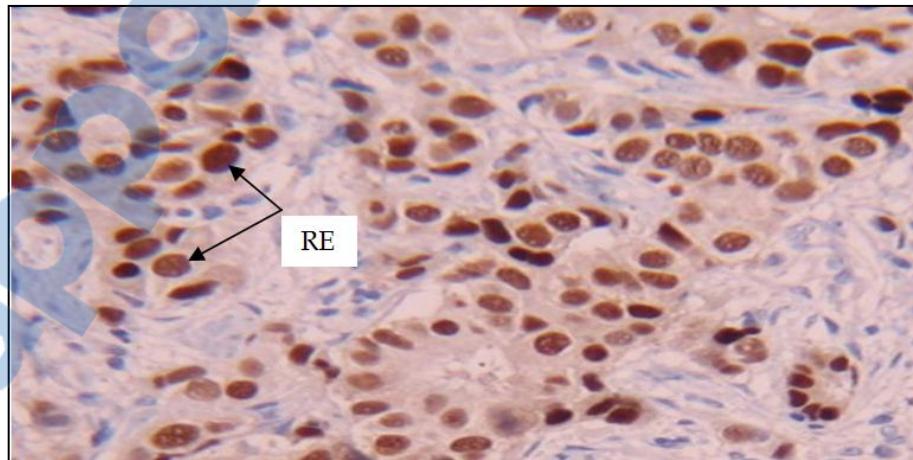


Figure 16 : Marquage nucléaire des RE associé à la coloration à l'hématoxyline de Mayer (Gx40) (patiente 56).

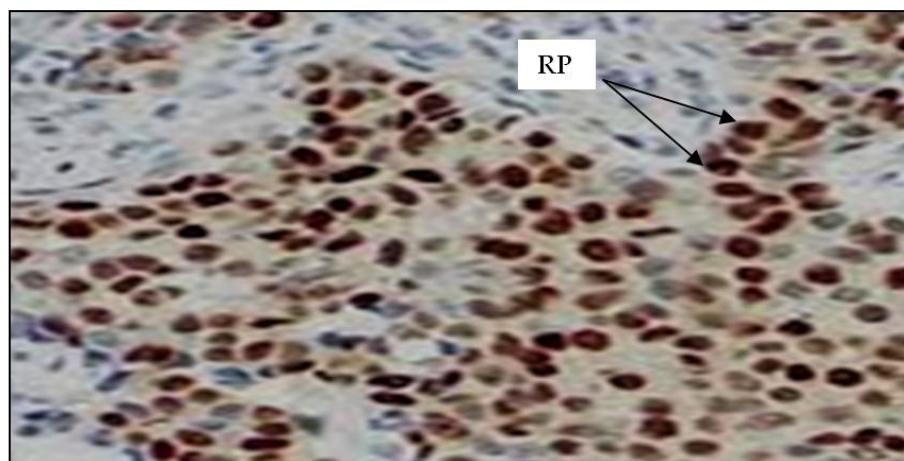


Figure 17 : Marquage nucléaire des RP associé à la coloration à l'hématoxyline de Mayer (Gx40) (patiente 9).

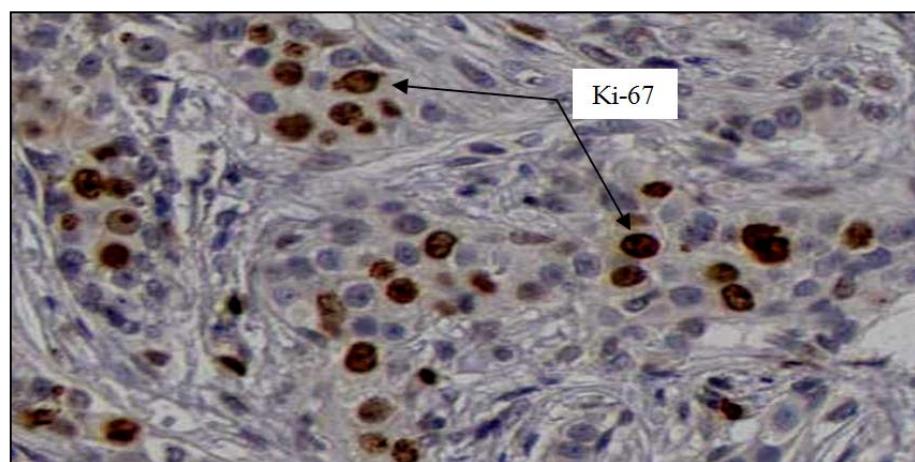


Figure 18 : Marquage nucléaire du Ki-67 associé à la coloration à l'hématoxyline de Mayer (Gx40) (patiente 86).

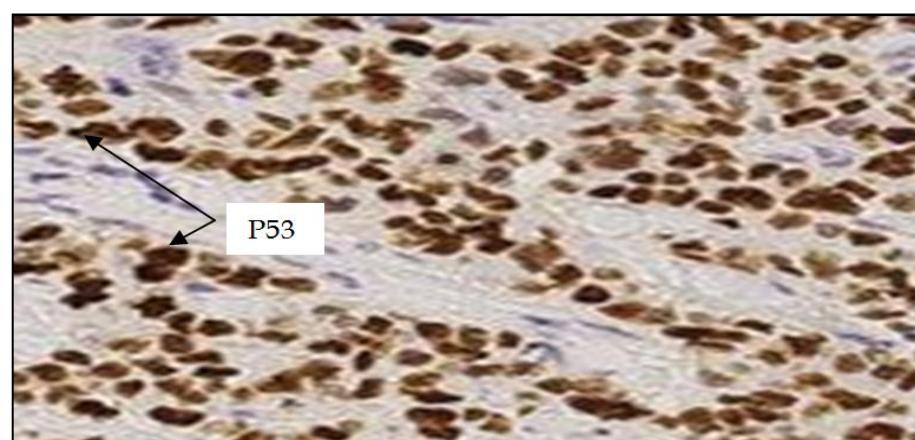


Figure 19 : Marquage nucléaire de p53 associé à la coloration à l'hématoxyline de Mayer (Gx40) (patiente 96).

II.2 Amplification du gène CCND1 détectée par CISH

Sur les 138 prélèvements, 17 (12,3%) tumeurs seulement présentent une amplification du gène CCND1 avec plus de 5 copies du gène exprimées (Figure 20).

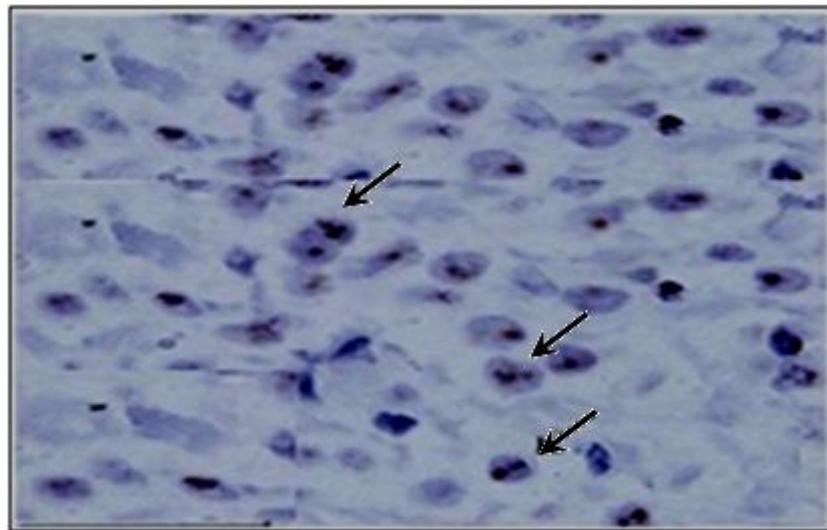


Figure 20 : Amplification du gène CCND1 détectée par hybridation chromogénique *in situ* associée à la coloration à l'hématoxyline de Mayer (Gx40) (patiente 19). Les flèches montrent les sites nucléaires des cellules exprimant le gène CCND1.

III. Résultats quantitatifs

III.1 Expression des marqueurs

A partir des données imbriquées en fonction des RE, les paramètres biologiques mesurés sont dépendants de chaque contexte. Dans la fraction des RE+, une logique est plus ou moins respectée avec une corrélation significative ($P=0,043$). Tous les paramètres ont tendance à être majoritaires (RP+ : 81,8% ; Ki-67 : 68,9% ; p53 : 59,7% ; CycD1 : 67,6%) sauf pour le gène CCND1 où l'effet contraire est observé avec 28% de cas. Cette logique relative au profile des paramètres biologiques n'est pas respectée dans le groupe des patientes RE- où seuls, RP et CycD1 non exprimés sont majoritaires avec des fréquences respectives estimées à 82,1% et 60% et aucune amplification du gène CCND1 n'est détectée (Figure 21).

La quantification immunohistochimique a révélé des fluctuations d'expressions des marqueurs selon le score attribué à l'intensité du signal observé sur les lames. Les résultats présentés sur le Tableau V montrent que presque la moitié des tumeurs (43,5%) ont une intensité de marquage négative/faible

pour CycD1, alors que seulement 37 tumeurs (26,8%) sont fortement marquées. Le marquage des RE montre une faible expression pour 28 tumeurs (20,3%). Une expression modérée est observée dans 39 tumeurs (28,3%), alors que la moitié des tumeurs (51,4%) sont fortement marquées. Une expression négative/faible des RP est observée dans 43 tumeurs (31,2%), 41 tumeurs (29,7%) ont une expression modérée et 54 (39,1%) tumeurs l'expriment fortement. Le marquage du Ki-67 montre que le tiers des tumeurs (33,3%) sont faiblement marquées, 68 tumeurs soit 49,3% ont une intensité de marquage modérée et seulement 24 tumeurs (17,4%) présentent une intensité de marquage forte. Et enfin, 56 tumeurs (40,6%) expriment un faible marquage de p53. Presque le même nombre de cellules tumorales (42%) ont un marquage modéré et uniquement 24 tumeurs (17,4%) présentent une forte intensité de marquage.

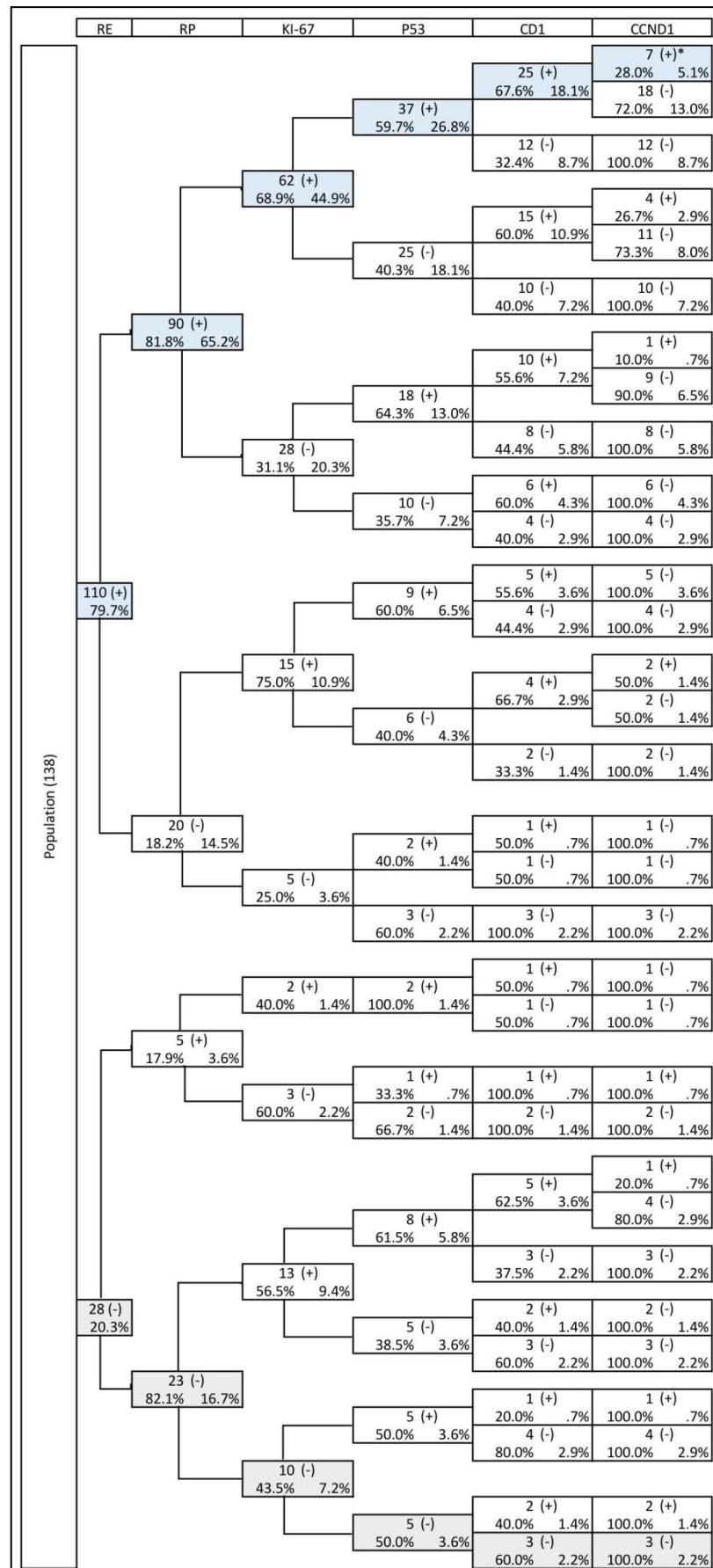


Figure 21 : Profil des marqueurs selon l'expression des RE.

Tableau V: Expression de CycD1, des RE, des RP, du Ki-67, et de la p53 selon l'intensité de marquage.

Intensité de marquage	Nombre et fréquence d'expression (%)				
	CycD1	RE	RP	Ki-67	p53
Négatif/Faible : score 0-2	60 (43,5)	28 (20,3)	43 (31,2)	46 (33,3)	56 (40,6)
Modérée : score 3-5	41 (29,7)	39 (28,3)	41 (29,7)	68 (49,3)	58 (42)
Fort : score 6-8	37 (26,8)	71 (51,4)	54 (39,1)	24 (17,4)	24 (17,4)

III.2 Amplification du gène CCND1

La CISH a révélé que beaucoup de tumeurs (87,7%) ne présente pas une amplification du gène CCND1, et seulement 17 (12,3%) cas ont une amplification du gène avec plus de 5 copies exprimées.

IV. Relation CycD1-paramètres clinicopathologiques

Les résultats des caractéristiques clinicopathologiques des tumeurs en relation avec l'expression de CycD1 sont montrés dans le Tableau VI.

En relation avec l'âge des patientes, CycD1 est surexprimée (score modéré + score fort) dans 78 (56,5%) cas répartis inégalement sur les deux tranches d'âge. Chez les patientes âgées de moins de 50 ans, CycD1 est surexprimée dans 25 (18,1%) cas répartis selon les scores 15 (10,9%) des cas présentent un score modéré, alors qu'un score fort est observé dans 10 (7,2%) cas. Chez les patientes âgées de plus de 50 ans, CycD1 est surexprimée dans 53 (38,4%) cas dont 27 (19,6%) cas avec un haut degré d'expression.

Les résultats ont également montré que les tumeurs de grade SBR I n'expriment CycD1 que dans 2 (1,4%) cas avec un score faible. Les tumeurs de grade II et III expriment CycD1 avec prédominance pour le grade II avec 51 (37%) cas dont 23 (16,7%) tumeurs présentent, CycD1 est fortement exprimée dans les 28 (20,3%) cas restants. les 27 (19,6%) tumeurs de grade III exprimant CycD1 sont réparties en 18 (13,1%) cas avec une expression modérée et 9 (6,5%) cas avec une forte expression mais sans corrélation significative ($r=-0,05$; $P=0,518$). Les résultats relatifs à l'invasion lymphatique montrent que les tumeurs exprimant faiblement ou négativement CycD1 sont de l'ordre de 36 (26,1%) cas versus 27 (19,6%) cas et 21 (15,2%) cas exprimant respectivement CycD1 modérément et fortement. Ce résultats montre une corrélation négative mais statistiquement non significative ($r=-0,01$; $P=0,833$).

Relativement à la taille de la tumeur, les résultats montrent que 55 (39,8%) des tumeurs qui surexpriment CycD1 ont une taille comprise entre 2 et 5 cm et 26 (18,8%) cas tous scores associés ont une taille supérieure à 5 cm. Les résultats relatifs aux RE montrent que 31 (22,5%) cas expriment CycD1 modérément et 35 (25,4%) cas l'expriment fortement. L'analyse statistique montre une bonne

corrélation entre les deux paramètres ($r=0,52$; $P<0,001$). Le même profil est retrouvé quant à la relation entre l'expression des RP et celle de CycD1 ($r=0,26$; $P=0,002$). Les RP sont surexprimés chez 58 (42%) cas répartis équitablement entre les 2 score modéré et fort avec une fréquence de 21% chacun. Les résultats montrent également que CycD1 est surexprimée dans les tumeurs RE- et RP- mais avec des fréquences faibles de l'ordre de 8,6% et 17,5% pour RE et RP respectivement.

L'évaluation de l'expression du marqueur de prolifération Ki-67 montre que 28 (20,3%) patientes présentent une surexpression modérée de CycD1. Une forte surexpression est observée chez 29 (21%) cas. Ce résultat témoigne d'une bonne corrélation entre le Ki-67 et CycD1 ($r=0,19$; $P=0,022$). Les résultats relatifs à l'expression de p53 montrent que 48 (34,7%) tumeurs réparties en 28 (20,3%) et 20 (14,5%) cas pour les scores modéré et fort respectivement, surexpriment également CycD1 mais sans corrélation significative ($r=-0,004$; $P=0,962$).

Tableau VI : Statut de CycD1 en relation avec les paramètres clinicopathologiques.

Paramètres		Tumeurs exprimant CycD1 (%)			r (P)
		Score faible/négatif	Score modéré	Score fort	
Age (ans)	<50	29 (21)	15 (10,9)	10 (7,2)	0,16 (0,060)
	≥50	31 (22,5)	26 (18,8)	27 (19,6)	
Grade SBR	I	2 (1,4)	0	0	-0,05 (0,518)
	II	36 (26,1)	23 (16,7)	28 (20,3)	
	III	22 (15,9)	18 (13,1)	9 (6,5)	
Invasion lymphatique	Négatifs	24 (17,4)	14 (10,1)	16 (11,6)	-0,01 (0,833)
	Positifs	36 (26,1)	27 (19,6)	21 (15,2)	
Taille de la tumeur (cm)	<2	5 (3,6)	5 (3,6)	1 (0,7)	0,11 (0,186)
	2-5	46 (33,3)	28 (20,3)	27 (19,6)	
	>5	9 (6,5)	8 (5,8)	9 (6,5)	
Statut des RE	Négatif	16 (11,6)	10 (7,2)	2 (1,4)	0,52 (<0,001)
	Positif	44 (31,9)	31 (22,5)	35 (25,4)	
Statut des RP	Négatif	23 (16,7)	12 (8,7)	8 (5,8)	0,26 (0,002)
	Positif	37 (26,8)	29 (21)	29 (21)	
Statut du Ki-67	Négatif	25 (18,1)	13 (9,4)	8 (5,8)	0,19 (0,022)
	Positif	35 (25,4)	28 (20,3)	29 (21)	
Statut de la p53	Négatif	27 (19,6)	13 (9,4)	17 (12,3)	-0,004 (0,962)
	Positif	33 (23,9)	28 (20,3)	20 (14,5)	

V. Relation gène CCND1-paramètres clinicopathologiques

Pour rappel, l'amplification du gène CCND1 est retrouvée chez seulement 17 (12,3%) patientes. Le taux d'expression des paramètres clinicopathologiques est calculé, une fois par rapport au nombre total de patientes et une autre fois par rapport au nombre de cas présentant une amplification du gène.

Les résultats présentés dans le Tableau VII montrent que 8 (5,8%) des patientes surexprimant CycD1 sont âgées de moins de 50 ans et 9 (6,5%) sont âgées de plus de 50 ans mais sans corrélation significative. ($r=-0,11$; $P=0,202$). En relation avec le grade SBR, la majorité des tumeurs 13 (76,5%) tumeurs exprimant une amplification du CCND1 sont de grade II. Aucune amplification n'est observée par contre, dans les tumeurs de grade I. Les résultats relatifs à la positivité des ganglions lymphatiques ont révélé que 7 (41,2%) tumeurs exprimant CycD1 sont négatives contre 10 (58,8%) tumeurs avec des ganglions positifs. Sans aucune corrélation significative observée ($r=-0,01$; $0,855$).

Aucune amplification du gène CCND1 n'a été trouvée dans les tumeurs de taille <2 cm. La majorité des cas (82,3%) qui présentent une amplification du gène CCND1 ont une taille de 2-5 cm et seulement 3 (17,7%) patientes ont des tumeurs dépassant 5 cm. Mais sans causalité observée ($r=0,05$; $P=0,559$).

Les résultats ont également montré que 14 (82,3%) tumeurs dont le gène CCND1 est amplifié, expriment les RE avec une corrélation significative ($r=0,28$; $P=0,003$). De même pour les RP, 13 (76,5%) tumeurs qui présentent une amplification du gène CCND1 surexpriment également les RP avec une corrélation significative ($r=0,22$; $P=0,030$). Pour le marqueur de prolifération Ki-67, 14 (82,3%) tumeurs avec amplification du gène CCND1, le surexpriment mais sans corrélation statistiquement significative ($r=0,15$; $P=0,080$). Concernant la p53, 11 (64,7%) tumeurs qui présentent une amplification du gène CCND1, sont aussi positives pour p53 mais sans montrer de corrélation notable entre les deux paramètres ($r=0,05$; $P=0,492$).

VI. Relation CycD1-gène CCND1

Les résultats de la corrélation entre l'expression de CycD1 et l'amplification de son gène CCND1 sont montrés dans le. Seulement 17 tumeurs (12,3%) révèlent une amplification du gène CCND1. Toutes les tumeurs avec une surexpression modérée ou forte de CycD1 montrent une amplification du gène CCND1. Et toutes les tumeurs exprimant négativement ou faiblement CycD1 ne présentent aucune amplification du gène (Tableau VIII). Parmi les 17 patientes dont la tumeur montre une amplification du gène CCND1, 13 (76,5%) tumeurs surexpriment fortement CycD1 et 4 (23,5%) tumeurs l'expriment modérément. Selon ce résultat l'amplification du gène CCND1 entraîne significativement une surexpression de CycD1 ($r=0,42$; $p<0,001$).

Tableau VII : Activité du gène CCND1 en fonction des paramètres clinicopathologiques.

Paramètres		CCND1 non amplifié	CCND1 amplifié			r (P)
			N	N(%) / total	N/X amplifié (%)	
Age (ans)	<50	46 (33,3%)	8	5,8	47	-0,11 (0,202)
	≥50	75 (54,4%)	9	6,5	53	
Grade SBR	I	2 (1,4%)	0	0	0	-0,07 (0,361)
	II	74 (53,6%)	13	9,4	76,5	
	III	45 (32,6%)	4	2,9	23,5	
Invasion lymphatique	Négative	47 (34,1%)	7	5,1	41,2	-0,01 (0,855)
	Positive	74 (53,6%)	10	7,2	58,8	
Taille de la tumeur (Cm)	<2	11 (8%)	0	0	0	0,05 (0,559)
	2-5	87 (63%)	14	10,1	82,3	
	>5	23 (16,7%)	3	2,2	17,7	
Statut des RE	Négatif	25 (18,1%)	3	2,2	17,7	0,28 (0,003)
	Positif	96 (69,6%)	14	10,1	82,3	
Statut des RP	Négatif	39 (28,3%)	4	2,9	23,5	0,22 (0,030)
	Positif	82 (59,5%)	13	9,4	76,5	
Statut du Ki-67	Négatif	43 (31,2%)	3	2,2	17,7	0,15 (0,080)
	Positif	78 (56,5%)	14	10,1	82,3	
Statut de la p53	Négatif	50 (36,2%)	6	4,3	35,3	0,05 (0,492)
	Positif	71 (51,5%)	11	8	64,7	

Tableau VIII : Relation entre l'expression de CycD1 et l'amplification du gène CCND1.

Expression de CycD1	Statut du gène CCND1				r (P)	
	<5 signaux (non amplifié)	≥5 signaux (amplifié)				
		N	N(%) / total	N/X amplifié (%)		
Négative/faible	60 (43,5%)	0	0	0	0,42 (<0,001)	
	37 (26,8%)	4	2,9	23,5		
	24 (17,4%)	13	19,4	76,5		

DISCUSSION

Dans cette étude réalisée sur des carcinomes canalaires infiltrants du sein, nous avons d'abord quantifié par la méthode d'ALRED, l'expression de CycD1. Dans un deuxième temps, nous avons traité le profil de l'expression de CycD1 par rapport au statut d'autres paramètres biologiques : les RE, les RP, le marqueur de prolifération Ki-67 et la p53. La technique d'immunohistochimie a été utilisée pour révéler la relation entre l'expression de CycD1 et d'autres paramètres clinicopathologiques : l'âge des patientes, le grade SBR, la taille de la tumeur et le statut des ganglions lymphatiques. D'une autre part, nous avons examiné le nombre de copies du gène CCND1 par hybridation chromogénique *in situ* (CISH) pour rechercher son amplification et la corréler avec la surexpression de sa protéine CycD1 et les autres paramètres biologiques et clinicopathologiques cités ci-dessus.

La CycD1, nécessaire au développement normal du sein, est l'un des régulateurs du cycle cellulaire les plus fréquemment altérés (MASSAGUE *et al.*, 2004). Elle est connue pour réguler l'expression des gènes dans des cellules en culture par le biais de plusieurs mécanismes différents (PESTELL *et al.*, 1999), soit indirectement par la phosphorylation de pRb et l'induction de l'expression génique dépendante de E2F (LEE *et al.*, 2000), soit directement par liaison aux gènes cibles (WANG *et al.*, 2005 ; FU *et al.*, 2005). La dérégulation de l'expression de CycD1 provoque l'aberration de la prolifération épithéliale mammaire conduisant au cancer du sein (ALLE *et al.*, 1998 ; BUTT *et al.*, 2005). Cependant, le mécanisme exact par lequel CycD1 exerce son effet néoplasique reste à définir clairement. En outre, il existe des données limitées et contradictoires sur la signification clinique de CycD1 dans les carcinomes invasifs du sein (SANTANU *et al.*, 2015).

Dans notre étude, la surexpression de CycD1 est retrouvée dans 78 (56,5%) tumeurs dont 37 (26,8%) tumeurs sont fortement marquées. Cette surexpression de CycD1 a été mentionnée dans plusieurs études (ELSHEIKH *et al.*, 2008 ; SANTANU *et al.*, 2015 ; LI *et al.*, 2016 ; AHLIN *et al.*, 2017) avec des fréquences estimées entre 43,6% et 70,9%. Des études antérieures ont montré que la surexpression de CycD1 est un biomarqueur prédictif potentiel à la résistance au traitement par le tamoxifène chez les patientes atteintes d'un cancer du sein, et qu'elle est associée à un mauvais pronostic dans le cancer du sein RE+ (AALTONEN *et al.*, 2009 ; KEILTY *et al.*, 2013).

La voie de signalisation des RE joue un rôle essentiel dans le développement et la progression du cancer sein. L'expression des RE est associée à la croissance des tumeurs du sein et son absence indique souvent des phénotypes plus agressifs (FERGUSON *et al.*, 2013). Au cours de ces dernières années, il a été prouvé que de plus en plus des protéines sont associées à la voie de signalisation des RE, parmi lesquelles, CycD1 (HUANG *et al.*, 2016). Dans la présente étude, les résultats montrent qu'il existe une très bonne corrélation entre l'expression de CycD1 et celle des RE ($P<0,001$). Ce résultat est en parfait accord avec ceux d'autres études précédentes qui ont également trouvé une très bonne corrélation entre les deux paramètres (SHOKER *et al.*, 2001 ; REIS-FILHO *et al.*, 2006 ; ELSHEIKH *et al.*, 2008 ;

SANTANU *et al.*, 2015 ; HUANG *et al.*, 2016). Cette association peut être expliquée par la régulation positive des RE par CycD1 dans les lignées cellulaires du cancer du sein où il a été démontré que CycD1 se joint directement et active les REα indépendamment de la CDK et de la pRb (SUTHERLAND *et al.*, 1995 ; ZWIJSEN *et al.*, 1997 ; NEUMAN *et al.*, 1997). Cette découverte, qui suggère que la surexpression de CycD1 peut activer les RE indépendamment, a le potentiel d'ajouter une dimension cruciale à la compréhension de la carcinogenèse mammaire. Ces résultats soutiennent également le concept que l'expression élevée des RE peut coopérer à la maintenance de niveaux élevés d'expression de CycD1 (CICATIELLO *et al.*, 2004 ; AALTONEN *et al.*, 2009 ; LIYING *et al.*, 2015). YANG et ses collaborateurs (2006) ont remarqué que malgré la phosphorylation de pRb par CycD1 dépendante de CDK4, l'activité de la CDK4 n'est pas augmentée dans le cancer du sein, ce qui conduit à rechercher des gènes associés à CycD1 dans les cas de l'invasion tumorale. Ces auteurs ont identifié des gènes régulés à la fois par CycD1 et par les RE contribuant à la cancérogenèse du sein, il s'agit de l'Immediate Early response gene (IEX-1), Tumor necrosis factor (TNF)-Associated Factor-Interacting Protein (TRAF-IP) et Estradiol-inducible Small Stress Protein 1 (E2-SSP1). L'induction des RE par CycD1 indépendamment du ligand d'œstrogènes et de CDK4 dépend des interactions protéiques directes entre CycD1 et le coactivateur-1 des RE (MCMAHON *et al.*, 1999). L'expression de CycD1 renforce la liaison du coactivateur-1 des RE aux promoteurs IEX-1, TRAF-IP et E2-SSP1 en augmentant leur expression (YANG *et al.*, 2006). Les mêmes auteurs suggèrent que l'interaction CycD1-coactivateur-1 des RE est une fonction significative de CycD1 dans le cancer du sein invasif et soulignent l'importance d'identification de tous les gènes régulés par les RE pour prouver leur potentiel en tant que cibles thérapeutiques dont la manipulation pourrait inhiber les effets combinés de CycD1 et des RE dans les cancers du sein (YANG *et al.*, 2010). HWANG et ses collaborateurs (2003) rapportent que la surexpression de CycD1 est associée à un phénotype moins agressif dans les cancers du sein RE+. Alors que l'hormonothérapie représente un traitement majeur pour les patientes atteintes d'un cancer du sein RE+, jusqu'à 40% des patientes sont résistantes à ce traitement. Ce mécanisme de résistance reste un problème majeur (LI *et al.*, 2016). SELLI et ses collaborateurs (2016), face à ce problème de résistance, rapportèrent que les futurs outils de prédiction de la réponse à l'hormonothérapie nécessiteront l'intégration d'un large éventail d'informations moléculaires, notamment l'expression des gènes et les mutations acquises qui peuvent affecter la réponse aux traitements. Ces auteurs et l'équipe de recherche de THIERRY et TANOS (2018), suggèrent d'utiliser une approche combinée incluant le profilage de l'expression génique dans les biopsies du sein dans le contexte néoadjuvant et le profilage de l'expression génique de la biopsie liquide pour aboutir à un traitement efficace correspondant à chaque patiente et pour surveiller son efficacité individuellement. JONHSON et ses collaborateurs (2016) ont observé que la combinaison d'inhibition de la signalisation des RE et de CDK4/6 comme traitement est évidente, car le gène codant pour CycD1 qui active le

CDK4/6, est sensible à l'œstrogène. Les mêmes auteurs ont indiqué que l'utilisation précoce de cette inhibition dans le traitement du cancer du sein peut réduire non seulement la prolifération, mais également la dissémination puisque le facteur E2F contribue dans des phases ultérieures de la propagation métastatique du cancer du sein. Nos résultats montrent également que CycD1 est surexprimée dans les tumeurs RE- mais avec des fréquences très faibles. Ce résultat est conforme avec celui d'AHLIN et ses collaborateurs (2017) qui ont observé une faible expression de CycD1 dans les cas de cancer RE-. Ces auteurs ont remarqué que la forte expression de CycD1 augmente la mortalité dans les cas de cancer RE+, alors qu'aucun effet significatif n'est observé dans les cas de cancer RE-. Cela confirme que l'impact pronostique de l'expression de CycD1 dépend en effet du statut des RE.

Comme pour les RE, les RP sont des médiateurs importants du développement du cancer du sein. Ils sont souvent co-exprimés avec CycD1 dans des cellules tumorales du sein où ils coopèrent pour induire des programmes prolifératifs au cours de la progression du cancer du sein (DRESSING *et al.*, 2014). Nos résultats montrent qu'il existe une bonne corrélation entre l'expression de CycD1 et les RP ($P=0,002$). Ceci est en concordance avec les résultats de beaucoup de travaux (AALTONEN *et al.*, 2009 ; RAVIKUMAR et ANANTHAMURTHY, 2014 ; SANTANU *et al.*, 2015 ; AHLIN *et al.*, 2017). YANG et ses collaborateurs (2010) rapportèrent que CycD1 et les œstrogènes régulent l'expression des RP. Ce mécanisme qui couple les effets de l'œstrogène et de la progestérone dans les tissus mammaires, explique le lien étroit qui existe entre l'expression de CycD1 et le statut des récepteurs hormonaux dans le cancer du sein. La combinaison de l'expression des RE et de CycD1 augmente l'expression et la fonction des RP, et augmente aussi l'expression des gènes cibles des RP. Étant donné que l'expression des RP est importante, l'exploration des fonctionnalités de son promoteur est primordiale pour comprendre sa régulation du développement et de la cancérisation du sein. La réponse des RP à CycD1 est indépendante de la présence de CDK4/CDK6 en absence d'œstrogène, bien que sa réponse dépende de la présence de CDK4/CDK6 et d'œstrogène. La combinaison œstrogène-CycD1 stimule simultanément la fonction des RP, expliquant potentiellement leurs effets combinés *in vivo* sur le développement mammaire. Il est important de noter que l'élément de liaison aux RE qui est nécessaire pour la réponse aux œstrogènes, est à la fois nécessaire pour l'activation du promoteur des RP. Par ailleurs, aucune confirmation n'existe concernant la capacité de CycD1 d'activer l'élément de liaison aux RE indépendamment, ce qui démontre que d'autres éléments dans le promoteur des RP sont nécessaires pour sa réactivité à CycD1 (YANG *et al.*, 2010). Ainsi, l'expression simultanée des RP et de CycD1 confère aux cellules cancéreuses du sein un avantage prolifératif qui perdure probablement du fait de redondances des mécanismes qui convergent et coopèrent pour induire le cycle cellulaire (DRESSING *et al.*, 2014). De ce fait, l'inhibition du complexe RP-CycD1 à l'aide de l'utilisation d'antiprogestérone peut constituer une nouvelle approche pour arrêter la résistance aux traitements du cancer du sein CycD1+ (STENDAHL *et al.*, 2004 ; MUSGROVE *et al.*, 2011). De nombreuses études

ont démontré la capacité de CycD1 à agir en tant que facteur de transcription (DIEHL et COQUERET, 2002 ; BIENVENU *et al.*, 2010 ; CASIMIRO *et al.*, 2012). Puisque CycD1 est régulée positivement dans la plupart des tumeurs du sein, il ne s'agit probablement pas seulement de moduler le mécanisme de la progression du cycle cellulaire, mais également de procéder directement, par le recrutement de cofacteurs transcriptionnels, à l'activation et à l'expression des RP, des RE et des récepteurs thyroïdiens (LAMB *et al.*, 2000 ; LIN *et al.*, 2002 ; PETRE-DRAVIAM *et al.*, 2005 ; BOSTROM *et al.*, 2009). Des complexes contenant CycD1 et les RP peuvent réguler positivement le gène HSPB8 (Heat Shock Protein B8) qui est un gène cible des RP et dont l'expression est induite par les œstrogènes dans les cellules tumorales mammaires RE+ (YANG *et al.*, 2006). L'association du complexe RP-CycD1 avec des éléments en amont du promoteur du gène HSPB8 peut contribuer à l'augmentation de son expression et constitue un mécanisme potentiel pour échapper aux contrôles hormonaux pendant la progression du cancer du sein (DRESSING *et al.*, 2014).

Les traitements hormonaux de substitution associant l'œstrogène et la progestérone démontrent clairement que ces hormones peuvent ensemble favoriser la cancérogenèse du sein (CHLEBOWSKI *et al.*, 2009). Nous montrons dans notre étude une association étroite entre CycD1 et le statut des RE et RP dans le cancer du sein. Cette association peut résulter de la combinaison du contrôle de CycD1 par les hormones ovariennes et d'une régulation en amont de l'expression des RP par CycD1 et les œstrogènes. Ce mécanisme pourrait augmenter sélectivement l'expression de CycD1 dans les cancers du sein à récepteurs hormonaux positifs (YANG *et al.*, 2010).

Parmi les paramètres biologiques avec lesquels CycD1 s'associe, nous notons le marqueur de prolifération Ki-67. En effet, nos résultats ont montré une corrélation significative entre l'expression de CycD1 et celle du Ki-67 ($P=0,022$). Ce résultat est conforme à celui d'une étude antérieure menée par LING-LING et ses collaborateurs (2007) qui ont trouvé une corrélation significative ($P=0,043$). Ces auteurs suggèrent que les tumeurs surexprimant CycD1 ont un potentiel de croissance plus élevé et favorisent plus facilement la progression du cycle cellulaire entraînant la surexpression du Ki-67. Etant donné que le Ki-67 est présent tout au long du cycle cellulaire, et que CycD1 est une protéine clé dans le cycle cellulaire et donc son expression est essentielle pour la régulation de la prolifération, de la différenciation et du contrôle de la transcription, cela garantie un taux de croissance élevé aux cellules cancéreuses (SHEVRA *et al.*, 2015). La corrélation entre CycD1 et le Ki-67 a été également confirmée dans d'autres études avec des seuils (P) entre 0,032 et 0,0001 (REIS-FILHO *et al.*, 2006 ; LUNDGREN *et al.*, 2012 ; LI *et al.*, 2016). LUNDGREN et ses collaborateurs (2012) ont observé qu'avec une corrélation positive entre le Ki-67 et CycD1, les patientes présentant une faible expression de Ki-67 et des niveaux très élevés d'expression de CycD1 ont un temps de récurrence long, tandis que les patientes présentant des taux très élevés de Ki-67 et des taux très bas d'expression de CycD1 présentent un temps de récurrence court. Cependant, l'analyse multivariée menée par LEHN et ses collaborateurs

(2010) indique que le taux d'expression de CycD1 est un facteur prédictif du pronostic indépendamment du Ki-67 ; une expression modérée ou forte de CycD1 entraîne un temps de récurrence prolongé chez les patientes atteintes d'un cancer RE+. La relation entre CycD1, le Ki-67 et le pronostic semble donc complexe, et ceci peut s'expliquer en partie par des fonctions supplémentaires potentielles de CycD1 non liées au contrôle de la prolifération (LUNDGREN *et al.*, 2012).

Il semblerait que la surexpression simultanée de CycD1 et du Ki-67 dans les tumeurs, est un indicateur d'un mauvais pronostic (GUIMARÃES *et al.*, 2015). Mais sans noter une bonne corrélation entre ces deux paramètres ($P=0,9$) même dans les tissus mammaires normaux (SHOKER *et al.*, 2001). BOSTRÖM et ses collaborateurs (2009) infirment également nos résultats en suggérant que l'absence de corrélation entre les deux paramètres est un indicateur de bon pronostic. Cette contradiction dans les résultats est expliquée par la variabilité des approches entre les laboratoires, qui est un facteur majeur de discordance dans les résultats (POLLEY *et al.*, 2013). Ces auteurs recommandent de faire preuve de prudence dans l'interprétation des résultats du Ki-67, en les comparant avec différentes études.

La mutation du gène P53 reflétée par l'expression positive de la protéine p53 est l'une des principales causes de transformation maligne du carcinome du sein (JONES *et al.*, 2004). Nos résultats montrent que 62,8% des cas qui surexpriment CycD1 présentent également des hauts scores de p53, mais sans corrélation notable ($P=0,962$). Ce résultat ne fait pas l'unanimité : certaines études évoquent la même logique avec une fréquence estimée à 62,2% (LING-LING *et al.*, 2007) et un seuil de signification (P) égale à 0,720 (ELSHEIKH *et al.*, 2008). Alors que d'autres font état de conclusion contraire en révélant une qui ont révélé bonne corrélation ($P<0,0001$) (REIS-FILHO *et al.*, 2006). Cette corrélation positive entre CycD1 et p53 pourrait être justifiée par le fait qu'ils jouent tous les deux un rôle essentiel dans le cycle cellulaire en contrôlant la progression en phase G1, et donc leur surexpression simultanée entraîne une perte de contrôle en accélérant la phase G1 du cycle cellulaire (OLIMID *et al.*, 2012).

Dans les cellules normales, la p53 est très peu exprimée car elle se lie avec le MDM2 (Murine Double Minute 2), ce qui provoque sa dégradation. Cette liaison est abolie au cours d'un stress cellulaire suite à des lésions de l'ADN par exemple, ce qui conduit à la modification de la structure de p53 et à l'activation de la transcription de nombreux gènes, tel que le gène CDKN1A qui code pour la p21. L'augmentation de la transcription de ce dernier par le gène P53, inhibe l'activité du complexe Cycline/CDK et empêche les cellules d'entrer dans la phase S (STEELE et LANE, 2005 ; HALLDORSDOTTIR *et al.*, 2011 ; BARGIELA-IPARRAGUIRRE *et al.*, 2016). Bien que le gène P53 puisse induire l'expression de p21 et inhiber la fonction du complexe CycD1/CDK dans les cellules normales, l'expression de CycD1 dans les cellules cancéreuses ne répond pas nécessairement au

dysfonctionnement de la protéine p53 ou à l'expression positive de p53 mutée. Une voie indépendante de la mutation du gène P53 peut exister dans le carcinome du sein, ce qui pourrait également entraîner une surexpression de CycD1 (STEELE et LANE, 2005).

Une équipe de scientifiques menée par RAMAN et ses collaborateurs (2000) a cherché à déterminer les mécanismes pouvant expliquer la perte de fonction de p53 dans le cancer du sein. Ils ont ainsi montré que le taux d'ARNm de p53 était bas dans une grande proportion de tumeurs mammaires, ce qui indiquait un trouble de la régulation de l'expression du gène. Dans cette optique, les auteurs ont mis en évidence plusieurs sites de fixation des protéines dérivées des gènes homéotiques (HOX) sur la séquence promotrice du gène P53, ce qui revenait à dire que la transcription de P53 pouvait éventuellement être régulée par ces protéines. Cette hypothèse a été vérifiée par l'activation du promoteur du gène p53 par l'expression de HOXA5 dans des cellules épithéliales cancéreuses exprimant le gène p53 sauvage, Ce qui a entraîné l'apoptose. Ce cas de figure n'a pas été observé dans des cellules dépourvues de p53. Il semblerait que HOXA5 déclenche indirectement l'apoptose en stimulant la transcription de p53. De ce fait, une diminution du taux de HOXA5 pouvait expliquer la perte d'activité de p53 dans des conditions normales (RAMAN *et al.*, 2000). Toutefois, les souris possédant le gène HOXA5 muté ne développeraient pas spontanément de tumeurs mammaires, indiquant ainsi que cette lésion génétique n'est pas suffisante pour déclencher le processus d'oncogenèse mais qu'elle pourrait conférer un état de prédisposition (BOUCHERAT *et al.*, 2009). Selon nos résultats, la surexpression de CycD1 seule pourrait jouer un rôle important dans la carcinogenèse mammaire sans présence d'une éventuelle mutation de la p53.

Nos travaux n'ont pas révélé un lien significatif entre l'expression de CycD1 et les paramètres clinicopathologiques étudiés. La CycD1 est surexprimée beaucoup plus chez les patientes âgées de plus de 50 ans avec une corrélation à la limite de signification ($p=0,060$). Cette expression élevée de CycD1 pourrait être génétiquement prédéterminée (MICHALIDES *et al.*, 1996 ; KENNY *et al.*, 1999 ; SANTANU *et al.*, 2015). Le grade histologique d'une tumeur est traditionnellement considéré comme un facteur pronostique chez les patientes atteintes d'un cancer du sein. L'interaction entre les marqueurs pronostiques connus avec de nouveaux marqueurs moléculaires comme CycD1 doit faire l'objet de recherches approfondies pour prédire l'évolution des cancers du sein. 78/138 tumeurs de grades SBR II et III ont surexprimé CycD1, mais sans corrélation significative ($P=0,518$). Ce résultat est en accord avec ceux trouvé dans d'autres études qui suggèrent que la surexpression de CycD1 est un marqueur de bon pronostic, en particulier lorsque les RE sont co-exprimés (REIS-FILHO *et al.*, 2006 ; BOSTRÖM *et al.*, 2009 ; RAVIKUMAR et ANANTHAMURTHY, 2014). Cette association serait notable selon les résultats obtenus dans d'autres études (ELSHEIKH *et al.*, 2008 ; AALTONEN *et al.*, 2009 ; LI *et al.*, 2016 ; AHLIN *et al.*, 2017) en suggérant un lien étroit entre CycD1 et l'agressivité de la maladie (LUNDGREN *et al.*, 2012). D'autre part, selon ROY et THOMPSON (2006), CycD1 est

principalement surexprimée dans les cancers du sein de faible grade. L'hypothèse serait la possibilité que CycD1 soit impliquée dans la différenciation cellulaire et l'arrêt de la croissance en plus de son rôle bien défini dans la progression du cycle cellulaire. Dans une étude plus ancienne menée par TUT et ses collaborateurs (2001), il a été constaté que les tumeurs de haut grade présentant une faible expression de CycD1 étaient très agressives ; La CycD1 pourrait être surexprimée à un stade très précoce et qu'elle ne s'exprime plus ou peu après invasion. La tendance de la surexpression de CycD1 dans les tissus mammaires, allant de l'épithélium normal jusqu'au cancer du sein invasif, suggère son implication dans les premiers stades de la carcinogenèse mammaire (RENNSTAM *et al.*, 2001).

L'état des ganglions lymphatiques reste parmi les indicateurs pronostiques en termes de récidive mais aussi de survie totale. Malheureusement, la sensibilité de ce facteur pronostique est relative puisque 20 à 30% des patientes qui sont dépourvues de métastases ganglionnaires rechutent (LIAPI *et al.*, 2017). Nos résultats montrent que 60,7% des patientes exprimant CycD1 (tout scores confondus) ont des ganglions métastatiques, mais sans noter toutefois de corrélation significative ($P=0,833$) ; Résultat, en accord avec ceux des études antérieurs (REIS-FILHO *et al.*, 2006 ; RAVIKUMAR et ANANTHAMURTHY, 2014 ; LI *et al.*, 2016). Nos résultats indiquent également que la majorité (70,5%) des tumeurs exprimant CycD1, ont une taille comprise entre 2 et 5cm, sans aucune association significative ($P=0,186$). Beaucoup d'études pour ne citer que les plus récentes (RAVIKUMAR et ANANTHAMURTHY, 2014 ; AHLIN *et al.*, 2017) ont montré l'absence d'une telle association, quand d'autres affirment l'existence d'une corrélation significative entre la surexpression de CycD1 et la taille de la tumeur ($P<0,01$) (LUNDGREN *et al.*, 2012 ; SANTANU *et al.*, 2015).

L'étude de l'activité du gène CCND1 montre que le gène CCND1 est amplifié dans 12,3% des cas. REIS-FILHO et ses collaborateurs (2006) ont estimé cette amplification du gène à 14,5%. LUNDGREN et ses collaborateurs (2012) ont également trouvé une amplification du gène CCND1 dans 8,7% des cas. Les résultats de l'étude d'ELSHEIKH et ses collaborateurs (2008) révèlent aussi que le gène CCND1 est amplifié dans 9,6% des cas. Quant à l'étude de ROY et ses collaborateurs (2010), les résultats montrent que le gène est amplifié dans 29% de cas dont 15% avec plus de 8 copies du gène. Cette amplification du gène CCND1 est souvent liée à une surexpression de CycD1, ce que nous avons tenté de prouver dans notre étude. Selon nos résultats, il existe une disparité entre l'amplification du gène CCND1 et l'expression de son produit, CycD1. L'immunohistochimie a révélé des cas de surexpression de CycD1 sans modification mesurable du nombre de copies du gène CCND1. En effet, seulement 12,3% des tumeurs ont une amplification du gène, alors que 56,5% surexpriment la protéine associée. Quoique ce résultat n'est pas surprenant étant donné que cette protéine joue un rôle central dans la transition G1/S, et peut être régulée via plusieurs voies différentes, y compris les voies des récepteurs RE, *c-myc* et FGF. Malgré cette disparité, les deux paramètres sont corrélés très significativement ($P<0,001$).

Toutes les tumeurs CCND1 amplifié surexpriment CycD1 dont 13/17 (76,5%) ont une forte surexpression. Ce résultat est conforme avec plusieurs autres études qui révèlent une très bonne corrélation entre l'expression de CycD1 et l'amplification du gène CCND1 ($P<0.0001$) (ROY *et al.*, 2010 ; LI *et al.*, 2016), et montrent que 96,6% de tumeurs CCND1 amplifié ont une forte expression de CycD1 (REIS-FILHO *et al.*, 2006). ELSHEIKH et ses collaborateurs (2008) ont aussi noté une excellente corrélation entre les deux paramètres ($P<0,001$) avec 58% de tumeurs amplifiées associées à une forte surexpression de CycD1.

Selon TOBIN et BERGH (2012), si CycD1 doit être considérée comme un biomarqueur pronostique ou prédictif du traitement du cancer du sein, un critère de sélection plus strict doit être imposé pour obtenir des résultats cohérents. Ces chercheurs recommandent une élimination au préalable des cas amplifiés de CCND1 avant l'analyse de l'expression de CycD1 pour obtenir des résultats fiables. Tout examen de CycD1 doit commencer par une détermination du nombre de copies de gène CCND1. Une analyse de tous les cas amplifiés sera ensuite réalisée indépendamment. Si cette stratégie est appliquée rigoureusement, l'importance de l'amplification de CCND1 en tant que marqueur clinique sera renforcée et permet de déterminer la conséquence de la surexpression de CycD1 dans les tumeurs du sein.

Dans environ 15% des cancers du sein primitifs, la surexpression de CycD1 due à l'amplification du gène correspondant CCND1, est liée à un mauvais pronostic (NAIDU *et al.*, 2002 ; BIECHE *et al.*, 2002 ; JIRSTROM *et al.*, 2005). Dans le même ordre d'idée, LUNDGREN et ses collaborateurs (2012) ont constaté également que l'amplification du gène CCND1 était associée à un mauvais pronostic. Malgré l'association positive entre l'expression de CycD1 et le statut d'amplification du gène CCND1, leur faible expression est liée à une récidive antérieure dans les cancers du sein post-ménopausiques RE+. L'expression de CycD1 sans amplification de CCND1, est un marqueur indépendant avec un temps de récurrence plus long, ce qui indique que la valeur pronostique réelle de l'expression de CycD1 peut être obscurcie par une amplification du gène CCND1. La signification clinique de l'expression de CycD1 pourrait donc être mieux prise en compte séparément.

Dans beaucoup de cas de cancer du sein, la surexpression de CycD1 ne peut pas être expliquée par l'amplification du gène CCND1, ce qui suggère que l'activation anormale de CycD1 peut se produire via d'autres mécanismes, notamment la dysrégulation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle de son gène (COQUERET, 2002 ; ALBANESE *et al.*, 2003). Les travaux réalisés dans ce contexte ne fournissent pas beaucoup d'arguments concernant l'implication de la surexpression de CycD1 sans amplification du gène CCND1 dans la genèse du cancer sein, par rapport aux tumeurs mammaires CycD1+/CCND1 amplifié. Il est possible que différentes lésions primaires puissent conduire à l'activation secondaire de CycD1 et donc fournir à la cellule une voie alternative pour atteindre le même

effet néoplasique. Il est possible aussi que ces tumeurs, contiennent déjà différentes mutations primaires, et ne soient pas pathologiquement dépendantes de CycD1 surexprimée. Du point de vue clinique, l'importance majeure de cette question non résolue réside dans le fait de savoir si un traitement par anti-CycD1 s'avérera tout aussi efficace pour les tumeurs CycD1+/ CCND1 non amplifié que pour les tumeurs CycD1+/CCND1 amplifié (ARNOLD et PAPANIKOLAOU, 2005).

Comme pour CycD1, nos résultats révèlent l'existence d'une bonne corrélation entre l'amplification du gène CCND1 et les RE ($P=0,003$). Les résultats de l'équipe de recherche d'ELSHEIKH et ses collaborateurs (2008) ont confirmé cette association entre ces deux paramètres ($P=0,006$), en suggérant que l'amplification du gène CCND1 peut conférer aux cellules cancéreuses un avantage en termes de croissance et de survie pour le développement et la progression des cancers du sein RE+. LUNDGREN et ses collaborateurs (2012) indiquent qu'une faible expression de la protéine CycD1, ainsi qu'une faible amplification de CCND1, sont liées à l'agressivité de la tumeur et à un risque accru de récurrence de la maladie dans le cancer du sein RE+ post-ménopausal. Toujours, en accord avec nos résultats, ROY et ses collaborateurs (2010) suggèrent qu'en termes d'utilité clinique, l'amplification de CCND1 peut être une indication pour un traitement chimiothérapeutique supplémentaire chez les femmes atteintes d'un cancer du sein RE+. LI et ses collaborateurs (2016) pensent qu'il serait utile d'identifier un sous-groupe de patientes atteintes d'un cancer du sein RE+ qui ont une mauvaise réponse à l'hormonothérapie. Ce sous-groupe pourrait servir de cible aux médicaments anticancéreux à l'avenir. Bien qu'il soit clair que l'expression de CycD1 induite par les RE est essentielle pour induire la progression du cycle cellulaire, la régulation du gène CCND1 par les œstrogènes apparaît complexe, impliquant à la fois des événements primaires et secondaires (CICATIELLO *et al.*, 2004). CCND1 est une cible transcriptionnelle des RE et ce processus semble être directement médiatisé par le recrutement coordonné de co-activateurs spécifiques des RE et l'activation des voies IKK kinase α (IKK α) et MAPK (PARK *et al.*, 2005). Bien qu'aucune corrélation n'a été observée entre la surexpression d'IKK α et les RE, mais l'IKK α active les fonctions de transactivation des RE via la phosphorylation directe de la Ser167 déclenchant ainsi l'expression du gène CCND1. IKK α sont également associées à la régulation du gène CCND1 dans les cellules RE- par l'intermédiaire d'un mécanisme indépendant des RE+ probablement via la voie IKK α /NF- κ B (GUO *et al.*, 2010 ; GRANDVAUX, 2011).

Les résultats relatifs aux RP, montrent qu'il existe une corrélation entre l'amplification du gène CCND1 et les RP ($P=0,030$), résultat en concordance avec ceux d'autres études précédentes (ELSHEIKH *et al.*, 2008 ; LI *et al.*, 2016) mais en désaccord avec l'étude de (REIS-FILHO *et al.*, 2006 ; AHLIN *et al.*, 2017) ($P=0,650$; $P=0,50$). Il a été démontré que la progestérone peut activer le promoteur du gène CCND1 dans les cellules cancéreuses mammaires en induisant une liaison directe entre les RP et l'élément de réponse de l'œstrogène ce qui peut servir de passerelle vers le gène CCND1

(GIULIANELLI *et al.*, 2013). WARGON et ses collaborateurs (2015) suggèrent que des régions dans le promoteur du gène CCND1 pourraient induire la transcription des RP, et qu'un traitement anti-progestatif a induit une régression tumorale en augmentant l'association entre les RP et des régions du promoteur du gène CCND1. Les RP phosphorylés sur les Ser294 et Ser400, s'associent au gène CCND1 en augmentant son expression afin de recruter le complexe transcriptionnel contenant Sp1 et d'induire l'expression des gènes cibles des RP (KIM *et al.*, 2013 ; DRESSING *et al.*, 2014 ; DIEP *et al.*, 2015).

L'importance du marqueur de prolifération Ki-67 est indéniable en tant que facteur pronostique et prédictifs aux réponses aux traitements de chimiothérapie mais son association à l'activité du gène CCND1 n'est pas toujours évidente et les résultats publiés ne sont pas concordants. Nos résultats montrent qu'il n'existe pas de lien étroit entre l'expression du Ki-67 et l'amplification du gène CCND1 ($P=0,080$). En effet, plusieurs études confirment ce résultat (ELSHEIKH *et al.*, 2008 ; LI *et al.*, 2016), contrairement à celui obtenu par l'équipe de LUNDGREN et ses collaborateurs (2012) qui note une très bonne corrélation ($P<0,001$). AHLIN et ses collaborateurs (2017) rapportent que la surexpression simultanée du Ki-67 et l'amplification du gène CCND1 est associée à un mauvais pronostic. Ces auteurs étaient que l'existence d'une telle corrélation entre ces deux paramètres en présence d'une expression élevée de CycD1 était associée à un temps de récurrence prolongé.

Comme pour le Ki-67, les résultats sont contradictoires quant à l'existence d'une association entre l'expression de p53 et le gène CCND1. Aucune corrélation n'a été notée dans notre cas ($P=0,492$). Ce résultat est confirmé par des études précédentes (REIS-FILHO *et al.*, 2006 ; ELSHEIKH *et al.*, 2008) qui n'ont trouvé aucun lien significatif. Cependant, LI et ses collaborateurs (2016) trouvent une très bonne corrélation entre ces deux paramètres ($P<0,001$).

Le grade SBR ne suit pas également l'amplification du CCND1 de manière significative ($P=0,361$). L'étude réalisée par ELSHEIKH et ses collaborateurs (2008) a montré le même résultat ($P=0,229$), mais a décelé une bonne corrélation entre ces deux paramètres dans les tumeurs RE+ ($P=0,018$). Les résultats récents d'AHLIN et ses collaborateurs (2017) confirment les nôtres ($P=0,14$). ROY et ses collaborateurs (2010) ont trouvé par contre un résultat contradictoire montrant une bonne corrélation ($P=0,005$). Pareil pour l'équipe de LI et ses collaborateurs (2016) qui ont trouvé une bonne corrélation ($P=0,052$). Ces auteurs ont constaté que les tumeurs qui présentent une forte amplification du gène CCND1 (>8 copies) tendent à avoir un haut grade SBR suggérant que le gène CCND1 est lié à un phénotype plus agressif de la tumeur.

Selon nos résultats, l'activité du gène CCND1 ne semble pas corrélée à l'invasion lymphatique (0,855). Ce résultat est en accord avec ceux trouvés dans d'autres études (REIS-FILHO *et al.*, 2006 ; ELSHEIKH *et al.*, 2008 ; ROY *et al.*, 2010), mais en désaccord avec l'étude de LI et ses collaborateurs

(2016) qui ont trouvé une très bonne corrélation entre le statut des ganglions lymphatiques et l'amplification du gène CCND1 ($P<0,001$). Relativement à la taille de la tumeur, nos résultats ne montrent pas de corrélation significative avec l'amplification du gène CCND1 ($P=0,559$). Ce résultat concorde avec ceux trouvés dans des études similaires (ELSHEIKH *et al.*, 2008 ; LUNDGREN *et al.*, 2016 ; LI *et al.*, 2016 ; AHLIN *et al.*, 2017).

Rapport.Gratuit.Couleur

CONCLUSION

CycD1 joue un rôle primordial dans la néogenèse tumorale. Elle représente un point de convergence important de multiples voies de signalisation. Fréquemment dérégulée dans les cancers du sein, son implication dans l'oncogenèse repose principalement sur sa capacité à activer les CDK4/6. De ce fait, l'expression de CycD1 représente un nouveau biomarqueur pour le cancer ; Des taux élevés indiquent une susceptibilité accrue au cancer et la mise en place d'un traitement adapté est préconisée. A ce titre, le ciblage spécifique de CycD1 pourrait représenter une alternative clinique. En effet, la surexpression de CycD1 a été rapportée dans 40 à 90% des cas de cancer du sein invasif en présence/absence de l'activation du gène CCND1 et demeure l'une des protéines les plus couramment surexprimées. Malgré toutes ces raisons, beaucoup d'études restent à entreprendre pour expliquer la valeur pronostique et les dérégulations de CycD1 et l'amplification du gène CCND1 en relation avec d'autres paramètres biologiques dans l'évolution de ces tumeurs. D'autre part, comme les résultats de certaines études sont controversés, le besoin de mieux comprendre ce type d'association demeure encore nécessaire.

Au cours de notre travail, nous avons évalué la relation entre l'expression de la protéine CycD1 et son gène CCND1 d'une part et la nature de leur coopération avec les paramètres clinicopathologiques à savoir le grade histologique SBR, la taille de la tumeur, et l'invasion lymphatique ainsi qu'avec les paramètres biologiques, RE, RP, Ki-67 et la p53 sur une série de carcinomes canalaire infiltrants mammaires.

Malgré la prédominance des tumeurs de haut grade histologique SBR, nous n'avons pas trouvé une corrélation significative avec l'expression de CycD1, ni avec l'activité du gène CCND1. Le même résultat est observé quant à la taille de la tumeur et l'invasion lymphatique. Cependant, une bonne corrélation existe entre l'expression de CycD1 et les RE et les RP. Cette connaissance du statut des récepteurs hormonaux d'une tumeur aide à prévoir le degré d'efficacité de l'hormonothérapie en complément d'un traitement adjuvant adéquat. Notre étude révèle que les récepteurs hormonaux sont surexprimés dans la majorité des tumeurs étudiées, ce qui engendre un bon pronostic. Ce statut n'est pas commun à toutes les tumeurs RE+/RP+ car certaines sont associées à une résistance à l'hormonothérapie (LUNDGREN *et al.*, 2008 ; VILQUIN *et al.*, 2015). Il ressort aussi de notre étude que CycD1 est également surexprimée dans des tumeurs RE-.

Les résultats de notre étude montrent qu'il existe une bonne corrélation entre l'expression du marqueur de prolifération Ki-67 et celle de la protéine CycD1, tandis qu'aucune association n'est observée avec le gène CCND1. Quant à l'expression de la p53, aucune corrélation n'est retrouvé avec l'expression de CycD1, ni avec le gène CCND1.

La surexpression de la protéine CycD1 et l'amplification du gène CCND1 sont fréquents dans les carcinomes canalaire infiltrants. Notre étude confirme de tel résultat et montrent également l'existence d'une forte corrélation entre l'expression de la protéine CycD1 et l'amplification de son gène CCND1.

CONCLUSION

Néanmoins, l'expression élevée de CycD1 n'est pas toujours le résultat d'une amplification du gène CCND1.

Selon nos résultats, l'analyse des lames d'IHC constitue une aide fiable et reproductible à l'évaluation du statut de CycD1 et des différents paramètres étudiés ainsi que celui de CCND1 en CISH. Certes, beaucoup de chercheurs essayent d'automatiser les processus d'analyses mais l'expérience montre que ces méthodes en réalité semi-automatique ne pourraient cependant pas se substituer à la lecture manuelle en l'état actuel des choses et surtout, en l'absence d'harmonisation d'approches. Nous estimons que les résultats sont importants et encourageants sur une cohorte de 138 CCI. Ces conditions augmentent le risque de résultats biaisés et de fausses associations. Des études prospectives bien construites, avec des cohortes de grande taille et avec plus de moyens, sont donc nécessaires afin de confirmer nos résultats et par conséquent, démontrer l'effet tangible de chaque facteur étudié, dans le but de mieux comprendre et entreprendre une démarche préventive.

Enfin, en raison de son rôle établi en tant qu'oncogène humain majeur, nous œuvrons pour le ciblage de CycD1 dans les protocoles anticancéreux. C'est une voie prometteuse en vue de la mise au point d'une thérapie à la carte pour les patientes atteintes du cancer mammaire, et peut s'avérer efficace et devrait augmenter les chances de succès thérapeutique dans ces tumeurs. Vu que la surexpression de CycD1 est retrouvée également dans des tumeurs du sein RE négatifs, le rôle biologique de la signalisation de CycD1 dans cette population reste à explorer.

BIBLIOGRAPHIE

A

- AALTONEN K., AMINI RM., LANDBERG G., EEROLA H., AITTOMAKI K., HEIKKILA P., NEVANLINNA H. and BLOMQVIST C. Cyclin D1 expression is associated with poor prognostic features in estrogen receptor positive breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 2009, 113:75–82.
- ABD EL-MAQSoud N. and ALY M. significance of Cyclin D1 overexpression and Amplification in ducat Hyperplasia, Carcinoma in situ and Invasive Carcinomas in Egyptian Female Breast. *International journal of cancer research*, 2010, 6(4):202-219.
- AGAMI M. and BERNARDS R. CDK-independent activities of D type cyclins. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2000, 1424:M17-M22.
- AHLIN C., LUNDGREN C., EMBRETSEN-VARRO E., JIRSTROME K., BLOMQVIST C. and FJÄLLSKOG ML. High expression of cyclin D1 is associated to high proliferation rate and increased risk of mortality in women with ER-positive but not in ER-negative breast cancers. *Breast Cancer Research and Treatment*, 2017, 164:667–678.
- AJCHENBAUM F., ANDO K., DE CAPRIO JA. and GRIFFIN JD. Independent regulation of human D-type cyclin gene expression during G1 phase in primary human T lymphocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 1993, 268:4113-4119.
- ALBANESE C., WU K., D'AMICO M. *et al.* IKKalpha regulates mitogenic signaling through transcriptional induction of cyclin D1 via Tcf. *Molecular Biology of the Cell*, 2003, 14:585-599.
- ALBERTS B., BRAY D., HOPKIN K., JOHNSON A., LEWIS J., RAFF M., ROBERTS K. and WALTER P. Cell-cycle control and cell death. *Essential cell biology*, 2004, 18:629-631.
- ALLE KM., HENSHALL SM., FIELD AS. and SUTHERLAND RL. Cyclin D1 protein is overexpressed in hyperplasia and intraductal carcinoma of the breast. *Clinical Cancer Research*, 1998, 4:847-854.
- ALLRED DC., HARVEY JM., BERARDO M. and CLARK GM. Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis. *Modern Pathology*, 1998, 11:155-168.
- ALTUCCI L., ADDEO R., CICATIELLO L. *et al.* 17beta-Estradiol induces cyclin D1 gene transcription, p36D1-p34CDK4 complex activation and p105Rb phosphorylation during mitogenic stimulation of G(1)-arrested human breast cancer cells. *Oncogene*, 1996, 12(11):2315–2324.
- ANDERS L., KE N., HYDBRING P., CHOI YJ., WIDLUND HR. and CHICK JM. A systematic screen for CDK4/6 substrates links FOXM1 phosphorylation to senescence suppression in cancer cells. *Cancer Cell*, 2011, 20:620–34.
- ANTONIOU A., PHAROAH P., NAROD S., RISCH A., EYFJORD E., HOPPER L. *et al.* Average Risks of Breast and Ovarian Cancer Associated with BRCA1 or BRCA2 Mutations Detected in Case Series Unselected for Family History: A Combined Analysis of 22 Studies. *American Journal of Human Genetics*, 2003, 72(5):1117–1130.
- ARDIET C. Comprendre le cancer du sein. *Centre Léon Bérard Lyon*, 2002, 12:39-42.
- ARESSY B. and DUCOMMUN B. Cell cycle control by the CDC25 phosphatases. *Anticancer Agents. Medicinal Chemistry*, 2008, 8:818–824.

B

- BALDIN V., LUKAS J., MARCOTE MJ. *et al.* Cyclin D1 is a nuclear protein required for cell cycle progression in G1. *Genes and Development*, 1993, 7(5):812-821.
- BARGIELA-IPARRAGUIRRE J., PRADO-MARCHAL L., FERNANDEZ-FUENTE M., GUTIERREZ-GONZÁLEZ A., MORENO-RUBIO J., MUÑOZ-FERNANDEZ M., SERENO M., SANCHEZ-PRIETO R., PERONA R., and SANCHEZ-PEREZ I. CHK1 expression in Gastric Cancer is modulated by p53 and RB1/E2F1: implications in chemo/radiotherapy response. *Scientific Reports*, 2016, 6:215-219.
- BARRE B., GIRAUD S., AVRIL S. and COQUERET O. Transcriptional regulation by a DNA-associated form of cyclin D1. *Molecular Biology of the Cell*, 2010, 16:1850-1858.
- BARTEK J. and LUKAS J. DNA damage checkpoints: from initiation to recovery or adaptation. *Current Opinion in Cell Biology*, 2007, 19:238-245.
- BARTEK J. and LUKAS J. Mammalian G1- and S-phase checkpoints in response to DNA damage. *Current Opinion in Cell Biology*, 2001, 13:738-747.
- BARTEK J., FALCK J. and LUKAS J. Chk2 kinase a busy messenger. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2001, 2:877-86.
- BERTOLI C., SKOTHEIM JM. and DE BRUIN RA. Control of cell cycle transcription during G1 and S phases. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2013, 14:518-28.
- BIECHE I., OLIVI M., NOGUES C., VIDAUD M. and LIDEREAU R. Prognostic value of CCND1 gene status in sporadic breast tumours, as determined by realtime quantitative PCR assays. *British Journal of Cancer*, 2002, 86:580-586.
- BJORNSTROM L. and SJÖBERG M. Mechanisms of estrogen receptor signaling: convergence of genomic and nongenomic actions on target genes. *Molecular Endocrinology*, 2005, 19:833-842.
- BLANCHARD J-M. Des oncogènes aux régulateurs de la mitose: un changement de perspective dans notre vision des processus cancéreux. *Médecine/Sciences*, 2003, 19(2):187-199.
- BLOOM HJ. and RICHARDSON WW. Histological grading and prognosis in breast cancer ; a study of 1409 cases of which 359 have been followed for 15 years. *British Journal of Cancer*, 1957, 11(3):359-77.
- BLOTTIERE HM. et BUECHER B. La machine moléculaire du cycle cellulaire. *Hépato-gastro et oncologie digestive*, 2001, 8(4):301-308.
- BORGNE A. et MEIJER L. Inhibiteurs chimiques des kinases dépendantes des cyclines: recherche et applications thérapeutiques potentielles. *Médecine/Sciences*, 1999, 15:496-503.
- BOSTROM P., SÖDERSTRÖM M., PALOKANGAS T. *et al.* Analysis of cyclins A, B1, D1 and E in breast cancer in relation to tumour grade and other prognostic factors. *BMC Research Notes*, 2009, 2:140.
- BOUCHERAT O., GUILLOU F., AUBIN J. et JEANNOTTE L. Hoxa5 : un maître d'œuvre à multiples facettes. *Médecine/Sciences*, 2009, 25:77-82.
- BRENNER AK., REIKVAM H., LAVECCHIA A. And BRUSERUD Ø. Therapeutic Targeting the Cell Division Cycle 25 (CDC25) Phosphatases in Human Acute Myeloid Leukemia: The Possibility to Target Several Kinases through Inhibition of the Various CDC25 Isoforms. *Molecules*, 2014, 19:18414-18447.
- BRITTON DJ., HUTCHESON IR., KNOWLDEN JM., BARROW D., GILES M., MCCLELLAND RA., GEE JM. and NICHOLSON RI. Bidirectional cross talk between ERalpha and EGFR signaling pathways regulates tamoxifen-resistant growth. *Breast Cancer Research and Treatment*, 2006, 96:131-146.

BUTT AJ., MCNEIL CM., MUSGROVE EA. and SUTHERLAND RL. Downstream targets of growth factor and oestrogen signalling and endocrine resistance: the potential roles of c-Myc, cyclin D1 and cyclin E. *Endocrine-Related Cancer*, 2005, 12(1):S47–S59.

C

CASIMIRO MC., WANG C., LI Z., DI SANTE G., WILLMART NE., ADDYA S., CHEN L., LIU Y., LISANTI MP. and PESTELL RG. Cyclin D1 Determines Estrogen Signaling in the Mammary Gland In Vivo. *Molecular Endocrinology*, 2013, 27(9):1415–1428.

CASIMIRO MC., CROSARIOL M., LORO E., ERTEL A., YU Z., DAMPIER W., SARIA EA., PAPANIKOLAOU A., STANEK TJ., LI Z., WANG C., FORTNA P., ADDYA S., TOZEREN A., KNUDSEN ES., ARNOLD A. and PESTELL RG. ChIP sequencing of cyclin D 1 reveals a transcriptional role in chromosomal instability in mice. *Journal of Clinical Investigation*, 2012, 122:833–843.

CHABALIER C., LAMARE C., RACCA C., PRIVAT M., VALETTE A. and LARMINAT F. BRCA1 downregulation leads to premature inactivation of spindle checkpoint and confers paclitaxel resistance. *Cell Cycle*, 2006, 5:1001-1007.

CHANG Y., MOORE PS., TALBOT SJ., BOSHOFF CH., ZARKOWSKA T. *et al.* Cyclin encoded by KS herpes virus [letter]. *Nature*, 1996, 382:410.

CHLEBOWSKI RT., KULLER LH., PRENTICE RL., STEFANICK ML., MANSON JE., GASS M., ARAGAKI AK. *et al.* Breast cancer after use of estrogen plus progestin in postmenopausal women. *The New England Journal of Medicine*, 2009, 360:573–587.

CICATIELLO L., ADDEO R., SASSO A., ALTUCCI L., PETRIZZI VB., BORGIO R., CANCEMI M., CAPORALI S., CARISTI S., SCAFOGLIO C., TETI D., BRESCIANI F., PERILLO B. and WEISZ A. Estrogens and Progesterone Promote Persistent CCND1 Gene Activation during G1 by Inducing Transcriptional Derepression via c-Jun/c Fos/Estrogen Receptor (Progesterone Receptor) Complex Assembly to a Distal Regulatory Element and Recruitment of Cyclin D1 to Its Own Gene Promoter. *Molecular and Cellular Biology*, 2004, 7260–7274.

CLEVINGER CV. Role of prolactin/prolactin receptor signaling in human breast cancer. *Breast Disease*, 2003, 18:75–86.

COOPER B., SAWAI C., SICINSKA E., POWERS S., SICINSKI P., CLARK M. and AIFANTIS IA. unique function for cyclin D3 in early B cell development. *Nature Immunology*, 2006, 7:489–497.

COQUERET O. Linking cyclins to transcriptional control. *Gene*, 2002, 299:35-55.

CROUÉ A. Types histologiques des Tumeurs du Sein. Genève. *Organisation Mondiale de la Santé*, 1999, 892-896.

CRUZ JC. and TSAI LH. A Jekyll and Hyde kinase: roles for Cdk5 in brain development and disease. *Current opinion in neurobiology*, 2004, 14:390-394.

D

DARBON JM., DEVAULT A., TAVIAUX S., FESQUET D., MARTINEZ AM., GALAS S. *et al.* Cloning, expression and subcellular localization of the human homolog of p40MO15 catalytic subunit of CDKactivating kinase. *Oncogene*, 1994, 9:3127-3138.

DAY PJ., CLEASBY A., TICKLE IJ., O'REILLY M., COYLE JE., HOLDING FP., MCMENAMIN RL., YON J., CHOPRA R., LENGAUER C. and JHOTI H. Crystal Structure of Human CDK4 in complex with a D-type cyclin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2009, 106(11):4166-4170.

- DELMER A., AJCHENBAUM-CYMBALISTA F., TANG R., RAMOND S., FAUSSAT AM., MARIE JP. *et al.* Overexpression of cyclin D2 in chronic B-cell malignancies. *Blood*, 1995, 5:2870-2876.
- DENOIX PF. Enquête permanente dans les centres anticancéreux. *Bulletin de l'institut national d'hygiène*, 1946, 1:70-5.
- DIEHL JA. and COQUERET O. Linking cyclins to transcriptional control. *Gene*, 2002, 299:35-55.
- DIEP CH., DANIEL AR., MAURO LJ. KNUTSON TP., and LANGE CA. Progesterone action in breast, uterine, and ovarian cancers. *Journal of Molecular Endocrinology*, 2015, 54(2):R31-53.
- DOISNEAU-SIXOU SF., SERGIO CM., CARROLL JS. *et al.* Estrogen and antiestrogen regulation of cell cycle progression in breast cancer cells. *Endocrine-Related Cancer*, 2003, 10(2):179-186.
- DONNELLAN R. and CHETTY R. Cyclin D1 and human neoplasia. *Journal of Clinical and Molecular Pathology*, 1998, 51:1-7.
- DRESSING GE., KNUTSON TP., SCHIEWER MJ, DANIEL AR., HAGAN CR., DIEP CH., KNUDSEN KE. and LANGE CA. Progesterone Receptor–Cyclin D1 Complexes Induce Cell Cycle Dependent Transcriptional Programs in Breast Cancer Cells. *Molecular Endocrinology*, 2014, 28(4):442-457.
- DUBIK D. and SHIU RP. Mechanism of estrogen activation of c-myc oncogene expression. *Oncogene*, 1992, 7(8):1587-1594.
- DULIC V. Cycline E et cancer, une histoire de destruction. *Médecine/Sciences*, 2012, 18(3):282-284.
- DULIC V., LEES E. and REED SI. Association of human cyclin E with a periodic G1-S phase protein kinase. *Science*, 1992, 257:1958-1961.

E-G

- ELAMRANI A., KHYATTI M., BENHASSOU M., ATTALLEB M. et ENNAJI MOULAY M. Cancer du sein : Données Actuelles. *Scienelib Mersenne Editions*, 2013, 5:124-131.
- ELLEDGE SJ. Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis. *Science*, 1996, (274):1664-1672.
- ELSHEIKH S., GREEN AR., MOHAMMED AA., GRAINGE M., PAISH CE., LAMBROS MBK. *et al.* CCND1 amplification and Cyclin D1 expression in breast cancer and their relation with proteomic subgroups and patient outcome. *Breast Cancer Research Treatment*, 2008, 109(2):325-335.
- ELSTON CW. and ELLIS IO. Pathologic prognostic factors in breast cancer. The value of histological grades in breast cancer. Experience from a large study with long-term follow-up". *Histopathology*, 1991, 19(5):403-10.
- ELWOOD VJ. and CRAIG V. The Estrogen Receptor: A Model for Molecular Medicine. *Clinical cancer research*, 2003, (9)6:1980-9.
- FELTY Q., SINGH KP. and ROY D. Estrogen-induced G1/S transition of G0-arrested estrogen-dependent breast cancer cells is regulated by mitochondrial oxidant signaling. *Oncogene*, 2005, 24(31):4883-4893.
- FERGUSON NL., BELL J., HEIDEL R., *et al.* Prognostic value of breast cancer subtypes, Ki-67 proliferation index, age, and pathologic tumor characteristics on breast cancer survival in Caucasian women. *Breast*, 2013, 19(1):22-30.
- FINN RS., CROWN JP., LANG I., BOER K., BONDARENKO IM., KULYK SO. *et al.* The cyclin-dependent kinase 4/6 inhibitor palbociclib in combination with letrozole versus letrozole alone as first-line treatment of oestrogen receptor-positive, HER2-negative, advanced breast cancer (PALOMA-1/TRIO-18): a randomised phase 2 study. *The Lancet Oncology*, 2015, 16:25-35.
- FISHER RP. and MORGAN DO. A novel cyclin associates with MO15/CDK7 to form the CDK-activating kinase. *Cell*, 1994, 78:713-724.

- FOSTER JS., HENLEY DC., AHAMED S. and WIMALASENA J. Estrogens and cell-cycle regulation in breast cancer. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 2001, 12(7):320–327.
- FU M., RAO M., BOURAS T., WANG C., WU K., ZHANG X., LI Z., YAO TP. and PESTELL RG. Cyclin D1 inhibits peroxisome proliferator-activated receptor mediated adipogenesis through histone deacetylase recruitment. *Journal of Biological Chemistry*, 2005, 280:16934–16941.
- FU M., WANG C., LI Z., SAKAMAKI T. and PESTELL RG. MINIREVIEW: Cyclin D1: normal and abnormal functions. *Molecular Endocrinology*, 2004, 145:5439-5447.
- FU M., WANG C., RAO M. *et al.* Cyclin D1 represses p300 transactivation through a cyclin-dependent kinase-independent mechanism. *Journal of Biological Chemistry*, 2005, 280:29728–29742.
- GAILLARD A. la Cancérogenèse, un processus multi-étapes. *Editions Eska*, 2007, 65-69.
- GALLI S., LABATO MI., BAL DE KIER JOFFE E. *et al.* Decreased mitochondrial nitric oxide synthase activity and hydrogen peroxide relate persistent tumoral proliferation to embryonic behavior. *Cancer Research*, 2003, 63(19):6370–6377.
- GARCIA-AYALA A. and CHAVES-POZO E. Immunocytochemical Tools Reveal a New Research Field Between the Boundaries of Immunology and Reproductive Biology in Teleosts. *Applications of Immunocytochemistry*, 2012, 7:135-158.
- GIACINTI C. and GIORDANO A. RB and cell cycle progression. *Oncogene*, 2006, (25)38:5220–5227.
- GILLETT CE., LEE AH., MILLIS RR. and BARNES DM. Cyclin D1 and associated proteins in mammary ductal carcinoma in situ and atypical ductal hyperplasia. *The Journal of Pathology*, 1998, 184:396-400.
- GINESTIER C., KORKAVA H., DONTU G., BIRNBAUM D., WICHA MS. and CHARAFEA-JAUFFRET E. The cancer stem cell: the breast cancer driver. *Médecine/Sciences*, 2007, 23:1133-1139.
- GIULIANELLI S., MOLINOLI A. and LANARI C. Targeting progesterone receptors in breast cancer. *Vitamins and hormones*, 2013, 93:161–84.
- GLASSFORD J., HOLMAN M., BANERJI L., CLAYTON E., KLAUS G., TURNER M. and LAM EW-F. Vav is required for cyclin D2 induction and proliferation of Mouse B lymphocytes activated via the antigen receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276:41040-41048.
- GLOTZER M., MURRAY AW. and KIRSCHNER MW. Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature*, 1993, 349:132-138.
- GODDEN-KENT D., TALBOT SJ., BOSHOFF C., CHANG Y., MOORE P., WEISS RA. *et al.* The cyclin encoded by Kaposi's sarcoma-associated herpes virus stimulates CDK6 to phosphorylate the retinoblastoma protein and histone H1. *Journal of Virology*, 1997, 71:4193-4198.
- GOTO H., IZAWA I., LI P. and INAGAKI M. Novel regulation of checkpoint kinase 1: Is checkpoint kinase 1 a good candidate for anti-cancer therapy? *Cancer Science*, 2012, 103:1195–1200.
- GRANDVAUX N. La kinase IKK ϵ De l'oncogénèse à la résistance au traitement du cancer du sein. *Médecine/Sciences*, 2011, 27:619–625.
- GUEDJ M., MARISA L., DE REYNIES A. *et al.* A refined molecular taxonomy of breast cancer. *Oncogene*, 2011, 31(9):1196-206.
- GUIMARÃES E-P., CARLI M-L., SPERANDIO F-F., HANEMANN J-A-C. and PEREIRA A-A-C. Cyclin D1 and Ki-67 expression correlates to tumor staging in tongue squamous cell carcinoma. *Medicina Oral Patología Oral Y Cirugía Bucal*, 2015, 20(6):657–663.
- GUO JP., SHU SK., ESPOSITO NN. *et al.* IKK ϵ phosphorylation of estrogen receptor alpha Ser-167 and contribution to tamoxifen resistance in breast cancer. *Journal of Biological Chemistry*, 2010, 285:3676-3684.

- HAGTING A., JACKMAN M., SIMPSON K. and PINES J. Translocation of cyclin B1 to the nucleus at prophase require a phosphorylation-dependent nuclear import signal. *Current Biology*, 1999, 9:680-689.
- HALL M. and PETERS G. Genetic alterations of cyclins, cyclin-dependent kinases, and CDK inhibitors in human cancer. *Advances in Cancer Research*, 1996, 68:67-108.
- HALLDORSDOTTIR A. LUNDIN A., MURRAY F., MANSOURI L., KNUUTILA S., SUNDSTRÖM C. *et al.* Impact of TP53 mutation and 17p deletion in mantle cell lymphoma. *Leukemia*, 2011, 25(12):1904-1908.
- HAMARD C., MIGNARD X., PECUCHET N., MATHIOT N., BLONS H., LAURENT-PUIG P., LEROY K., LUPO A., CHAPRON J., GIRAUD F., ARRONDEAU J., GOLDWASSER F., ALIFANO M., DAMOTTE D. ET WISLEZ M. IHC, FISH, CISH, NGS dans les cancers bronchiques non à petites cellules : quelles évolutions dans l'ère des biomarqueurs ? *Revue de Pneumologie Clinique*, 2018, 74:327-338.
- HAMMOND M., HAYES DF., ALLRED DC., DOWSETT M., HAGERTY KL., BADVE S., FITZGIBBONS PL. *et al.* Recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 2010, 16:2784-2795.
- HANAHAN D. and WEINBERG RA. The hallmarks of cancer. *Cell*, 2000, 1:57-70.
- HANNA Z., JANKOWSKI M., TREMBLAY P., JIANG X., MILATOVICH A., FRANCKE U. *et al.* The Vin-1 gene, identified by provirus insertional mutagenesis, is the cyclin D2. *Oncogene*, 1993, 8:1661-1666.
- HARDCASTLE IR., GOLDING BT. and GRIFFIN RJ. Designing inhibitors of cyclin-dependent kinases. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 2002, 42:325-348.
- HARPER JW. and ELLEDGE SJ. The role of Cdk7 in CAK function, a retro retrospective. *Genes and Development*, 1998, 12(3):285-9.
- HARRIS J., STANFORD PM., SUTHERLAND K., OAKES SR., NAYLOR MJ., ROBERTSON FG., BLAZEK KD., KAZLAUSKAS M., HILTON HN., WITTLIN S., ALEXANDER WS., LINDEMAN GJ., VISVADER JE. and ORMANDY CJ. Socs2 and elf5 mediate prolactin-induced mammary gland development. *Molecular Endocrinology*, 2006, 20:1177-1187.
- HARVEY JM., CLARK GM., OSBORNE CK. *et al.* Estrogen receptor status by immunohistochemistry is superior to the ligand- binding assay for predicting response to adjuvant endocrine therapy in breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 1999, 17(5):1474-1481.
- HATAKEYAMA M., BRILL JA., FINK GR. and WEINBERG RA. Collaboration of G1 cyclins in the functional inactivation of the retinoblastoma protein. *Genes and Development*, 1994, 8:1759-1771.
- HIROYUKI Y., JULIAN G., HIRO M. and TIM H. Cell Cycle-Regulated Recognition of the Destruction Box of Cyclin B by the APC/C in Xenopus Egg Extracts. *Molecular Cell*, 2004, (13)1:137-147.
- HOUDEBINE LM. Action des hormones dans le développement de la glande mammaire. Reproduction humaine et hormones. *Editions Eska*, 1993, 6:483-494.
- HUANG W., NIE W., ZHANG W., WANG Y., ZHU A. and GUAN X. The expression status of TRX, AR, and cyclin D1 correlates with clinicopathological characteristics and ER status in breast cancer. *Onco Targets and Therapy*, 2016, 9:4377-4385.
- HUNTER T. and PINES J. Cyclins and cancer II: cyclin D and CDK inhibitors come of age. *Cell*, 1994, 79:573-582.
- HWANG TS., HAN HS., HONG YC., LEE HJ. and PAIK NS. Prognostic value of combined analysis of cyclin D1 and estrogen receptor status in breast cancer patients. *Pathology International*, 2003, 53:74-80.

INABA T., MATSUSHIME H., VALENTINE M., ROUSSEL MF., SHERR CJ. and LOOK AT. Genomic organization, chromosomal localization, and independent expression of human cyclin D genes. *Genomics*, 1992, 13:565-574.

J-K

- JACK TZ. and SCOTT WL. Tumor Suppressive Functions of p53. Cold Spring Harbor Laboratory. *Press*, 2009, 1(5):a001883.
- JACOBSEN BM., and HORWITZ KB. Progesterone receptors, their isoforms and progesterone regulated transcription. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2012, 357:18-29.
- JANSSEN YM., MATALON S. and MOSSMAN BT. Differential induction of c-fos, c-jun, and apoptosis in lung epithelial cells exposed to ROS or RNS. *American Journal of Physiology*, 1997, 273(4 Part 1):L789–796.
- JEANTEUR P. La conformation fonctionnelle du P53 est régulée par la prolyl-isomérase Pin1. *Bulletin du cancer*, 2002, 89(12).
- JEANTEUR P. Un nouveau gène suppresseur de tumeur ? RB1CC1, un gène inducteur en amont de Rb, est fréquemment muté dans les cancers du sein. *Bulletin du cancer*, 2002, 89(9).
- JINPING L. ZHEN LIN Z. DAMAO H., NA T., YUEJIN L., ZHENGKE P., CHENGRONG L., ZIGANG D. and FAQING T. Cdk3-promoted epithelial-mesenchymal transition through activating AP-1 is involved in colorectal cancer metastasis. *Oncotarget*, 2016, 7(6):7012–7028.
- JIRAWATNOTAI S., HU Y., MICHOWSKI W., ELIAS JE., BECKS L., BIENVENUE F., ZAGOZDZON A., GOSWAMI T., WANG YE., CLARK AB. and KUNKEL TA. A function for cyclin D in DNA repair uncovered by protein interactome analyses in human cancer. *Nature*, 2011 474:230-234.
- JIRSTROM K., STENDAHL M. RYDEN L. *et al.* Adverse effect of adjuvant tamoxifen in premenopausal breast cancer with cyclin D1 gene amplification. *Cancer Research*, 2005, 65(17):8009–8016.
- JONES BA., KASL SV., HOWE CL., LACHMAN M., DUBROW R., CURNEN MM. *et al.* African-American/White differences in breast carcinoma: p53 alterations and other tumor characteristics. *Cancer*, 2004, 101:1293–1301.
- KAURANIEMI P., KUUKASJARVI T., SAUTER G. and KALLIONIEMI A. Amplification of a 280-kilobase core region at the ERBB2 locus leads to activation of two hypothetical proteins in breast cancer. *The American Journal of Pathology*, 2009, 163(5):1979-84.
- KEILTY D., BUCHANAN M., NTAPOLIAS K., ALEYNIKOVA O., TU D., LI X., SHEPHERD L., BRAMWELL V. and BASIK M. RSF1 and Not Cyclin D1 Gene Amplification May Predict Lack of Benefit from Adjuvant Tamoxifen in High-Risk Pre-Menopausal Women in the MA.12 Randomized Clinical Trial. *PLoS ONE*, 2013, 8(12):817-30.
- KENNY FS., HUI R., MUSGROVE EA., GEE JM., BLAMEY RW., NICHOLSON RI. *et al.* Overexpression of cyclin D1 messenger RNA predicts for poor prognosis in estrogen receptor-positive breast cancer. *Clinical Cancer Research*, 1999, 5:2069–76.
- KESAVAPANY S., LI BS. AMIN N., ZHENG YL., GRANT P., and PANT HC. Neuronal cyclin-dependent kinase 5: role in nervous system function and its specific inhibition by the Cdk5 inhibitory peptide. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2004, 1697:143-153.
- KIM JJ., KURITA T. and BULUN SE. Progesterone action in endometrial cancer, endometriosis, uterine fibroids, and breast cancer. *Endocrine reviews*, 2013, 34:130-162.
- KING RW., PETERS JM., TUGENDREICH S., ROLFE M., HIETER P. and KIRSCHNER MW. A 20S complex containing CDC27 and CDC16 catalyzes the mitosis-specific conjugation of ubiquitin to cyclin B. *Cell*, 1995, 81:279-288.

- KNUDSEN KE., DIEHL JA., HAIMAN C. and KNUDSEN ES. Cyclin D1: Polymorphism, aberrant splicing and cancer risk. *Oncogene*, 2006, 25(11):1620-8.
- KOBAYASHI H., STEWART E., POON R., ADAMCZEWSKI JP., GANNON J. and HUNT T. Identification of the domains in cyclin A required for binding to, and activation of, p34cdc2 and p32CDK2 protein kinase subunits. *Molecular Biology of the Cell*, 1992, 3:1279-1294.
- KOFF A., CROSS F., FISHER A., SCHUMACHER J., LEGUELLEC K., PHILIPPE M. et al. Human cyclin E, a new cyclin that interacts with two members of the CDC2 gene family. *Cell*, 1991, 66:1217-28.
- KUBISTA M., ROSNER M., KUBISTA E., BERNASCHEK G. and HENGSTSCHLAGER M. Brca1 regulates in vitro differentiation of mammary epithelial cells. *Oncogene*, 2002, 21(31):4747-56.
- KUNTZ G. and O'CONNELL M. Prognostic value of CCND1 gene status in sporadic breast tumours, as determined by real-time quantitative PCR assays. *British Journal of Cancer*, 2011, 86:580-586.

L

- LAMB J., LADHA MH., MCMAHON C., SUTHERLAND RL. ET EWEN ME. Regulation of the functional interaction between cyclin D1 and the estrogen receptor. *Molecular Biology of the Cell*, 2000, 20:8667-8675.
- LEE K., JEONG J., TSAI MJ., TSAI S., LYDON JP. and DEMAYO FJ. Molecular mechanisms involved in progesterone receptor regulation of uterine function. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 2006, 102:41-50.
- LEE RJ., ALBANESE C., FU M., et al. Cyclin D1 is required for transformation by activated Neu and is induced through an E2F-dependent signaling pathway. *Molecular and Cellular Biology*, 2000, 20:672-683.
- LEES E., FAHA B., DULIC V., REED SI. and HARLOW E. Cyclin E/CDK2 and cyclin A/CDK2 kinases associate with p107 and E2F in a temporally distinct manner. *Genes and Development*, 2002, 6:1874-1885.
- LEES EM. and HARLOW E. Sequences within the conserved cyclin box of human cyclin A are sufficient for binding to and activation of cdc2 kinase. *Molecular and Cellular Biology*, 1993, 13:1194-1201.
- LEHN S., TOBIN NP., BERGLUND P., NILSSON K., SIMS AH., JIRSTROM K., HARKONEN P., LAMB R. and LANDBERG G. Down-regulation of the oncogene cyclin D1 increases migratory capacity in breast cancer and is linked to unfavorable prognostic features. *The American Journal of Pathology*, 2010, 177:2886-2897.
- LESLI EK., LANG C., DEVGAN G., AZARE J., BERISHAJ M., GERALD W., KIM YB., PAZ K., DAMELL JE., ALBANESE C., SAKAMAKI T., PESTELL R. and BROMBERG J. Cyclin D1 is transcriptionally regulated by and required for transformation by activated signal transducer and activator of transcription 3. *Cancer Research*, 2006, 66:2544-2552.
- LESUR Y., KESSLER J. et VERHAEGHE L. Sein, hormones et antihormones, *Nancy*, In: DaTeBe editor, 2004, 66-69.
- LI Z., CUI J., YU Q., WU X., PAN A. and LI L. Evaluation of CCND1 amplification and CyclinD1 expression: diffuse and strong staining of CyclinD1 could have same predictive roles as CCND1 amplification in ER positive breast cancers. *American Journal of Translational Research*, 2016, 8(1):142-153.
- LI API A., SARIVALASIS A., SOZZI WJ., LELIEVRE L. et ZAMAN K. Cancer du sein de stade précoce : la désescalade thérapeutique sélective. *Revue médicale suisse*, 2017, 13:1035-1038.
- LIM S., and KALDIS P. Cdks, cyclins and CKIs: roles beyond cell cycle regulation. *Development Cambridge England*, 2013, 140:3079-3093.

- LIN HM., ZHAO L. and CHENG SY. Cyclin D1 is a ligand-independent co-repressor for thyroid hormone receptors. *Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277:28733–28741.
- LING-LING G., PENG G., YA-GUANG W., WEN-CHENG J., CHUN-YAN H., HONG L. *et al.* Alteration of Cyclin D1 in Chinese Patients with Breast Carcinoma and its Correlation with Ki-67, pRb, and p53. *Archives of Medical Research*, 2007, 38(8):846-852.
- LIYING G., DILIMINA Y., LITING S., SHA L. and FANGJING M. Association among the expression of β -catenin, cyclin D1 and estrogen receptor- β in human breast cancer. *Experimental And Therapeutic Medicine*, 2015, 10:1423-1428.
- LONGACRE TA. and BARTOW SA. A correlative morphologic study of human breast and endometrium in the menstrual cycle. *American Journal of Surgical Pathology*, 1986, 10:382-393.
- LOYER P., TREMBLEY JH., KATONA R., KIDD VJ. and LAHTI JM. Role of CDK/cyclin complexes in transcription and RNA splicing. *Cellular signaling*, 2005, 17:1033-1051.
- LUKAS C., BARTKOVA J., WELKER M., PETERSON OW., PETERS G., STRAUSS M. and BARTEK J. Cyclin D2 is a moderately oscillating nucleus protein required for G1 phase progression in specific cell types. *Oncogen*, 1995, 2125-2134.
- LUKAS J., JADAYEL D., BARTOKVAJ., NACHEVA E., DYER MJS., STRAUSS M. and BARTEK J. BCL-1/cyclin D1 oncoprotein oscillates and subverts the G1 phase control in B-cell neoplasms carrying the t(11;14) translocation. *Oncogene*, 1994, 9:2159-2167.
- LUKAS J., PAGANO M., STAKOVA Z., DRAETTA G. and BATEK J. Cyclin D1 protein oscillates and is essential for cell cycle progression in human tumour cell lines. *Oncogene*, 1994, 9:707-718.
- LUNDGREN K., BROWN M., PINEDA S., CUZICK J., SALTER J., ZABAGLO L., HOWELL A., DOWSETT M., LANDBERG G. and TRANS AI. Effects of cyclin D1 gene amplification and protein expression on time to recurrence in postmenopausal breast cancer patients treated with anastrozole or tamoxifen: a TransATAC study. *Breast Cancer Research and Treatment*, 2012, 14(2):R57.

M

- MALUMBRES M. and BARBACID M. Mammalian cyclin-dependent kinases. *Trends in biochemical sciences*, 2005, 30:630-641.
- MANGELSDORF DJ., THUMMEL C., BEATO M., HERRLICH P., SCHUTZ G., UMESONO K., BLUMBERG B., KASTNER P., MARK M., CHAMBON P. *et al.* The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell*, 1995, 83:835-839.
- MASSAGUE J. G1 cell-cycle control and cancer. *Nature*, 2004, 432(7015):298–306.
- MASUDA JP., BARNES DM. and GILLETT CE. Cyclin D1 in breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 2011, 52:1-15.
- MATSUSHIME H., QUELLE DE., SHURTLEFF SA., SHIBUYA M., SHERR CJ. and KATO JY. D-type cyclin-dependent kinase activity in mammalian cells. *Molecular and Cellular Biology*, 1994, 14:2066-2076.
- MEIJER L. Le cycle de division cellulaire et sa régulation. *Bulletin du cancer*, 2006, vol 93.
- MEYERSON M. and HARLOW E. Identification of G1 kinase activity for CDK6, a novel cyclin D partner. *Molecular and Cellular Biology*, 1994, 14:2077-2086.
- MICHALIDES R., HAGEMAN P., VAN-TINTEREN H., HOUBEN L., WIENTJENS E., KLOMPMAKER R. *et al.* A clinicopathological study on overexpression of cyclin D1 and of p53 in a series of 248 patients with operable breast cancer. *British Journal of Cancer*, 1996, 73:728–34.
- MOHAMEDALI A., SOEIRO I., LEA NC., GLASSFORD J., BANELJI L. MUFTI GJ., LAM EW. and THOMAS. NS. Cyclin D2 controls B cell progenitor numbers. *Journal of Leukocyte Biology*, 2003, 74:1139-1143.

- MORGAN DO. Cell Cycle: Principles of Control. *Yale Journal of Biology and Medicine*, 2007, 80(3):141–142.
- MORGAN DO. Principles of CDK regulation. *Nature*, 1995, 374:131-134.
- MOTOKURA F., JACKSON PA. and PAGANO M. Repeat instability ; mechanisms of dynamic mutations. *Nature Reviews Genetics*, 2005, 6:729-742.
- MOTOKURA T., BLOOM T., KIM HG. *et al.* A novel cyclin encoded by a bcl1-linked candidate oncogene. *Nature*, 1991, 350(6318):512–515.
- MRHALOVA M., KODET R. and STRNAD P. Invasive ductal carcinoma of the breast: study of the number of copies of the CCND1 gene and chromosome 11 using fluorescence in situ hybridization (FISH) in comparison with expression of cyclin D1 protein and estrogen receptors (ER alpha) with immunohistochemical detection. *Casopis Lékru Českých*, 2002, 141(22):708–714.
- MURRAY AW. Creative blocks: cell cycle checkpoints and feedback controls. *Nature*, 1992, 359:599–604.
- MURRAY AW. and MARKS D. Can sequencing shed light on cell cycling? *Nature*, 2001, 409:844-846.
- MUSGROVE EA., CALDON CE., BARRACLOUGH J., STONE A. and SUTHERLAND L. Cyclin D1 as a therapeutic target in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 2011, 11:558-572.

N-P

- NAIDU R., WAHAB NA., YADAV MM. and KUTTY MK. Expression and amplification of cyclin D1 in primary breast carcinomas: relationship with histopathological types and clinico-pathological parameters. *Oncology Reports*, 2002, 9:409-416.
- NEUMAN E., LADHA MH., LIN N. UPTON TM., MILLER SJ., DIRENZO J. *et al.* Cyclin D1 stimulation of estrogen receptor transcriptional activity independent of CDK4. *Molecular and Cellular Biology*, 1997, 17(9):5338–5347.
- NIGG EA. Cyclin-dependent protein kinases: key regulators of the eukaryotic cell cycle. *BioEssays*, 1995, 17:471-480.
- NIGG EA. Mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2001, 2:21-32.
- NILSSON I. and HOFFMANN I. Cell cycle regulation by the Cdc25 phosphatase family. *Progress in Cell Cycle Research*, 2000, 4:107-114.
- NURSE P. A long twentieth century of the cell cycle and beyond. *Cell*, 2000, 100(1):71-8.
- NURSE P. and ORDERING F. S phase and M phase in the cell cycle. *Cell*, 1994, 79:547-550.
- OHTSUBO M., THEODORAS AM., SCHUMACHER J., ROBERTS JM. and PAGANO M. Human cyclin E, a nuclear protein essential for the G1-to-S phase transition. *Molecular and Cellular Biology*, 1995, 15:2612-2624.
- OLIMID DA., SIMIONESCU CE., MĂRGĂRITESCU CL. and FLORESCU A. Immunoexpression of Ki67 and cyclin D1 in oral squamous carcinomas. *Romanian Journal of Morphology and Embryology*, 2012, 53(3):795–798.
- OSBORNE C., WILSON P. et TRIPATHY D. Oncogenes and tumor suppressor genes in breast cancer: potential diagnostic and therapeutic applications. *Oncologist*, 2004, 9:361-377.
- PARK KJ., KRISHNAN V., O'MALLEY BW. *et al.* Formation of an IKKalpha-dependent transcription complex is required for estrogen receptor-mediated gene activation. *Molecular Cell*, 2005, 18:71–82.
- PAUL S. et REGULIER E. Bases moléculaires de l'oncogenèse. *Annales de biologie clinique*, 2001, 59(4):393-402.

- PAVELIC K. and GALL-TROSELJ K. Recent advances in molecular genetics of breast cancer. *Journal of Molecular Medicine*, 2001, 79(10):566-73.
- PESTELL RG., ALBANESE C., REUTENS AT., SEGALL JE., LEE RJ. and ARNOLD A. The cyclins and cyclin-dependent kinase inhibitors in hormonal regulation of proliferation and differentiation. *Endocrine Reviews*, 1999, 20:501–534.
- PETRE-DRAVIAM CE., WILLIAMS EB., BURD CJ. *et al.* A central domain of cyclin D1 mediates nuclear receptor corepressor activity. *Oncogene*, 2005, 24:431–444.
- PINES J. and HUNTER T. Human cyclins A and B1 are differentially located in the cell and undergo cell cycle-dependent nuclear transport. *Journal of Cell Biology*, 2004, 115:1-17.
- PINES J. and HUNTER T. The differential localization of human cyclins A and B is due to a cytoplasmic retention signal in cyclin B. *The EMBO Journal*, 1994, 13:3772-3781.
- PINES J. Cyclins and cyclin-dependent kianse: a biochemical view. *Biochemical Society Transactions*, 2005, 308:679-711
- PINES J. Cyclins and their associated cyclin-dependent kinases in the human cell cycle. *Biochemical Society Transactions*, 1998, 21:921-5.
- PISCOPO DM. And HINDS PW. A role for the cyclin box in the ubiquitin-mediated degradation of cyclin G1. *Cancer Research*, 2008, 68(14):5581–5590.
- POLLEY MC., LEUNG SCY., MCSHANE LM., GAO D., HUGH JC., MASTROPASQUA MG. *et al.*, on behalf of the International Ki67 in Breast Cancer Working Group of the Breast International Group and North American Breast Cancer Group. An International Ki67 Reproducibility Study. *Journal of the National Cancer Institute*, 2013, (105)24:1897-1906.
- POMMIER Y. et KOHN KW. Cycle cellulaire et points de contrôle en oncologie: nouvelle cibles thérapeutiques. *Médecine/Sciences*, 2003, 19(2):173-186.
- PONTANO S. and SCHUURING E. The involvement of the chromosome 11q13 region in human malignancies: Cyclin D1 and EMS1 are two new candidate oncogenes: a review. *Gene*, 2008, 159:83-96.
- PRALL OW., ROGAN EM., MUSGROVE EA. *et al.* c-Myc or cyclin D1 mimics estrogen effects on cyclin E-CDK2 activation and cell cycle reentry. *Molecular and Cellular Biology*, 1998, 18(8):4499–4508.
- PRALL OW., SARCEVIC B., MUSGROVE EA. *et al.* Estrogen-induced activation of CDK4 and CDK2 during G1-S phase progression is accompanied by increased cyclin D1 expression and decreased cyclin-dependent kinase inhibitor association with cyclin E-CDK2. *Journal of Biological Chemistry*, 1997, 272(16):10882–10894.

Q-R

- QUELLE DE., ASHMUN RA., SHURTLEFF SA., KATO JY., BAR-SAGI D., ROUSSEL MF, and SHERR CJ. Overexpression of mouse D-type cyclins accelerates G1 phase in rodent fibroblasts. *Genes and Development*, 1993, 7(8):1559-1571.
- RAMAN V., MARTENSEN SA., REISMAN D., EVRON E., ODENWALD WF., JAFFEE E., MARKS J. and SUKUMAR S. Compromised HOXA5 function can limit p53 expression in human breast tumours. *Nature*, 2000, 405(6789):974-8.
- RANE SG., DUBUS P., METTUS RV., GALBREATH EJ., BODEN G., REDDY EP. *et al.* Loss of Cdk4 expression causes insulin-deficient diabetes and Cdk4 activation results in beta-islet cell hyperplasia. *Nature Genetics*, 1999, 22:44-52.
- RAVIKUMAR G. and ANANTHAMURTHY A. Cyclin D1 expression in ductal carcinoma of the breast and its correlation with other prognostic parameters. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, 2014, 10(3):671-5.

- REID SE., MURTHY MS., KAUFMAN M. and SCANLON EF. Endocrine and paracrine hormones in the promotion, progression and recurrence of breast cancer. *British Journal of Surgery*, 1996, 83:1037-1046.
- REIS-FILHO JS., SAVAGE K., LAMBROS MB. *et al.* Cyclin D1 protein overexpression and CCND1 amplification in breast carcinomas: an immunohistochemical and chromogenic in situ hybridization analysis. *Modern Pathology*, 2006, 19(7):999–1009.
- REN B., CAM H., TAKAHASHI Y. *et al.* E2F integrates cell cycle progression with DNA repair, replication, and G(2)/M checkpoints. *Genes and Development*, 2002, 16:245-256.
- REN S. and ROLLINS BJ. Cyclin C/cdk3 promotes Rb-dependent G0 exit. *Cell*, 2004, 117:239-251.
- RENNSTAM K., BALDETORP B., KYTOLA S. *et al.* Chromosomal rearrangements and oncogene amplification precede aneuploidization in the genetic evolution of breast cancer. *Cancer Research*, 2001, 61:1214-1219.
- RESNITZKY D., GOSSEN M., BUJARD H. and REED SI. Acceleration of the G1/S phase transition by expression of cyclins D1 and E with an inducible system. *Molecular and Cellular Biology*, 1994, 14:1669-1679.
- ROSEN E., FAN M., PESTELL S. and GOLDBERG R. BRCA1 gene in breast cancer. *Journal of Cellular Physiology*, 2003, 196(1):19-41.
- ROSENBERG AR., ZYNDY F., LE DEIST F., MOULY H., MÉTÉZEAU P., BRÉCHOT C. *et al.* Overexpression of human cyclin A advances entry into S phase. *Oncogene*, 1995, 10:1501-1509.
- ROY LM., SWENSON KI., WALKER DH., GABRIELLI BG., LI RS., PIWNICA- WORMS H. *et al.* Activation of p34cdc2 kinase by cyclin A. *Journal of Cell Biology*, 1991, 113:507-514.
- ROY PG. and THOMPSON AM. Cyclin D1 and breast cancer. *The Breast*, 2006, 15:718–727.
- ROY PG., PRATT N., PURDIE CA., BAKER L., ASHFIELD A., QUINLAN P. *et al.* High CCND1 amplification identifies a group of poor prognosis women with estrogen receptor positive breast cancer. *International Journal of Cancer*, 2010, 127:355–360.
- RUBIO MF., FERNANDEZ PN., ALVARADO CV., PANERO LC., GRECCO MR., COLO GP., MARTINEZ-NOEL GA., MICENMACHER SM. and COSTAS MA. Cyclin D1 is an NF-KappaB corepressor. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2012, 1823:1119-1131.
- RUI H., DJEU J., EVANS GA., KELLY PA. and FARRAR WL. Prolactin receptor triggering: evidence for rapid tyrosine kinase activation. *Journal of Biological Chemistry*, 1992, 267(33):24076.
- RUSSO J. et RUSSO I. The Breast as a developing organ. Molecular Basis of Breast Cancer. Prevention and treatment, *Springer Heidelberg, Germany*, 2004, 20:51-59.
- RUSSO J., BOHENZKY RA., CHIEN MC., CHEN J., YAN M., MADDALENA D. *et al.* Nucleotide sequence of the Kaposi sarcoma-associated herpesvirus (HHV8). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1996, 93:14862-14867.

S

- SABBAH M., COURILLEAU D., MESTER J. and REDEUILH G. Estrogen induction of the cyclin D1 promoter: involvement of a cAMP response-like element. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1999, 96(20):11217–11222.
- SADEGHI N. and GERBER DE. Targeting the PI3K pathway for cancer therapy Future. *Medicinal Chemistry*, 2012, 4(9):1153–1169.
- SAGE J. The retinoblastoma tumor suppressor and stem cell biology. *Genes and development*, 2012, 26:1409–1420.

- SAID TK., CONNEELY OM., MEDINA D. *et al.* Progesterone, innaddition to estrogen, induces cyclin D1 expression in the murine mammary epithelial cell, *in vivo*. *Endocrinology*, 1997, 138(9):3933–3939.
- SALOMON A. HER2 et cancers du sein. *Correspondances en Onco-Théranostic*, 2012, Vol. I N°2.
- SANTANU S., ADITYA K., JAYANTA B., RAJARSHI G., and KASHI ND. Correlation between cyclin D1 expression and standard clinicopathological variables in invasive breast cancer in Eastern India. *South Asian Journal of Cancer*, 2015, 4(4):155–159.
- SENDEROWICZ AM. and SAUSVILLE EA. Preclinical and clinical development of cyclin dependent kinase modulators. *Journal of the National Cancer Institute*, 2000, (92):376-387.
- SETO M., YAMAMOTO K., LIDA S., AKAO Y., UTSUMI KR., KUBONISHI I. *et al.* Gene rearrangement and overexpression of PRAD1 in lymphoid malignancy with t(11;14)(q13;q32) translocation. *Oncogene*, 1992, 7:1401-6.
- SHEN M., CAWTHON R., ROTHMAN N., WEINSTEIN SJ., VIRTAMO J., HOSGOOD HD., HU W., LIM U., ALBANES D. and LAN QA. Prospective Study of Telomere Length Measured by Monochrome Multiplex Quantitative PCR and Risk of Lung Cancer. *Lung Cancer*, 2011, 73(2):133-137.
- SHERR CJ. Cancer cell cycles. *Science*, 1996, (274):1672-1677.
- SHERR CJ. Mammalian G1 cyclins and cell cycle progression. *Proceedings of the Association of American Physicians*, 1995, 107(2):181–186.
- SHEVRA CR., GHOSH A. and KUMAR M. Cyclin D1 and Ki-67 expression in normal, hyperplastic and neoplastic endometrium. *Journal of Postgraduate Medicine*, 2015, 61(1):15–20.
- SHOKER BS., JARVIS C., DAVIES MPA., IQBAL M., SIBSON DR. and SLOANE JP. Immunodetectable cyclin D1 is associated with oestrogen receptor but not Ki67 in normal, cancerous and precancerous breast lesions. *British Journal of Cancer*, 2001, 84(8):1064–1069.
- SINCLAIR AJ., PALMERO I., PETERS G. and FARRELL PJ. EBNA-2 and EBNA-LP cooperate to cause G0 to G1 transition during immortalization of resting human B lymphocytes by Epstein-Barr virus. *The EMBO Journal*, 2004, 13:3321-3328.
- SMITH DS. and TSAI LH. Cdk5 behind the wheel: a role in trafficking and transport? *Trends in Cell Biology*, 2002, 12(1):28-36.
- STAAF J., JONSSON G., RINGNER M. *et al.* High-resolution genomic and expression analyses of copy number alterations in HER2- amplified breast cancer. *Breast Cancer Research*, 2010, 12(3):R25.
- STEELE RJ. and LANE DP. p53 in cancer: a paradigm for modern management of cancer. *Surgeon*, 2005, 3:197–205.
- STENDAHL M., KRONBLAD A., RYDÉN L., EMDIN S., BENGTSSON NO. and LANDBERG G. Cyclin D1 overexpression is a negative predictive factor for tamoxifen response in postmenopausal breast cancer patients. *British Journal of Cancer*, 2004, 90:1942–1948.
- SUDAKIN V., GANOTH D., DAHAN A., HELLER H., HERSHKO J., LUCA FC. *et al.* The cyclosome, a large complex containing cyclin-selective ubiquitin ligase activity, targets cyclins for destruction at the end of mitosis. *Molecular Biology of the Cell*, 1995, 6:185-197.
- SUTHERLAND RL., HAMILTON JA., SWEENEY KJE., WATTS CKW. and MUSGROVE EA. Expression and regulation of cyclin genes in breast cancer. *Acta Oncologica*, 1995, 34:651–656.
- SWANTON C., CARD GL., MANN D., MCDONALD N. and JONES N. Overcoming inhibitions : subversion of CKI function by viral cyclins. *Trends in Biochemical Sciences*, 1999, 24:116-120.

- TAKANO Y., KATO Y., VAN DIEST PJ., MASUDA M., MITOMI H. and OKAYASU I. Cyclin D2 Overexpression and Lack of p27 COITelate Positively and Cyclin E Inversely with a Poor Prognosis in Gastric Cancer Cases. *The American Journal of Pathology*, 2000, 156:585-94.
- TAKEUCHI S., BARTRAM CR., SERIU T., MILLER CW., TOBLER A., JANSSEN JW. *et al.* Analysis of a family of cyclin-dependent kinase inhibitors : p15/MTS2/INK4B, p16/MTS1/INK4A, and p18 genes in acute lymphoblastic leukemia of childhood. *Blood*, 1995, 86:755-760.
- TAVASSOLI FA. Normal development and anomalies. Pathology of the breast. *Appleton and Lange*, 1992, 1-24
- THIERRY AR. et TANOS R. La biopsie liquide : Une voie possible pour le dépistage du cancer. *Médecine/Sciences*, 2018, 34:824-832.
- THOMAS C. and GUSTAFSSON JA. Estrogen receptor mutations and functional consequences for breast cancer. Trends in endocrinology and metabolism: *Nature Reviews Cancer*, 2015, 11:597-608.
- TOBIN NP. and BERGH J. Analysis of Cyclin D1 in Breast Cancer: A Call to Arms. *Current Breast Cancer Reports*, 2012, 4:171-173.
- TONG W. and POLLARD JW. Progesterone inhibits estrogen-induced cyclin D1 and CDK4 nuclear translocation, cyclin E- and cyclin A-CDK2 kinase activation, and cell proliferation in uterine epithelial cells in mice. *Molecular and Cellular Biology*, 1999, 19(3):2251-2264.
- TREDAN O., BARTHELEMY P., VILLANUEVA C. et TEIXEIRA L. Le cycle cellulaire : données biologiques et thérapies ciblant les cyclines/CDK. *Correspondances en Onco-Théranostic*, 2017, vol VI (1).
- TSAI LH., LEES E., FAHA B., HARLOW E. and RIABOWOL K. The CDK2 kinase is required for the G1-to-S transition in mammalian cells. *Oncogene*, 1993, 8:1593-1602.
- TUT VM., BRAITHWAITE KL., ANGUS B., NEAL DE., LUNEC J. and MELLON JK. Cyclin D1 expression in transitional cell carcinoma of the bladder: correlation with p53, waf1, pRb and Ki67. *British Journal of Cancer*, 2001, 84(2):270-275.

V-Z

- VANARSDALE T., BOSHOFF C., ARNDT KT. and ABRAHAM RT. Molecular Pathways: Targeting the Cyclin D-CDK4/6 Axis for Cancer Treatment. *Clinical Cancer Research*, 2015, 21(13):2905-10.
- VIGNERON R., FORNARO M. and STELLA M. Cyclin D1 gene contains a cryptic promoter that is functional in human cancer cells. *Gene Chromosomes and Cancer*, 2008, 31:209-220.
- VOGEL PM., GEORGIADE NG. and FETTER BF. The correlation of histologic changes in Inhibition of breast cancer growth. *Journal of the National Cancer Institute*, 1992, (84):38-42.
- WANG C., FAN S., LI Z. *et al.* Cyclin D1 antagonizes BRCA1 repression of estrogen receptor -activity. *Cancer Research*, 2005, 65:6557-6567.
- WARGON V., RIGGIO M., GIULIANELLI S., SEQUEIRA GR., ROJAS P., MAY M., POLO ML. *et al.* Progestin and antiprogestin responsiveness in breast cancer is driven by the PRA/PRB ratio via AIB1 or SMRT recruitment to the CCND1 and MYC promoters. *International Journal of Cancer*, 2015, 136(11):2680-2692.
- WATANABE C. and ROBBINS PD. differential regulation of EF2 and SP1 mediated transcription by G1 cyclins. *Oncogene*, 1998, 10:221-228.
- WELBOREN WJ., VAN DRIEL MA., JANSSEN-MEGENS EM., VAN HEERINGEN SJ., SWEEP F., SPAN PN. and HENDRIK G. Stunnenberg ChIP-Seq of ER α and RNA polymerase II defines genes differentially responding to ligands. *The EMBO Journal*, 2009, 28(10):1418-1428.

- YAN J., MATSUSHIME H., ROUSSEL MF., ASHMUN RA. *et al.* Colony-stimulating factor 1 regulates novel cyclins during the G1 phase of the cell cycle. *Cell*, 2012, 65:701-713.
- YANG C., CHEN L., LI C., LYNCH MC., BRISKEN C. and SCHMIDT EV. Cyclin D1 Enhances the Response to Estrogen and Progesterone by Regulating Progesterone Receptor Expression. *Molecular and Cellular Biology*, 2010, 30(12):3111.
- YANG C., TRENT S., IONESCU-TIBA V., LAN L., SHIODA T., SGROI D. and SCHMIDT EV. Identification of cyclin D1- and estrogen-regulated genes contributing to breast carcinogenesis and progression. *Cancer Research*, 2006, 66:11649–11658.
- YU Q., ROSE JH., ZHANG H. and POMMIER Y. Antisense inhibition of Chk2/hCds1 expression attenuates DNA damage-induced S and G2 checkpoints and enhances apoptotic activity in HEK-293 cells. *FEBS Letters*, 2001, 505:7-12.
- YU S., LAMB J., RAMASWAMY S., FORD HL. *et al.* A mechanism of cyclin D1 action encoded in the patterns of gene expression in human cancer. *Cell*, 2003, 114:323-334.
- ZHANG X., ZHAO M., HUANG AY., FEI Z., ZHANG W. and WANG XL. The effect of cyclin D expression on cell proliferation in human gliomas. *Journal of Clinical Neuroscience*, 2005, 12:166-168.
- ZWIJSEN RM., BUCKLE RS., HIJMANS EM., LOOMANS CJM. and BERNARDS R. Ligand-independent recruitment of steroid receptor coactivators to estrogen receptor by cyclin D1. *Gene and Development*, 1998, 12(22):3488–98.
- ZWIJSEN RM., WIENTJENS E., KLOOMPMAKER R. *et al.* CDK independent activation of estrogen receptor by cyclin D1. *Cell*, 1997, 88(3):405–415.

ANNEXES

Cyclin D1 overexpression in Algerian breast cancer women: Correlation with CCND1 amplification and clinicopathological parameters.

Journal: *African Health Sciences* - Manuscript ID WK0-2017-10-0801.R1

Manuscript Type: Original Article

Date Submitted by the Author: 24-Jul-2018

Complete List of Authors: Latifa, MOHAMMEDI; Fatima, Djilali doula Farida, Mesli; Rachid, Senhadji.

University of Oran 1 Ahmed Ben Bella, BP 1524 El M'naouer, Oran 31000, Algeria, Nature and Life Sciences Faculty.

Abstract

Background: Cyclin D1 which is associated with cell cycle regulation is solidly established as an oncogene with an important pathogenetic role in breast carcinomas.

Objectives: The aim of this study is to relate the Cyclin D1 protein overexpression with the amplification of its gene CCND1 in Estrogen Receptors (ER) positive breast carcinomas, in order to investigate the prognostic effect of their aberrations in relation to ER status, also to correlate the Cyclin D1 overexpression with other prognostic parameters.

Materials and methods: Chromogenic *in situ* hybridization (CISH) was used to identify CCND1 amplification on formalin-fixed paraffin-embedded invasive ductal carcinoma, in which immunohistochemistry (IHC) had previously been performed in order to evaluate the pathological relevance of Cyclin D1 overexpression in human breast cancer (n=138).

Results: CCND1 amplification was identified in 17/138 (12.3%) tumors and 78/138 (56.5%) tumors have overexpressed Cyclin D1. A significant correlation was identified between CCND1 amplification and Cyclin D1 overexpression ($P<0.001$) and both Cyclin D1 and CCND1 were related with ER expression.

Conclusion: Our results show a significant correlation between Cyclin D1 overexpression and CCND1 amplification. Overexpression of Cyclin D1 was observed in high proportion of breast cancer which should be considered for routine diagnosis.

Keywords: Cyclin D1, CCND1, Breast cancer, Immunohistochemistry, CISH.

Introduction

Gene amplification is a frequent device leading to the overexpression of oncogenes in human cancers¹. Cyclin D1 is the product of the CCND1 gene located on chromosome 11q13². Cyclin D1, an important regulator of the cell cycle,^{3,4} has been reported in 40% to 90% of invasive breast cancer cases⁴⁻⁶ and its gene has been found amplified in 15–20% of breast cancers⁷⁻⁹. These facts are well established and indicate that mechanisms other than gene amplification are responsible for deregulation of the protein. In addition to its role in cell cycle regulation, Cyclin D1 can regulate the growth of estrogen responsive tissues by activating the estrogen receptor (ER) in a ligand-independent fashion¹⁰. The induction of Cyclin D1 in breast cancer cell lines generate an increase in the number of cells progressing through G1 and accelerate transition from G1 to S phase, indicating that Cyclin D1 is rate-restrictive for progress through G1 phase¹¹. This rate-limiting step in cell cycle progression is regulated by a number of mechanisms including Cyclin D1 abundance; consequently, deregulation of Cyclin D1 gene expression or function is a probable contributor to loss of normal cell cycle control during carcinogenesis¹². In this study, Cyclin D1 overexpression was detected by immunohistochemistry and its gene amplification was detected by chromogenic *in situ* hybridization (CISH). Overexpression of Cyclin D1 protein was also investigated in combination with prognostic marker. The aims of the present study were to determine in the first part, the correlation between Cyclin D1 overexpression and other prognostic parameters, and in second part, to correlate the Cyclin D1 overexpression with the CCND1 amplification in breast carcinomas.

Materials and methods

The study material consists of 138 invasive ductal breast carcinomas (IDC) from patients diagnosed between January 2011 and September 2015. All patients' tumors were collected from the Regional Military University Hospital. Patient characteristics are summarized in Table 1.

Clinicopathological characteristics of the patients like age, SBR grade, tumor size and lymph node status were extracted from the pathology reports. For immunohistochemical analysis, paraffin sections were mounted on APES (2% 3'-aminopropyltriethoxysilane) coated slides. A monoclonal Mouse antibody Anti-Human Cyclin D1 clone DCS-6, DAKO (provided in liquid form as tissue culture supernatant in 0.05 mol/L Tris-HCl, pH 7.6 and 0.015 mol/L sodium azide) was used. The indirect avidin-biotin immunoperoxidase technique was used to demonstrate antibody binding sites. Finally, the sections were lightly counterstained in hematoxylin. Scoring of the Cyclin D1, Ki-67, ER and progesterone receptor (PR) reactivity, was performed by using the Allred method¹³, which classifies tumors into three groups: negative/weak (scores 0–2), moderate (scores 3–5) and strong (scores 6–8). To analyze the amplification of CCND1, we used chromogenic *in situ* hybridization (CISH), in which paraffin-embedded tissue sections were fixed in neutral buffered formalin for 12–24 hours before use. Tissue sections (4–5 μ m thickness) were mounted on Superfrost/Plus microscope slides. Deparaffinized slides were heated above 98°C for 15 min. in tissue heat pretreatment solution and incubated for enzyme digestion for 10 min. After denaturation and hybridization, CISH staining results were visualized with a standard brightfield microscope and a 40x dry lens. The presence of ≥ 5 individual signals, within the nuclei of a single cell is indicative of positive reactivity. The statistical analysis was performed using the IBM SPSS Advanced 20.0 statistical software, reference: 5725-A54. Correlations of Cyclin D1 and CCND1 to other clinicopathologic parameters were evaluated using Pearson's correlation test (r). P value < 0.05 was considered as significant.

Table 1: Patient and tumor clinicopathological characteristics.

Characteristics	Number of patients (%)
<i>Age of patients (years)</i>	
30-39	19 (13.8)
40-49	35 (25.4)
50-59	38 (27.5)
60-69	25 (18.1)
≥ 70	21 (15.2)
<i>Tumors size (cm)</i>	
T1 (< 2 cm)	11 (8)
T2 (2-5 cm)	101 (73.2)
T3 and T4 (≥ 5 cm)	26 (18.8)
<i>SBR grade</i>	
I	2 (1.4)
II	87 (63.1)
III	49 (35.5)
<i>Lymph node status</i>	
Negative	54 (39.1)
positive	84 (60.9)
<i>Estrogen receptor status</i>	
Negative	28 (20.3)
positive	110 (79.7)
<i>Progesterone receptor status</i>	
Negative	43 (31.2)
positive	95 (68.8)
<i>Ki-67 proliferation marker status</i>	
Negative	46 (33.3)
positive	92 (66.7)
<i>Cyclin D1 status</i>	
Negative	60 (43.5)
positive	78 (56.5)
<i>CCND1 gene status</i>	
Amplified (< 5 copies)	17 (12.3)

Results

The clinicopathological characteristics of the patients are mentioned in table 1. The grade SBR II was dominant (63.1%). Tumor sizes exceed 2 cm in 92% of the patients, and 60.9% had positive lymph nodes. The immunohistochemical staining showed overexpression of ER and PR in 79.7% and 68.8% of cases respectively. Ki-67 was overexpressed in 66.7% of tumors and Cyclin D1 overexpression was observed in 78 (56.5%) cases. The CCND1 gene was amplified in 17 (12.3%) cases.

Correlation of Cyclin D1 expression with clinicopathological parameters:

The results of the clinicopathological characteristics of the tumors in relation to the expression of Cyclin D1 are shown in Table 2. Cyclin D1 expression was found in 78 (56.5%) cases, whose 52.6% expressed it moderately and 47.4% were strongly positive. The majority of cases, 53 cases (67.9%) were in the ≥ 50 year age group. The maximum number of cases (51/78) 65.4% had grade SBR II. (48/78) 61.5% cases had positive lymph nodes and 70.5% of tumors were > 2 cm. There was no significant correlation between overexpression of Cyclin D1 and age of patients ($r=0.161/ P=0.060$), grade SBR ($r=-0.05/ P=0.518$), lymph node status ($r=-0.01/ P=0.833$), size of tumors ($r=0.11/ P=0.186$). There was a significant correlation between high Cyclin D1 expression and hormone receptors including ER

and PR ($r=0.52/P=<0.001$ and $r=0.26/P=0.002$). Cyclin D1 overexpression was significantly correlated with proliferation marker Ki-67 ($r=0.19/P=0.022$).

Correlation of CCND1 amplification with clinicopathological parameters:

The results of the clinicopathological parameters in relation to the CCND1 status are shown in Table 3. CCND1 amplification was found in 17 (12.3%) cases whose 14 cases presented >10 copies of the gene present per nucleus in >50% cancer cells. CCND1 was correlated with hormone receptor positivity ER ($r=0.28/ P=0.003$) and PR ($r=0.22/ P=0.030$) while there was no correlation with proliferation marker Ki-67 ($r=0.15/ P=0.080$). CCND1 amplification was not significantly related in our study to age of patients ($r=-0.11/ P=0.202$), SBR grade ($r=-0.07/ P=0.361$), lymph node status ($r=-0.01/ P=0.855$) and tumors size ($r=0.05/ P=0.559$).

Table 2: Correlation of Cyclin D1 expression with clinicopathological parameters.

Parameters	Negative/weak Cyclin D1 expression	Moderate Cyclin D1 expression	Strong Cyclin D1 expression	r/P-values
<i>Age of patients (years)</i>				
< 50	29 (21%)	15 (10.9%)	10 (7.2%)	0.161/0.060
≥ 50	31 (22.5%)	26 (18.8%)	27 (19.6%)	
<i>SBR grade</i>				
I	2 (1.4%)	0	0	-0.05/0.518
II	36 (26.1%)	23 (16.7%)	28 (20.3%)	
III	22 (15.9%)	18 (13.1%)	9 (6.5%)	
<i>Lymph node status</i>				
Negative	24 (17.4%)	14 (10.1%)	16 (11.6%)	-0.01/0.833
Positive	36 (26.1%)	27 (19.6%)	21 (15.2%)	
<i>Tumors size (cm)</i>				
< 2 cm	5 (3.6%)	5 (3.6%)	1 (0.7%)	0.11/0.186
2 - 5 cm	46 (33.3%)	28 (20.3%)	27 (19.6%)	
> 5 cm	9 (6.5%)	8 (5.8%)	9 (6.5%)	
<i>Estrogen receptor status</i>				
Negative	16 (11.6%)	10 (7.2%)	2 (1.4%)	0.52/<0.001
Positive	44 (31.9%)	31 (22.5%)	35 (25.4%)	
<i>Progesterone receptor status</i>				
Negative	23 (16.7%)	12 (8.7%)	8 (5.8%)	0.26/0.002
Positive	37 (26.8%)	29 (21%)	29 (21%)	
<i>Ki-67 proliferation marker status</i>				
Negative	25 (18.1%)	13 (9.4%)	8 (5.8%)	0.19/0.022
Positive	35 (25.4%)	28 (20.3%)	29 (21%)	

Correlation of Cyclin D1 expression with CCND1 amplification:

Gene amplification of CCND1 was observed in moderate and strong Cyclin D1 expression subgroups (Table 4). Among the 17 patients with amplification of CCND1 (>5 copies), 13 (76.5%) showed a strong expression of Cyclin D1, whereas 4/17 showed moderate expression. Tumors with non-amplified CCND1 gene were also observed in moderate and strong subgroups with low frequencies corresponding to 30.6% and 19.8% respectively. A good association was found between CCND1 amplification and Cyclin D1 overexpression (Table 4, $P<0.001$). This correlation was very high ($r=??/p<0.0001$) in hormone receptor-positive tumors.

Discussion

In the present study we have firstly examined the Cyclin D1 expressions by IHC and correlate it with ER, PR, Ki-67 and other clinicopathological parameters, on the other hand, we examined by CISH the copies number of CCND1 gene in invasive ductal breast cancer in relation to Cyclin D1 protein expression.

Cyclin D1 is necessary for the normal development of the breast and dysregulated expression stimulates aberrant mammary epithelial proliferation¹⁴. In the current study, Cyclin D1 overexpression

was found in 56.5% of cases which is in concordance with many of the similar studies¹⁵⁻¹⁷ who showed that Cyclin D1 was overexpressed in 60% - 63.4% of breast carcinomas. We found that Cyclin D1 was significantly correlated with ER+ breast cancer, these results is comparable to other study^{6,18} on invasive breast carcinoma where they found a positive correlation of Cyclin D1 overexpression with ER expression. This can be explained by the positive regulation of ER by Cyclin D1 in breast cancer cell lines where Cyclin D1 has been shown to join directly and activate the estrogen receptor alpha (ER) in a cdk- and pRB-independent fashion^{10,19}. This finding, that overexpressed Cyclin D1 can activate the ER independently, has the potential to add a crucial dimension to our understanding of mammary carcinogenesis²⁰⁻²². In current study we found a significant correlation between Cyclin D1 and Ki-67 which is linked to a more aggressive tumor phenotype, this results is in accordance with a previous study²³ who believe that tumors with overexpression of Cyclin D1 have a higher growth potential and favor the progression of the cell cycle more easily resulting in the overexpression of Ki-67.

Table 3: Correlation of CCND1 amplification with clinicopathological parameters.

Parameters	CCND1 non-amplified	CCND1 amplified	r/P-values
<i>Age of patients (years)</i>			
< 50	46 (33.3%)	8 (5.8%)	-0.11/0.202
≥ 50	75 (54.4%)	9 (6.5%)	
<i>SBR grade</i>			
I	2 (1.4%)	0	-0.07/0.361
II	74 (53.6%)	13 (9.4%)	
III	45 (32.6%)	4 (2.9%)	
<i>Lymph node status</i>			
negative	47 (34.1%)	7 (5.1%)	-0.01/0.855
Positive	74 (53.6%)	10 (7.2%)	
<i>Tumors size (cm)</i>			
< 2 cm	11 (8%)	0	0.05/0.559
2 - 5 cm	87 (63%)	14 (10.1%)	
> 5 cm	23 (16.7%)	3 (2.2%)	
<i>Estrogen receptor status</i>			
negative	25 (18.1%)	3 (2.2%)	0.28/0.003
Positive	96 (69.6%)	14 (10.1%)	
<i>Progesterone receptor status</i>			
negative	39 (28.3%)	4 (2.9%)	0.22/0.030
Positive	82 (59.5%)	28 (20.3%)	
<i>Ki-67 proliferation marker status</i>			
negative	43 (31.2%)	3 (2.2%)	0.15/0.080
Positive	78 (56.5%)	14 (10.1%)	

Table 4: Correlation of Cyclin D1 expression with CCND1 amplification.

Parameters	Cyclin D1 expression			r/P-values
	Negative/weak	Moderate	Strong	
<i>CCND1 gene status</i>				
Non-amplified (< 5 copies)	60 (49.6%)	37 (30.6%)	24 (19.8%)	0.42/<0.001
Amplified (>5 copies)	0	4 (23.5%)	13 (76.5%)	

The other clinicopathological parameters like SBR grade, tumor size and lymph nodes status were no correlated with Cyclin D1 overexpression in our study; this is in agreement with previous studies^{18,24,25}

demonstrating that no significant association between these parameters and Cyclin D1 overexpression. Given that amplification of CCND1 is one of the reasons for Cyclin D1 overexpression in breast cancer, we have tried to correlate them. We found an excellent correlation between CCND1 amplification and Cyclin D1 overexpression, particularly in ER+ tumors; this result is in agreement with many previous studies^{6,15,16,18}.

Conclusion

Our results confirmed a high correlation of Cyclin D1 expression and CCND1 amplification in ER+ breast cancer; hence it would be useful to identify a subset of patients with ER+ breast cancer for which CCND1 amplification should be considered for diagnosis and treatment. Our results also showed that high expression of Cyclin D1 is not always resulting to CCND1 amplification suggesting that its association with other clinicopathological parameters is also responsible for this overexpression. Finally, because of its established role as a major human oncogene, direct targeting of the Cyclin D1 protein or CCND1 gene may prove successful.

References

1. Brown LA, Johnson K, Leung S, Bismar TA, Benitez J, Foulkes W D et al. Co-amplification of CCND1 and EMSY is associated with an adverse outcome in ER-positive tamoxifen-treated breast cancers. *Breast Cancer Res Treat*, 2010; 121:347–354.
2. Rakha EA, Green AR, Powe DG, Roylance R, Ellis IO. Chromosome 16 tumor-suppressor genes in breast cancer. *Genes Chromosomes Cancer*, 2006; 45(6):527–535.
3. Baldin V, Lukas J, Marcote MJ, Pagano M, Draetta G. Cyclin D1 is a nuclear protein required for cell cycle progression in G1. *Genes Dev*, 1993; 7(5):812–821.
4. Ormandy CJ, Musgrove EA, Hui R, Daly RJ, Sutherland RL. Cyclin D1, EMS1 and 11q13 amplification in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 2003; 78(3):323–335.
5. Molland JG, Donnellan M, Janu NC, Carmalt HL, Kennedy CW, Gillett DJ. Infiltrating lobular carcinoma - a comparison of diagnosis, management and outcome with infiltrating duct carcinoma. *Breast*, 2004; 13(5):389–396.
6. Reis-Filho JS, Savage K, Lambros MB, James M, Steele D, Jones RL et al. Cyclin D1 protein overexpression and CCND1 amplification in breast carcinomas: an immunohistochemical and chromogenic *in situ* hybridization analysis. *Mod. Pathol.* 2006; 19(7):999–1009.
7. Courjal F, Cuny M, Simony-Lafontaine J, Louason G, Speiser P, Zeillinger R et al. Mapping of DNA amplifications at 15 chromosomal localizations in 1875 breast tumors: definition of phenotypic groups. *Cancer Res*, 1997; 57(19):4360–4367.
8. Champeme MH, Bieche I, Lizard S, Lidereau R. 11q13 amplification in local recurrence of human primary breast cancer. *Genes Chromosomes Cancer*, 1995; 12(2):128–133.
9. Lammie GA, Peters G. Chromosome 11q13 abnormalities in human cancer. *Cancer Cells*, 1991, 3(11):413–420.
10. Zwijsen RM, Wientjens E, Klompmaker R, Van der Sman J, Bernards R, Michalides RJ. CDK independent activation of estrogen receptor by cyclin D1. *Cell*, 1997, 88(3):405–415.
11. Musgrove EA, Lee CS, Buckley MF, Sutherland RL. Cyclin D1 induction in breast cancer cells shortens G1 and is sufficient for cells arrested in G1 to complete the cell cycle. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994; 91(17):8022–8026.
12. Sutherland RL and Musgrove EA. Cyclin D1 and mammary carcinoma: new insights from transgenic mouse models. *Breast Cancer Res*. 2002; 4(1): 14–17.
13. Allred DC, Harvey JM, Berardo M, Clark GM. Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis. *Mod Pathol*. 1998; 11:155- 168.
14. Alle KM, Henshall SM, Field AS, Sutherland RL. Cyclin D1 protein is overexpressed in hyperplasia and intraductal carcinoma of the breast. *Clin Cancer Res*. 1998; 4:847-854.
15. Pankaj G R, Norman P, Colin A P, Lee B, Alison A, Phil Q et al. High CCND1 amplification identifies a group of poor prognosis women with estrogen receptor positive breast cancer *Int. J. Cancer*. 2010;

16. Zhishuang L, Jingjing C, Qiong Y, Xiaojuan W, Aifeng P, Li L. Evaluation of CCND1 amplification and CyclinD1 expression: diffuse and strong staining of CyclinD1 could have same predictive roles as CCND1 amplification in ER positive breast cancers Am J Transl Res. 2016; 8(1):142-153.
17. Cecilia A, Claudia L, Elin E, Karin J, Carl B, Fjällskog M L. High expression of cyclin D1 is associated to high proliferation rate and increased risk of mortality in women with ER-positive but not in ER-negative breast cancers Breast Cancer Res Treat. 2017; 164:667-678.
18. Elsheikh S, Green AR, Mohammed AA, Grainge M, Paish CE, Lambros MBK, et al. CCND1 amplification and Cyclin D1 expression in breast cancer and their relation with proteomic subgroups and patient outcome. Breast Cancer Res Treat 2008; 109(2):325-335.
19. Neuman E, Ladha MH, Lin N, Upton TM, Miller SJ, DiRenzo J et al: Cyclin D1 stimulation of estrogen receptor transcriptional activity independent of cdk4. Mol Cell Biol. 1997; 17:5338-5347.
20. Zukerberg LR, Yang WI, Gadd M Thor A., Koemer F., Schmidt E et al: Cyclin D1 (PRAD1) protein expression in breast cancer: Approximately one-third of infiltrating mammary carcinomas show overexpression of the cyclin D1 oncogene. Mod Pathol. 1995; 8:560-567.
21. Buckley MF, Sweeney KJ, Hamilton JA, Sini RL, Manning DL, Nicholson RI et al: Expression and amplification of cyclin genes in human breast cancer. Oncogene. 1993; 8:2127-2133.
22. Gillett CE, Lee AH, Millis RR, Barnes DM: Cyclin D1 and associated proteins in mammary ductalcarcinoma *in situ* and atypical ductal hyperplasia. J Pathol. 1998;184:396-400.
23. Ling-Ling G, Peng G, Ya-Guang W, Wen-Cheng J, Chun-Yan H, Hong L et al. Alteration of Cyclin D1 in Chinese Patients with Breast Carcinoma and its Correlation with Ki-67, pRb, and p53. Archives of Medical Research. 2007; 38 (8): 846-852.
24. Ravikumar G and Ananthamurthy A. Cyclin D1 expression in ductal carcinoma of the breast and its correlation with other prognostic parameters. J Cancer Res Ther. 2014; 10(3):671-5.
25. Lundgren K, Brown M, Pineda S, Cuzick J, Salter J, Zabaglo L et al. Effects of cyclin D1 gene amplification and protein expression on time to recurrence in postmenopausal breast cancer patients treated with anastrozole or tamoxifen: a TransATAC study. Breast Cancer Research. 2012; 14:R57.

Acknowledgments:

We would like to thank Dr. Miloud Bourouis, anatomopathologist for his valuable and constructive suggestions. We acknowledge the help and technical assistance of all doctors of clinical and anatomic pathology service of the Regional Military University Hospital of Oran.

Intratumoral distribution of Ki-67 and Cyclin D1 in ER+ mammary carcinoma: Quantitative evaluation.

Short running title: Ki-67 and Cyclin D1 in mammary carcinoma.

MOHAMMEDI Latifa*, **DJILLALI DOULA Fatima**, **MESLI Farida** and **SENHADJI Rachid**

Laboratory of Developmental Biology and Differentiation, Nature and Life Science Faculty, University Oran1. BP 1524 El M'naouer, Oran 31000, Algeria.

*mohammedi.latifa@univ-oran1.dz; latifabio2@gmail.com

Abstract

Introduction: In spite of the strong evidence demonstrating the role of overexpression of Ki-67 and Cyclin D1 Ki-67 markers in breast carcinomas, clinical and pathological data remain discussed. This can be explained partly by intratumor heterogeneity installed during carcinogenesis; what we have tried to demonstrate in this study.

Materials and Methods: 76 ER positive breast cancer tumors were used to evaluate the intratumoral distribution of Ki-67 and Cyclin D1 expression. Image acquisition and visualization of the markers have been performed by optical microscopy and stereology sampling method has been used.

Results: The results show that mean Ki-67 labeling index is distributed heterogeneously in the same tumor, from 20.67 ± 6.87 to 45.10 ± 10.65 . The coefficient of variation (COV) revealed dispersion values between 13.4% and 42.9%. Associated with positive ER status, all the tumors presented a Cyclin D1 expression with a COV varying between 19% and 28.5% and a mean labeling index fluctuating between 19.4 ± 4.4 and 41.64 ± 10.1 within the same patient showing important intratumor heterogeneous distribution.

Conclusion: In this study, we have adopted a strictly quantitative approach to evaluate and demonstrate intratumor heterogeneity. This establishes one of the main factors of the bad answer of the patients to therapy. To achieve this, intratumor heterogeneity should be usually definable and quantifiable but this domain awaits future progress and methods need to move towards a better understanding of molecular and cellular mechanisms that initiate and maintain this tumor heterogeneity.

Keywords: Breast cancer, Cyclin D1, ER+, Immunohistochemistry, Intratumor heterogeneity, Ki-67.

Introduction

The breast cancer is a histologically and clinically heterogeneous disease. The intratumor heterogeneity is due to phenotypically diverse cancer stem cells which can be a crucial matter in terms of therapeutic responses ⁽¹⁾. In addition to the known histo-morphological criteria, the detection and the quantification of this intratumor heterogeneity will enable to determine groups of patients with a more accurate prognosis ⁽²⁾. Spatial distribution of Ki-67 is investigated, given the importance of Ki-67 as a prognostic parameter and its contribution in treatment decisions ⁽³⁾. The oncogenic properties of Cyclin D1 in breast cancer in particular ER+ have been established in various studies ⁽⁴⁻⁶⁾. Cyclin D1 overexpression has been reported in 40% to 90% of invasive breast cancer cases ⁽⁷⁻⁹⁾. The aim of this preliminary study was to define the prevalence and clinical significance of Ki-67 and Cyclin D1 overexpression in primary breast tumors ER positive, while highlighting the existence of intratumor heterogeneity in this type of cancer.

Material and methods

Seventy six tumors from female patients' age 43 years with invasive ductal carcinoma (IDC) grade III were used for this study. Paraffin-embedded tumor samples and medical data of the selected patients were obtained from the regional military university hospital of Oran. Labeling index (Percentage of positive stained cells, LI) and coefficient of variation (SD/mean, COV) of Ki-67 and Cyclin D1 expression were determined to measure the dispersion. Scoring of the Ki-67 and Cyclin D1 reactivity was performed by using the Allred method, which classifies tumors into three groups: negative/weak (scores 0-2), moderate (scores 3-5) and strong (scores 6-8) ⁽¹⁰⁾.

Paraffin sections were mounted on APES (2% 3'-aminopropyltriethoxysilane) coated slides. A monoclonal Mouse antibody Anti-Human Cyclin D1 clone DCS-6, DAKO (provided in liquid form as tissue culture supernatant in 0.05 mol/L Tris-HCl, pH 7.6 and 0.015 mol/L sodium azide) and Mib-1, mouse monoclonal antibody ready-to-use (DAKO) were used. The indirect avidin-biotin immunoperoxidase technique was used to demonstrate antibody binding sites. Finally, the sections were lightly counterstained in hematoxylin.

Tumor samples used to assess intratumor heterogeneity (ITH) were selected by random sampling method ⁽¹¹⁾. Full cell count method has been done by sweeping the slide from the right to the left then from the top to the down ⁽¹²⁾. Slides have been subdivided in fields (images) delimited by the microscope grads. To avoid oversampling, the number of cells was estimated by two-dimensional counting rule described by Gundersen (1977) ⁽¹³⁾. In addition to cells within the frame, all cells intersected by the upper and right border are counted and all those intersected by the lower and left border are disregard, and any cell hit by the upper left corner are counted and those hit by the lower right corner are disregard. Slides were reviewed using an Optical microscope (Olympus, CH20 BIMF200) at 40X objective, equipped with a camera (OPTIKA Vision Lite 1.04 OPTIKAM B5) connected to a computer.

Results

Ki-67 (Figure 1) and Cyclin D1 (Figure 2) slides, showed positive nuclear staining but uniformly from one field to another. Positive perinuclear and sometimes nucleolar reactions were seen with perinuclear reinforcement. The number of microscopic fields analyzed by slide was situated between 8 and 13. In total, 537 fields have been treated and 52700 cells have been counted (Table 1). Ki-67 and Cyclin D1 showed variations in expression levels in the same tumor. The maximal (M_x) and minimal (M_n) of mean labeling indexes (MLI) for Ki-67 were found in patients 39 and 6 with respective values of 45.10±10.65% and 20.67±6.87% (Figures 3), the median value was 32.65%. As for Cyclin D1, the maximal mean labeling index was detected in the patient 39 with a value of 41.64±10.08%, the minimal value was found in patient 3 (19.40±4.42%) (Figure 4), the median value was 32.12%.

Ki-67 and Cyclin D1 expressions as detected by immunohistochemistry were seen in 69 (90.8%) and 58 (76.3%) cases respectively. Cases were categorized in two groups, moderate 40 (52.7%) and 32 (42%) and strong 29 (38%) and 26 (34.3%) (Table 2). Fifty one (67%) slides in which both Ki-67 and Cyclin D1 were positives were used to evaluate the markers expression by immunochemistry. 25 (33%) cases were negatives whose 7 (9.3%) cases for Ki-67 and 18 (23.7%) cases for Cyclin D1. Positives cases were categorized into two groups; moderate 40 (52.7%) and 32 (42%) for Ki-67 and Cyclin D1 respectively and strong 29 (38%) and 26 (34.3%) for Ki-67 and Cyclin D1 (Table 2). The estimation of COV showed also a dispersion of labeling within the same patient (Figures 5 and 6). The COV of Ki-67 labeling index ranged from 18.2% in patient 51 to 40.3% in patient 26 with Cyclin D1 labeling index also showed a wide dispersion within the same tumor with COVs from one patient to another ranging from 14% to 38.5%.

Discussion

The present study illustrates the existence of a heterogeneous distribution of Ki-67 and Cyclin D1 expression within and among infiltrating ductal breast carcinomas (IDC) patients. The Ki-67 cut-off established by the St Gallen International Expert Consensus during which the majority of panelists voted that a threshold of $\geq 20\%$ was indicative of high Ki-67 status ⁽¹⁴⁾. In our series, the median Ki-67 and Cyclin D1 values were 32.65% and 32.12% respectively, which means that the 51 tumors studied have a great proliferative activity reflecting the tumor aggressiveness of IDC.

Our study shows that 90.7% of tumors have a moderate/strong Ki-67 expression, this is in accordance with a previous study ⁽¹⁵⁾ which reported that 80.7% of cases presented a high expression of Ki-67. As to Cyclin D1, 76.3% show a moderate/strong expression. This result is in accordance with this observed in previous studies ^(16,17) showing high proliferative activity of Cyclin D1 in IDC ER+ and

advocating including Cyclin D1 as an independent prognostic factor to predict the risk of mortality in ER+ groups.

Based on the evaluation of the COV to characterize the intratumor heterogeneity of Ki-67 expression in IDC, our data are consistent with the results of Senhadji (2004) ⁽¹⁸⁾ who found fluctuating COV values between 1.94% and 35.9%. Similarly, for Cyclin D1, the results found confirming intratumor heterogeneity, are in line with those found in earlier study ⁽¹⁷⁾ which reported that the staining intensity varied within the individual tumor and from cell to cell within the same tumor. In the present study, the dispersion estimated by the COV is very high in some cases, 40.3% for the Ki-67 and 38.5% for Cyclin D1. This shows the great variability in the distribution of labeling reflecting the heterogeneity of tumors studied. The intratumor heterogeneity shown in this study has been also confirmed by other researchers ^(19,20,21). These last recommend exploring the whole tumor and not only a part of it, because intratumor heterogeneity can lead to underestimation of the tumor genomics landscape portrayed from single tumor-biopsy samples and may present major challenges to personalized-medicine and biomarker development.

Conclusion

Our work is essentially a quantitative approach allowing easier way the study of the distribution of cell subpopulations discriminated according to Ki-67 and Cyclin D1 overexpression. We show that the two biomarkers are expressed and distributed differently between microscopic fields within the same patient. This finding demonstrates the presence of intratumor heterogeneity indicating that the breast tumor is often a mixture of multiple genotypically distinct cell populations. This establishes one of the main factors of the bad answer of the patients to therapy ⁽²¹⁾ and thus it is important to integrate intratumor heterogeneity into cancer care, but this domain awaits future progress and methods like genomics and bioinformatics need to move towards a better understanding of the basic molecular and cellular mechanisms that initiate and maintain this tumor heterogeneity.

Acknowledgments:

We would like to thank Dr. Miloud Bourouis, anatomopathologist for his valuable and constructive suggestions. We acknowledge the help and technical assistance of clinical and anatomic pathology service doctors of the Regional Military University Hospital of Oran.

References:

1. Martin PM, Romain S and Chinot O. Biologie des cancers du sein à haut risque. In : Journée "Gynécologie" cancer du sein à haut risque. Eurocancer 97, John Libbey Eurotext Ed. 1997; 5-7.
2. Gerlinger M, Andrew J, Rowan B, et al. Intratumor Heterogeneity and Branched Evolution Revealed by Multiregion Sequencing. *N Engl J Med* 2012; 366:883-92.
3. Inwald EC, Klinkhammer-Schalke M, Hofstädter F, et al. Ki-67 is a prognostic parameter in breast cancer patients: results of a large population-based cohort of a cancer registry. *Breast Cancer Res Treat* 2013; 139:539-552.
4. Wang TC, Cardiff RD, Zukerberg L, et al. Mammary hyperplasia and carcinoma in MMTV-Cyclin D1 transgenic mice. *Nature* 1994; 369(6482):669-671.
5. Prall OW, Rogan EM, Musgrove EA, et al. C-Myc or Cyclin D1 mimics estrogen effects on Cyclin E-Cdk2 activation and cell cycle reentry. *Mol Cell Biol* 1998; 18(8):4499-4508.
6. Altucci L, Addeo R, Cicatiello L, et al. 17beta-Estradiol induces Cyclin D1 gene transcription, p36D1-p34cdk4 complex activation and p105Rb phosphorylation during mitogenic stimulation of G(1)-arrested human breast cancer cells. *Oncogene* 1996; 12(11):2315-2324.
7. Molland JG, Donnellan M, Janu NC, et al. Infiltrating lobular carcinoma—a comparison of diagnosis, management and outcome with infiltrating duct carcinoma. *Breast* 2004; 13(5):389-396.
8. Reis-Filho JS, Savage K, Lambros MB, et al. Cyclin D1 protein overexpression and CCND1 amplification in breast carcinomas: an immunohistochemical and chromogenic in situ

- hybridization analysis. *Mod Pathol* 2006; 19(7):999–1009.
9. Ormandy CJ, Musgrove EA, Hui R, et al. Cyclin D1, EMS1 and 11q13 amplification in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2003; 78(3):323–335.
10. Allred DC, Harvey JM, Berardo M, et al. Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis. *Mod Pathol* 1998; 11:155–168.
11. Chapman Judith-Anne W, Wolman E, Wolman S R, et al. Assessing Genetic Markers of Tumour Progression in the Context of Intratumour Heterogeneity. *Cytometry* 1998; 31:67–73.
12. Howard V and Reed M. Unbiased Stereology. Three-dimensional measurement in microscopy. *Microscopy handbooks* 41. Bios Scientific Publisher, UK 1998; 24-25.
13. Gundersen HJG. Notes on the estimation of the numerical density of arbitrary profiles: the edge effect. *J Microsc* 1977; 111:219–23.
14. Bustreo S, Osella-Abate S, Cassoni P, and al. Optimal Ki-67 cut-off for luminal breast cancer prognostic evaluation: a large case series study with a long-term follow-up. *Breast Cancer Res Treat* 2016; 157:363–371.
15. Soyer Ph. Histopathologic and phenotypic factors of small breast cancer stemming from organized screening. In: *traitement personnalisé des cancers du sein: impact sur la prise en charge locorégionale*. 35^{es} journées de la SFSPM, Montpellier, 2013.
16. Elsheikh S, Green AR, Mohammed AA, et al. CCND1 amplification and Cyclin D1 expression in breast cancer and their relation with proteomic subgroups and patient outcome. *Breast Cancer Res Treat* 2008; 109(2):325–335.
17. Abd El Maqsoud N MR and Aly M A. Significance of Cyclin D1 overexpression and Amplification in Ductal Hyperplasia, Carcinoma in situ and invasive Carcinoma in Egyptian Female Breast. *International Journal of Cancer Research* 2010; 6 (4):202-219.
18. Senhadji R. *Epidémiologie analytique du cancer mammaire et évaluation quantitative de l'hétérogénéité intratumorale par microscopie confocale et immunomarquage multiple aux Ki-67, PCNA, C-erbB-2 et PS2*. Thèse de Doctorat d'état: Université d'Oran; Algérie 2004; 1-211.
19. Arnerlöv C, Emdin SO, Cajander S, et al. Intratumoral variations in DNA ploidy and s-phase fraction in human breast cancer. *Analytical Cellular Pathology* 2001; 23:21-28.
20. Ellsworth RE, Toro AL, Blackburn HL, et al. Molecular heterogeneity in primary breast carcinomas and axillary lymph node metastases assessed by genomic fingerprinting analysis. *Cancer Growth Metastasis* 2015; 15–24.
21. Britten RA, Evans A, Allalunis-Turner MJ, et al. Intratumoral heterogeneity as a confounding factor in clonogenic assays for tumour radioresponsiveness. *Radiology and Oncology* 1996; 39(2):145-53.

Figures:

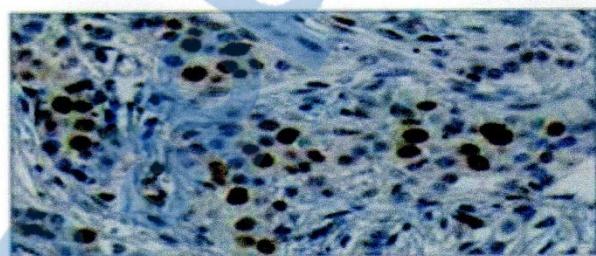


Figure 1: Representative Nuclear staining results from Mayer's hematoxylin coloration and immunohistochemistry for Ki-67, x 400.

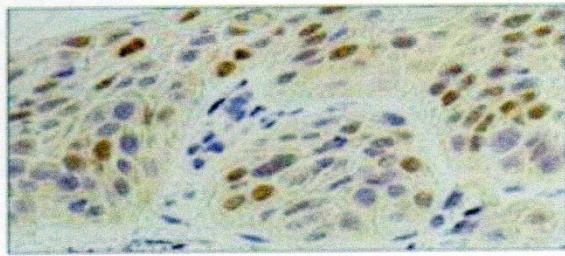


Figure 2: Representative Nuclear staining results from Mayer's hematoxylin coloration and immunohistochemistry for Cyclin D1, x 400.

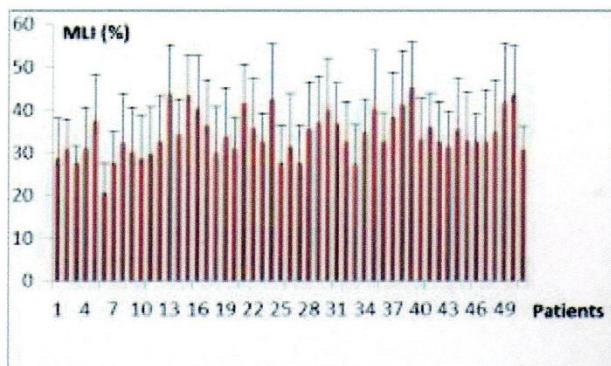


Figure 3: Mean labeling indexes (MLI %) for Ki-67 and standard deviation by patient.

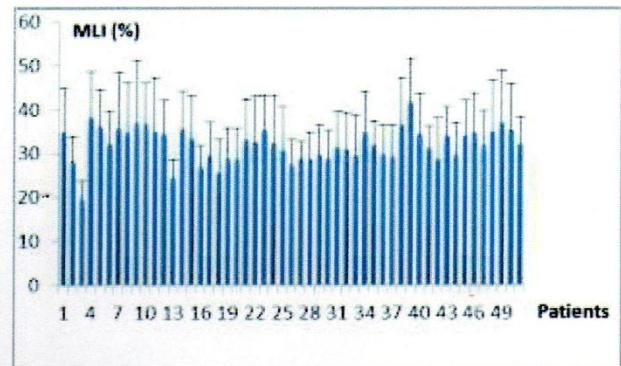


Figure 4: Mean labeling indexes (MLI %) for Cyclin D1 and standard deviation by patient.

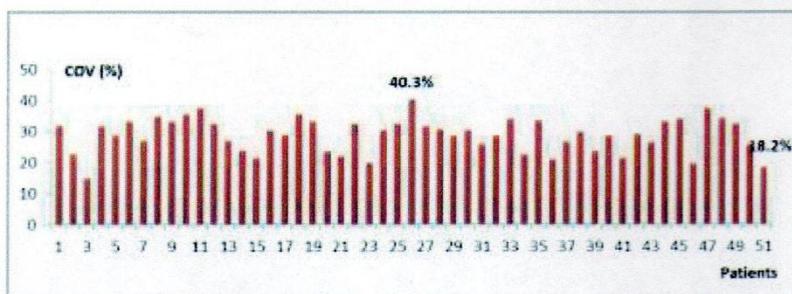


Figure 5: Coefficient of variation (COV%) of Ki-67 labeling index.

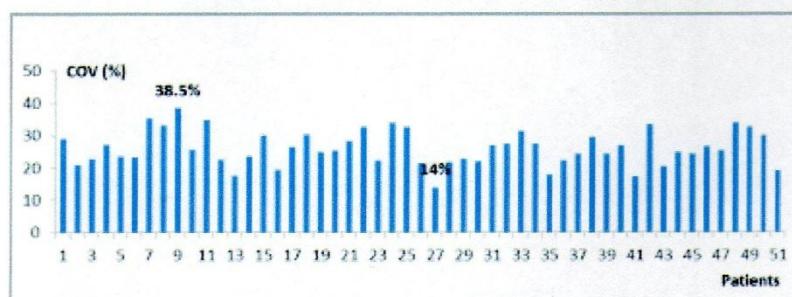


Figure 6: Coefficient of variation (COV%) of Cyclin D1 labeling index.

Tables:

Slides (n)	Fields/Slide	Total of fields	Number of cells
9	12	108	12860
9	11	99	9240
8	9	72	6220
8	8	64	6580
9	10	90	7470
8	13	104	10330
Total		537	52700

Table 1: Data of image acquisition showing the field's number and counted cells.

Scoring	N patients (%)	
	Ki-67	Cyclin D1
0-2 (negative/weak)	7 (9.3%)	18 (23.7%)
3-5 (moderate)	40 (52.7%)	32 (42%)
6-8 (strong)	29 (38%)	26 (34.3%)
total	76 (100%)	76 (100%)

Table 2: Ki-67 and Cyclin D1 scoring expression

Résumé

La cellule progresse dans le cycle cellulaire grâce à l'action coordonnée de complexes protéiques constitués de cyclines et de leurs partenaires. Parmi ces cyclines, la cycline D1 (CycD1) est l'une des molécules régulatrices de ce processus, surexprimée dans un large éventail de néoplasmes humains. Certains articles ont fait le point des connaissances sur les molécules de régulation du cycle cellulaire dans le but d'une meilleure compréhension des mécanismes responsables des cancers. Néanmoins la valeur pronostique de la CycD1 reste encore à confirmer et demeure à l'étude. La CycD1 est solidement établie en tant qu'oncogène ayant un rôle pathogénique important dans les carcinomes du sein. Elle régule la croissance des tissus sensibles aux œstrogènes en activant les récepteurs aux œstrogènes (RE) de façon indépendante du ligand entraînant une régulation positive des RE. Ceci lui confère un rôle oncogénique possible dans les cancers du sein RE positif qui finissent par présenter une résistance aux traitements anti-œstrogéniques par des mécanismes extrêmement complexes. L'objectif de ce travail est d'une part, d'étudier la relation entre l'expression de CycD1 et l'amplification du gène CCND1 et avec d'autres paramètres biologiques (les récepteurs à l'œstrogène et à la progestérone (RP), le Ki-67 et la P53) chez 138 patientes atteintes du carcinome canalaire infiltrant (CCI) du sein dans le but d'évaluer la dépendance de CycD1 des autres paramètres et le degré de son implication dans ce type de cancer. D'une autre part, nous nous sommes intéressés à définir la prévalence et la signification clinique de la surexpression de CycD1 et l'amplification du CCND1 dans les cancers du sein RE positif afin de les cibler directement comme protocole anticancéreux et par conséquent, augmenter les chances de guérison. Afin d'évaluer l'expression de CycD1 et des paramètres biologiques, l'immunohistochimie a été réalisée sur des prélèvements tumoraux. L'amplification du gène CCND1 a été mesurée par la méthode d'hybridation chromogénique *in situ*. Les résultats ont montré que CycD1 est surexprimée dans 56,5% des cas alors que le gène CCND1 est amplifié dans seulement 12,3%. Les RE et RP sont surexprimés respectivement dans 79,7% et 68,8% des cas. Une corrélation significative a été trouvée entre l'amplification du CCND1 et la surexpression de CycD1 ($P<0,001$). Cette corrélation est encore beaucoup plus élevée dans les tumeurs RE+ ($P<0,0001$). Une forte corrélation a été constatée également entre les niveaux d'expression de CycD1 et ceux des récepteurs hormonaux (RE : $P<0,0001$; RP : $P=0,002$). Ce qui n'est pas le cas avec les autres paramètres clinicopathologiques, Ki-67 et P53. La compréhension du processus moléculaire de l'expression de CycD1 dans une grande proportion de tumeurs et son profil vis-à-vis des paramètres biologiques mettent en lumière l'intérêt d'intégration de ce biomarqueur dans les pratiques oncologiques. Ceci permet non seulement de fournir un nouvel outil de diagnostic et de pronostic aux cliniciens, mais également d'envisager l'utilisation ciblée de nouvelles thérapeutiques anticancéreuses en testant de nouvelles molécules inhibitrices.

Mots clés:

Cancer du sein; CCND1; CISH; CyclineD1; Immunohistochimie; Récepteurs hormonaux; Ki-67; P53; PRB; Paramètres biologiques.