

## EXPRESSION DE P73 DANS L'ADÉNOCARCINOME COLORECTAL: SERAIT-ELLE UN FACTEUR PRONOSTIQUE OU ÉTIOPATHOGÉNIQUE?

Lilia Kria Ben Mahmoud \*, Amira Arfaoui Toumi \*, Ines Chaâr \*, Ahlem Lahmer \*\*, Tahar khalfallah \*\*\*, Sabeh Regaya Mzabi \*\*, Saadia Bouraoui (\*, \*\*)

\* Unité de recherche (M.E.S.R.S) : UR/99/08-58;

\*\* Laboratoire d'Anatomie et de Cytologie Pathologique CHU Mongi Slim La Marsa. Tunisie ;

\*\*\* Service de chirurgie générale CHU Mongi Slim La Marsa, Tunisie.

L. Kria Ben Mahmoud, A. Arfaoui Toumi, I. Chaâr, Ahlem Lahmer, T. khalfallah, S. Regaya Mzabi, S. Bouraoui

L. Kria Ben Mahmoud, A. Arfaoui Toumi, I. Chaâr, Ahlem Lahmer, T. khalfallah, S. Regaya Mzabi, S. Bouraoui

EXPRESSION DE P73 DANS L'ADÉNOCARCINOME COLORECTAL: SERAIT-ELLE UN FACTEUR PRONOSTIQUE OU ÉTIOPATHOGÉNIQUE?

PULMONARY LYMPHANGIOMATOSIS REVEALED BY AN INTERSTITIAL SYNDROME IN A YOUNG ADULT

LA TUNISIE MEDICALE - 2009 ; Vol 87 (n°04) : 267 - 272

LA TUNISIE MEDICALE - 2009 ; Vol 87 (n°04) : 267 - 272

### RÉSUMÉ

**Prérequis:** Le gène p73 code pour une protéine nucléaire qui est très homologue structurellement et fonctionnellement à la protéine p53. Ceci indique que p73 agirait comme un suppresseur de tumeur.

**But:** A travers cette étude, on se propose d'étudier par immunohistochimie le profil d'expression de p73 sur une série de 120 cas d'adénocarcinomes colorectaux et à considérer son éventuelle implication dans le schéma de la carcinogénèse.

**Méthodes:** Etude rétrospective.

**Résultats:** Les résultats montrent que l'expression de p73 au niveau des adénocarcinomes augmente en intensité et en distribution du tissu normal au tissu tumoral superficiel et profond, de même qu'au niveau du tissu métastatique. En revanche, pour les adénocarcinomes mucineux, l'expression de p73 diminue dans la tumeur par rapport à la muqueuse saine et ce d'autant plus que les structures tumorales baignant au sein du mucus sont peu différenciées, voire s'annule totalement dans les cellules isolées et dans les métastases. Cette constatation est renforcée par le fait que dans l'adénocarcinome à composante mucineuse < 50%, la positivité de p73 présente au niveau des zones bien différenciées diminue sensiblement voire se négative dans les territoires mucineux.

**Conclusion:** L'expression de p73 constituerait un facteur pronostique potentiel pour les adénocarcinomes colorectaux communs et sa négativité plaiderait pour son implication très probable dans la genèse des adénocarcinomes mucineux.

### SUMMARY

**Background:** The p73 gene encodes a nuclear protein that is highly homologous to p53. p73 also shares some common functions with p53 protein indicating that p73 gene is a p53-like tumor suppressor.

**Aim:** In this study, we examined by immunohistochemistry the p73 expression on 120 cases of colorectal carcinomas and evaluated its implication in carcinogenesis.

**Methods:** Retrospective study.

**Results:** The results show an increase of intensity and distribution of p73 in common adenocarcinoma from the normal mucosa, to primary tumors and to metastases. However, in mucinous adenocarcinomas, immunostaining of p73 decrease in primary tumor and completely disappears in isolated cells and metastases compared with matched normal mucosa. These observations are further reinforced by the fact that in adenocarcinoma with mucinous component less than 50%, the positivity of p73 persist in well-differentiated areas and dramatically decreases or completely disappears in mucinous areas.

**Conclusion:** In conclusion, p73 would be a prognostic marker for the common adenocarcinomas and an etiopathogenic factor for the mucinous subtype.

### MOTS - CLÉS

Adénocarcinomes colorectaux, p73, immunohistochimie.

### KEY - WORDS

Colorectal carcinomas, p73, immunohistochemistry.

هل يمثل تعبير P73 عاملاً إنذارياً أم سببياً مرضياً أثناء سرطان القولون والمستقيم

الباحثون: كريع بن محمود . ل - عرفاوي التومي. أ - خلف الله. م. ت - مزابي. ر - مصمودي. ب.

نهدف من خلال هذا البحث إلى دراسة سيماء تعبير P73 من خلال مجموعة تضم 120 حالة سرطان غدية في القولون والمستقيم وتحديد دوره في رسم التكون السرطاني. أثبتت النتائج أنه بالنسبة للسرطانة الغدية فإن تعبير P73 يرتفع في الحدة وفي التوسيع من الأنسجة السليمة إلى الأنسجة الورمية وحتى أنسجة النقائل. فنستنتج من خلال هذا البحث أن تعبير P73 يمثل عاملاً إنذارياً هاماً أثناء السرطانة الغدية في القولون والمستقيم وسلبيته تزيد من احتمال تورطه في تكون السرطانة الغدية المخاطية.

الكلمات الأساسية : سرطانة غدية في القولون والمستقيم P73

Le gène p73, situé sur le chromosome 1p36, région qui subit de fréquentes pertes d'hétérozygotie dans divers cancers humains, code pour une protéine nucléaire contenant deux polypeptides distincts  $\alpha$  et  $\beta$ . La structure de cette protéine est très homologue à celle de la p53 et les deux présenteraient ainsi des fonctions communes : activation des gènes de transcription, inhibition des cellules de croissance et induction de l'apoptose [1]. Ceci indiquerait que p73 est une protéine p53-like agissant comme un suppresseur de tumeur [2]. Toutefois, certaines études récentes montrent que la mutation de p73 ne serait pas un évènement important dans la genèse des cancers humains et suggèrent en revanche qu'elle aurait un impact d'ordre pronostique de part son hyper expression notamment dans les adénocarcinomes colorectaux et ce proportionnellement à leur stade d'Astler Coller croissant [3].

Dans cette étude, on se propose d'analyser l'expression de la protéine p73 d'une part au niveau du tissu tumoral de l'adénocarcinome commun, mucineux, à composante mucineuse ainsi que le tissu sain en regard et d'autre part au niveau des métastases hépatiques et ganglionnaires lorsqu'elles existent, et ceci pour étudier l'implication éventuelle de p73 dans la carcinogenèse et la progression tumorale ainsi que sa relation avec le pronostique.

## MATERIELS ET METHODES

### Patients

On se propose à travers cette étude immunohistochimique de vérifier l'intervention de la p73 dans le processus évolutif des adénocarcinomes colorectaux et de considérer son éventuelle implication dans leurs schémas carcinogénétiques et ce à travers l'analyse de son expression sur une série de 120 cas d'adénocarcinomes colorectaux répartis en 60 adénocarcinomes non mucineux, 35 adénocarcinomes mucineux et 25 à composante mucineuse < à 50%, diagnostiqués au laboratoire d'Anatomie Pathologiques de l'Hôpital Mongi Slim à Tunis et colligés sur 13 ans. Une étude de l'intensité et de la distribution du marquage a été réalisée comparativement entre la muqueuse saine contiguë et à distance et les versants superficiels et profonds des adénocarcinomes en fonction de leur type histologique, de leur différenciation et de leur stade, ainsi qu'au niveau des métastases ganglionnaires et hépatiques.

### Immunohistochimie

Les coupes de 5 $\mu$ m d'épaisseur à partir de blocs de tissus, tumoraux et de la muqueuse saine, fixés préalablement au formol et inclus en paraffine, sont déparaffinés en les plaçant pendant une nuit dans l'étuve à 37° puis dans un bain de toluène pendant 30 minutes. Avant d'inhiber l'activité des peroxydases endogènes par l'eau oxygénée à 3% pendant 10 minutes, 2 bains successifs d'alcool à 100° et à 95° suivis d'encerlage des zones au DakoPen sont réalisés. Une méthode de restauration antigénique au four à micro-ondes est réalisée en mettant les lames dans le tampon citrate 0,01M, pH=6 à températures décroissantes, 2 fois 5 minutes, suivie d'un refroidissement de 20 minutes puis un bain d'eau distillée stérile et de tampon tris. Les coupes sont ensuite incubées une nuit à 4°C avec l'anticorps monoclonal dirigé contre p73 (clone p73-9F7,

ZYMED Laboratories) au 1/150. Les anticorps sont révélés par incubation avec le polymère marqué à la horse radish peroxydase (HRP) l'Envision (Dual Link System Peroxidase, DakoCytomation Envision+) pendant 30 minutes puis une étape de rinçage dans 3 bains de tampon tris est effectuée. La dernière étape de la révélation consiste en une incubation pendant 20 minutes avec un substrat chromogène 3,3'-diaminobenzidine (Liquid DAB+ Substrate Chromogen System, DakoCytomation) suivi d'un bain d'hématoxyline aqueuse pour colorer les noyaux.

L'interprétation des lames se fait par lecture au microscope. Deux pathologistes, qui n'ont aucune information sur les renseignements cliniques ni histologiques, évaluent l'expression de p73 selon l'intensité et la distribution du marquage. L'immunomarquage selon l'intensité peut être faible, modérée, ou fortement positive. La distribution de l'expression nucléaire de p73 est considérée négative si aucune cellule tumorale n'est marquée ou si moins de 10% des cellules tumorales sont positives, alors qu'elle est considérée positive au delà de ce seuil et répartis en 4 niveaux : (10-25%), (26-50%), (51-75%) et (76-100%). Cet immunomarquage est évalué au niveau du tissu sain contigu et à distance, au niveau de la tumeur et des métastases lorsqu'elles existent.

Les coupes sont interprétées microscopiquement en évitant l'effet des artefacts et en s'assurant de la qualité du montage qui peut par interposition d'air entraver à une bonne interprétation. Les cellules situées sur les marges des sections et les territoires présentant une morphologie mal organisée sont considérées non interprétables.

### Analyse statistique

L'étude statistique a été effectuée par le test X<sup>2</sup> afin de ressortir les corrélations significatives du marquage immunohistochimique dans les 3 groupes tumoraux. Le seuil  $p < 0,005$ , à partir duquel les résultats sont considérés significatifs, est établi d'avance.

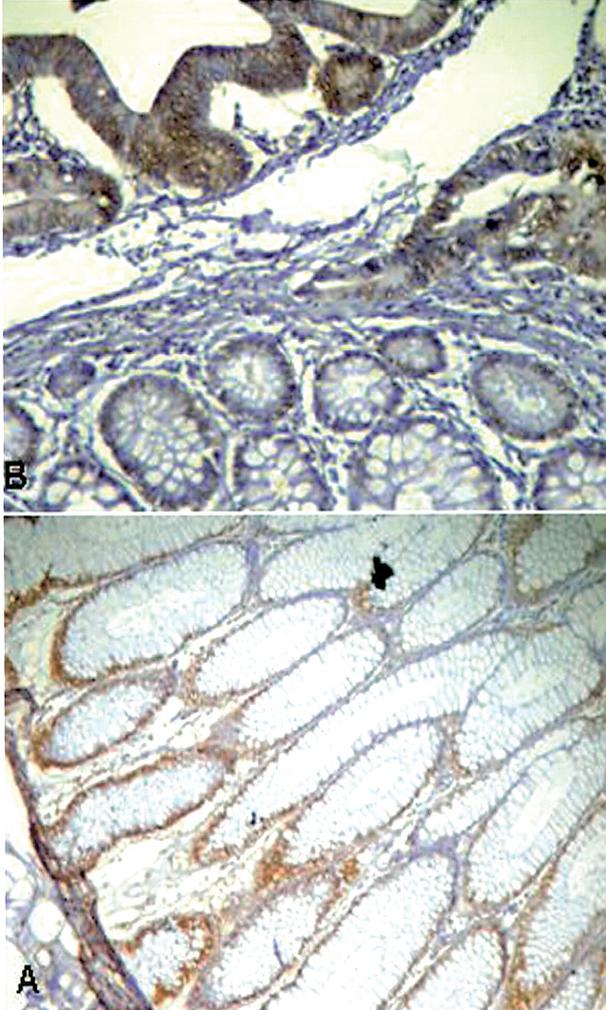
## RESULTATS

Les résultats de notre étude immunohistochimique ont montré une positivité nucléaire modérée des tissus sains contigus et à distance de la tumeur volontiers localisée au fond des cryptes. Cette positivité était plus accentuée au niveau de l'adénocarcinome bien différencié. En effet, il n'existait aucune différence significative quant à l'intensité et la distribution de l'expression de p73 au niveau du tissu sain contigu et à distance de la tumeur ( $p > 0,05$ ). Par contre, cette expression augmentait significativement en intensité du tissu sain au tissu tumoral en passant par la dysplasie ( $p < 0,05$ ) (figure 1A, 1B).

De même et selon le degré de différenciation décroissant et le stade d'infiltration croissant, on notait une augmentation progressive et significative de l'intensité et de la distribution de p73 ( $p < 0,05$ ) (figure 2). Dans l'adénocarcinome peu différencié dessinant des structures trabéculo-cordonales et des cellules isolées, l'expression de p73 était intense et diffuse (figure 3) indépendamment de son degré d'infiltration et ce comparativement à la faible positivité du tissu sain en regard. En revanche, la variante d'adénocarcinome à cellules indépendantes se distinguait par la négativité de l'anti-p73 alors

que le tissu sain contigu garde sa positivité (figure 4B et cartouche).

**Figure 1** : immunomarquage par l'anti-p73 du : A: tissu sain à distance (P73X200), B: tissu sain contigu à la tumeur bien différenciée (P73X200),



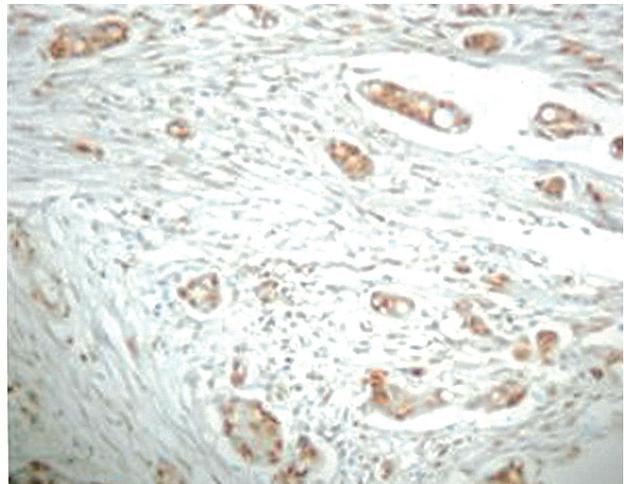
Pour ce qui est des adénocarcinomes mucineux, nous avons découvert que p73 avait un profil d'expression particulier qui diminuait significativement en intensité et en distribution par rapport au tissu sain et les territoires d'adénocarcinome commun ( $p < 0,001$ ) pour se négativer totalement en profondeur, et ce d'autant plus que les structures tumorales qui le constituaient, baignant au sein du mucus étaient peu différenciées, peu cohésives dessinant des segments de glandes voire des cellules indépendantes (figure 4A). Par ailleurs, lorsque le carcinome mucineux se composait uniquement de cellules indépendantes, la négativité était franche, absolue et abrupte (figure 4B).

Pour les adénocarcinomes à composante mucineuse  $< 50\%$ , la positivité de l'anti-p73 persistait au niveau du contingent

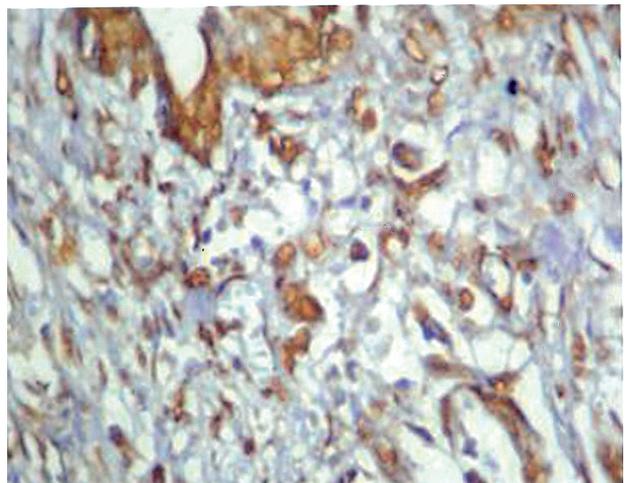
prédominant de type non mucineux, volontiers superficiel, et ce avec un profil d'expression superposable à celui de l'adénocarcinome commun sus décrit ( $p=0,558$ ). En revanche, dans les territoires de type mucineux, il rejoignait celui de l'adénocarcinome mucineux ( $p > 0,05$ ) (figure 5).

Pour ce qui est des métastases ganglionnaires et hépatiques, le marquage était tout à fait similaire à celui de l'adénocarcinome primitif quelque soit son sous-type histologique. Par contre, nous avons noté l'apparition ou l'accentuation de l'intensité et une augmentation de la distribution de l'immunoréactivité lorsque c'est le contingent bien différencié du carcinome à composante mucineuse qui métastasait. De même, lorsque la métastase reproduisait un adénocarcinome commun de moindre différenciation, la positivité s'accentuait (figure 6A). Les métastases d'un adénocarcinome mucineux étaient totalement négatives (figure 6B).

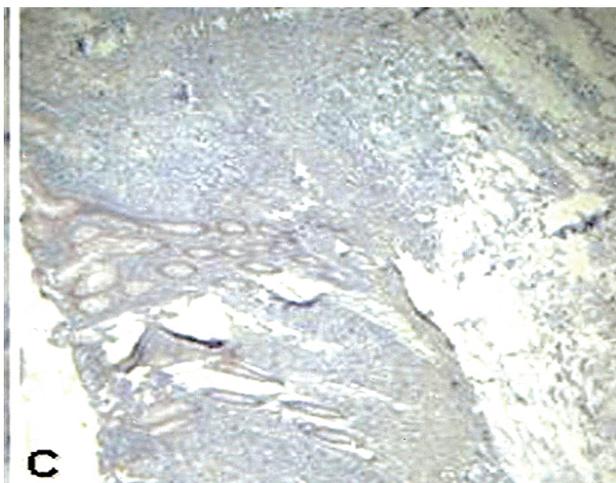
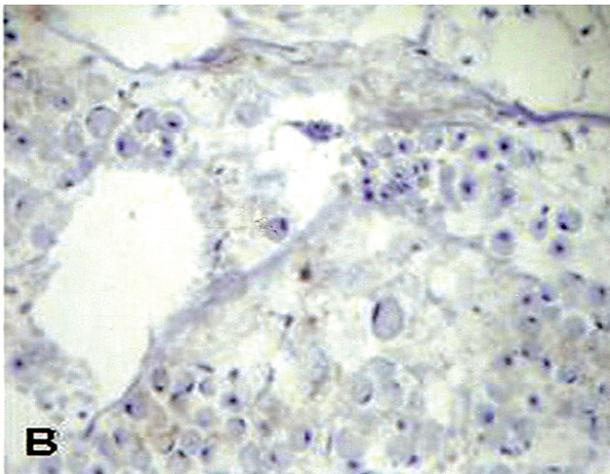
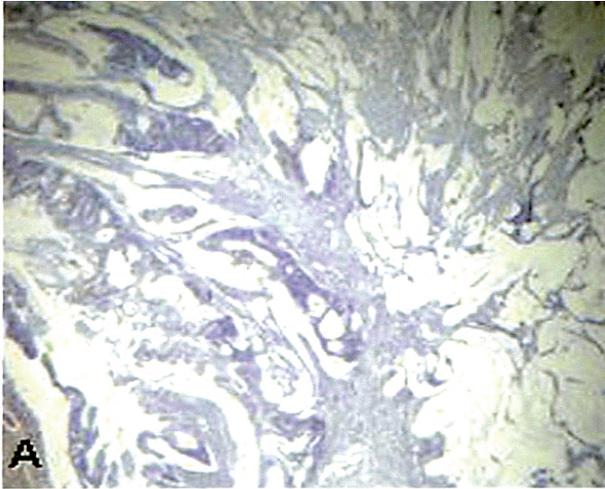
**Figure 2** : immunomarquage par l'anti-p73 au niveau d'un adénocarcinome moyennement différencié (P73X200),



**Figure 3** : immunomarquage par l'anti-p73 au niveau d'un adénocarcinome à cellules indépendantes (P73X400).



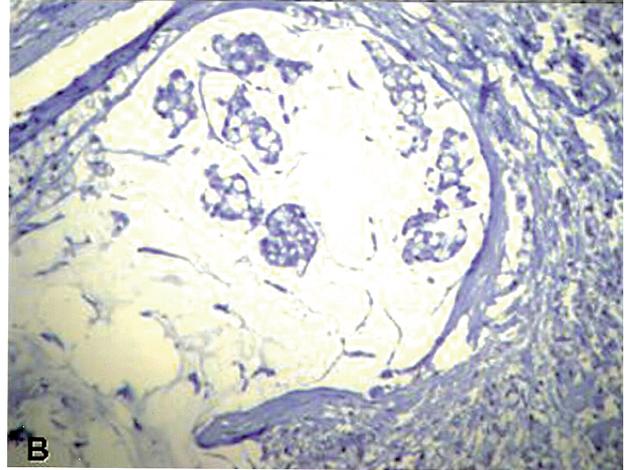
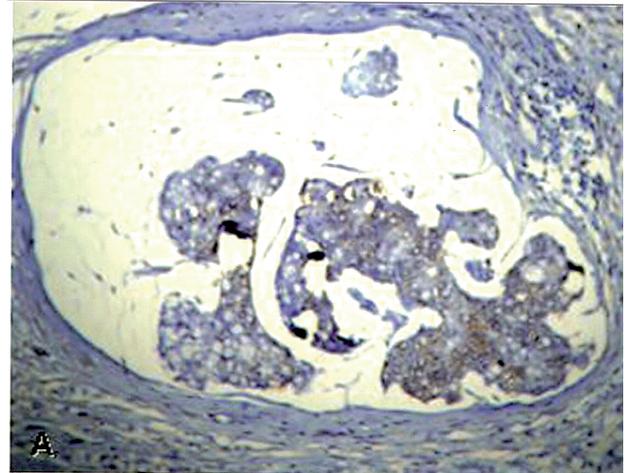
**Figure 4 :** Profil d'expression de l'anti-p73 A: faible positivité nucléaire des structures glanduliformes d'un adénocarcinome mucineux (P73X250); B: négativité d'un carcinome mucineux à cellules indépendantes (P73X400); C: Négativité d'un carcinome à cellules indépendantes contrastant avec la positivité du tissu sain (P73X100).



**Figure 5 :** Négativité de la composante mucineuse à l'anti-p73 au sein d'un adénocarcinome commun (P73X200).



**Figure 6 :** Immunomarquage à l'aide de l'anticorps anti-p73 au niveau de métastases hépatiques et ganglionnaires identique à la tumeur primitive : A: positivité dans les structures glanduliformes d'un adénocarcinome à composante mucineuse < à 50% (P73X250); B: Négativité au sein du carcinome mucineux (P73X250).



## DISCUSSION

L'analyse de nos résultats pour les adénocarcinomes communs montre un profil d'expression de p73 identique à celui rapporté par la majorité des études de la littérature. Certains auteurs ont ainsi démontré que la transcription de l'ARNm de p73 augmente dans la tumeur par rapport au tissu sain adjacent et ce dans plusieurs types de tumeur de l'organisme [4, 5, 6,7]. Par conséquent, la positivité nucléaire croissante, au niveau des adénocarcinomes communs dans notre série, proportionnellement au degré de différenciation décroissant et des métastases ganglionnaires ou hépatiques correspondantes éventuelles, confirme que p73 est un indicateur pronostique. En effet, plusieurs études ont indiqué que p73 est corrélé à un mauvais pronostic. Sun [8] a montré que l'hyper-expression de p73 est un facteur de mauvais pronostic pour les patients ayant un cancer colorectal. Tannapfel et al. [9], qui étudient le carcinome hépatocellulaire, ont montré que les patients avec une tumeur p73-positif ont un plus mauvais pronostic que ceux avec une tumeur p73-négative. Ainsi, l'hyper-expression de p73 serait un indicateur pronostique dans certains types et sous-types de cancers.

D'autres études sur différents cancers notamment celui du sein [10], du poumon [11, 12, 13], de la vessie [14], de l'oesophage [15], de l'estomac [16], du colon [17], de l'ovaire [18, 19, 20] et du foie [21] ainsi que sur le mélanome [22] et le neuroblastome [23] ont montré que la perte allélique, la transcription de l'ARNm, et la mutation du p73 ne sont pas des événements génétiques principaux dans la carcinogénèse et le développement tumoral. Le mécanisme par lequel la p73

jouerait son rôle de suppresseur de tumeur dans la carcinogénèse et le développement tumoral n'est pas encore élucidé.

L'originalité de ce travail réside à analyser l'expression de p73 dans les adénocarcinomes mucineux versus non mucineux et d'étudier la possibilité de son implication dans la carcinogénèse de ces néoplasmes qui sembleraient suivre des schémas distincts. De plus, l'individualisation d'un sous groupe d'adénocarcinome à composante mucineuse < à 50% classiquement intégré aux adénocarcinomes communs, vise à étayer cette hypothèse et à ressortir l'idée que ces adénocarcinomes à composante mucineuse < à 50% constitueraient probablement le stade initial des carcinomes mucineux et où le facteur temps conditionnerait l'augmentation progressive de la proportion du contingent mucineux. Dans ce cadre et même dans les adénocarcinomes mucineux à cellules indépendantes, la constatation de territoires superficiels d'adénocarcinomes peu différenciés à cellules indépendantes rejoint cette idée.

L'augmentation de l'expression de p73 pourrait être ainsi considérée comme un facteur pronostique pour les adénocarcinomes colorectaux non mucineux (adénocarcinomes communs et à cellules indépendantes) et comme un facteur étiopathogénique probable particulièrement pour les adénocarcinomes mucineux et à composante mucineuse. Des études similaires et moléculaires complémentaires seraient utiles pour vérifier ces résultats lesquels pourraient ouvrir des perspectives d'ordre thérapeutique ciblées en éclaircissant le génie évolutif souvent imprévisible de ces carcinomes.

## RÉFÉRENCES

1. Kaghad M, Bonnet H, Yang A, Creancier L, Biscan JC, Valent A, et al. Monoallelically expressed gene related to p53 at 1p36, a region frequently deleted in neuroblastoma and other human cancer. *Cell* 1997;90: 809-19.
2. Jost CA, Martin MC, Kaelin WG, Jr. p73 is a human p53-related protein that can induce apoptosis. *Nature (Lond.)* 1997;389: 191-4.
3. Sun XF. p73 Overexpression Is a Prognostic Factor in Patients with Colorectal Adenocarcinoma. *Clinical Cancer Research* 2002; 8:165-70.
4. Ichimiya S, Nimura Y, Kageyama H, Takada N, Sunahara M, Shishikura T et al. p73 at chromosome 1p36.3 is lost in advanced stage neuroblastoma but its mutation is infrequent. *Oncogene* 1999;18: 1061-6.
5. Sunahara M, Ichimiya S, Nimura Y, Takada N, Sakiyama S, Sato Y, et al. Mutational analysis of the p73 gene localized at chromosome 1p36.3 in colorectal carcinomas. *Int J Oncol* 1998;13: 319-23.
6. Takahashi H, Ichimiya S, Nimura Y, Watanabe M, Furusato M, Wakui S, et al. Mutation, allelotyping, and transcription analyses of the p73 gene in prostatic carcinoma. *Cancer Res* 1998;58: 2076-7.
7. Nomoto S, Haruki N, Kondo M, Konishi H, Takahashi T, Takahashi T, et al. Search for mutations and examination of allelic expression imbalance of the p73 gene at 1p36.33 in human lung cancers. *Cancer Res* 1998;58: 1380-3.
8. Sun XF. p73 overexpression is a prognostic factor in patient with colorectal adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 2002;8:165-70.
9. Tannapfel A, Wasner M, Krause K, Geissler F, Katalinic A, Hauss J, et al. Expression of p73 and its relation to histopathology and prognosis in hepatocellular carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1999;91:1154-8.
10. Zaika AI, Kovalev S, Marchenko ND, Moll UM. Overexpression of the wild type p73 gene in breast cancer tissues and cell lines. *Cancer Res* 1999;59:3257-63.
11. Mai M, Yokomizo A, Qian C, Yang P, Tindall DJ, Smith DI, et al. Activation of p73 silent allele in lung cancer. *Cancer Res* 1998; 58: 2347-9.
12. Tokuchi Y, Hashimoto T, Kobayashi Y, Hayashi M, Nishida K, Hayashi S, et al. The expression of p73 is increased in lung cancer, independent of p53 gene alteration. *Br J Cancer* 1999;80:1623-9.
13. Chi SG, Chang SG, Lee SJ, Lee CH, Kim JI, Park JH. Elevated

- and biallelic expression of p73 is associated with progression of human bladder cancer. *Cancer Res* 1999;59:2791-3.
14. Nimura Y, Mihara M, Ichimiya S, Sakiyama S, Seki N, Ohira M, et al. p73, a gene related to p53, is not mutated in esophageal carcinomas. *Int J Cancer* 1998;78:437-40.
  15. Kang MJ, Park BJ, Byun DS, Park JI, Kim HJ, Park JH, et al. Loss of imprinting and elevated expression of wild-type p73 in human gastric adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 2000;6:1767-71.
  16. Sunahara M, Ichimiya S, Nimura Y, Takada N, Sakiyama S, Sato Y, et al. Mutational analysis of the p73 gene localized at chromosome 1p36.3 in colorectal carcinomas. *Int J Oncol* 1998;13:319-23.
  17. Ng SW, Yiu GK, Liu Y, Huang LW, Palnati M, Jun SH, et al. Analysis of p73 in human borderline and invasive ovarian tumor. *Oncogene* 2000;19:1885-90.
  18. Chen CL, Ip SM, Cheng D, Wong LC, Ngan HY. p73 gene expression in ovarian cancer tissues and cell lines. *Clin Cancer Res* 2000;6:3910-5.
  19. Zwahlen D, Tschan MP, Grob TJ, Peters UR, Fink D, Haenggi W, et al. Differential expression of p73 splice variants and protein in benign and malignant ovarian tumours. *Int J Cancer* 2000;88:66-70.
  20. Herath NI, Kew MC, Whitehall VL, Walsh MD, Jass JR, Khanna KK, et al. p73 is up-regulated in a subset of hepatocellular carcinomas. *Hepatology* 2000;31:601-5.
  21. Kroiss MM, Bosserhoff AK, Vogt T, Buettner R, Bogenrieder T, Landthaler M, et al. Loss of expression or mutation in the p73 tumor suppressor gene are not involved in the pathogenesis of malignant melanomas. *Melanoma Res* 1998;8: 504-9.
  22. Kovalev S, Marchenko N, Swendeman S, LaQuaglia M, Moll UM. Expression level, allelic origin, and mutation analysis of the p73 gene in neuroblastoma tumors and cell lines. *Cell Growth Differ* 1998;9: 897-903.
  23. Pfeifer D, Ardman G, Sun X-F. Polymorphism of the p73 gene in relation to colorectal cancer risk and survival. *Carcinogenesis* 2005 26:103-107.