

Université de Montréal

**Détermination immunohistochimique de l'expression de p27^{kip1} dans les
tumeurs mammaires canines**

par

Sébastien Overvelde

Département de pathologie et microbiologie
Faculté de médecine vétérinaire

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade Maître ès Science
en sciences vétérinaires
option pathologie

Février 2004

© Sébastien Overvelde, 2004



SF

607

U54

2004

V.013

Direction des bibliothèques

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Détermination immunohistochimique de l'expression de p27^{kip1} dans les
tumeurs mammaires canines

présenté par :
Sébastien Overvelde

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Pierre Hélie, président-rapporteur
Michel Desnoyers, directeur de recherche
Christiane Girard, co-directrice
Bertrand Lussier, membre du jury

Résumé

La protéine p27 est un inhibiteur de kinases dépendantes des cyclines jouant un rôle important dans l'arrêt du cycle cellulaire. Dans le cancer du sein chez la femme, les cellules néoplasiques démontrent une perte d'expression de p27 étroitement associée au degré de malignité et au pronostic des tumeurs. En médecine vétérinaire, les tumeurs mammaires canines représentent un défi diagnostique, car leur malignité est parfois difficile à déterminer. Nous avons évalué l'expression de p27 par immunohistochimie dans 56 tumeurs mammaires canines (28 bénignes et 28 malignes). Pour chacune, un score p27 a été calculé selon l'intensité de la coloration et le nombre de cellules positives. Un marqueur de prolifération cellulaire, Ki67, a également été étudié. Le score p27 moyen des tumeurs malignes était significativement plus faible que celui des tumeurs bénignes ($p < 0.0001$). La sensibilité et la spécificité du score p27 étaient bonnes (89.3% et 85.7% respectivement lorsqu'un seuil de 6 était employé). Ce paramètre démontrait également une bonne répétitivité ($r = 0.98$). L'immunohistochimie pour la p27 pourrait donc être un outil diagnostique objectif complémentaire dans plusieurs cas de tumeurs mammaires canines. Bien que le taux de prolifération moyen (déterminé par l'expression de Ki67) était plus élevé dans les tumeurs malignes que dans les bénignes ($p < 0.026$), la sensibilité et la spécificité de ce paramètre étaient faibles (57.1% et 60.7% respectivement lorsqu'un seuil de 6.5% était employé). L'immunohistochimie pour la Ki67 n'est donc pas un outil diagnostique recommandable pour les néoplasmes mammaires canins. La corrélation entre les scores p27 et l'expression de Ki67 était pauvre ($r = -0.30$).

Mots-clés : p27, tumeurs mammaires, canin, immunohistochimie, Ki67, cycle cellulaire.

Abstract

The cyclin-dependant kinase inhibitor p27 is an important inhibitor of cell cycle progression. In women's breast cancer, a significant loss of p27 expression by neoplastic cells has been demonstrated to correlate well with the degree of malignancy and prognosis. Canine mammary tumors represent a diagnostic challenge for veterinary pathologists as malignancy may sometimes be difficult to determine. We evaluated p27 expression by immunohistochemistry in 28 benign and 28 malignant canine mammary tumors. For each, a p27 score was calculated according to the intensity and frequency of immunostaining. A marker of proliferation, Ki67, was also used. The mean p27 score of malignant tumors was significantly lower than that of benign tumors ($p < 0.0001$). Using a cut-off p27 score of 6, this method yielded good sensitivity (89.3%) and specificity (85.7%) in differentiating malignant from benign neoplasms. The p27 scores obtained from 2 independent observers showed good correlation ($r = 0.98$) indicating good repeatability. We conclude that p27 immunostaining could be useful as an objective complementary diagnostic tool to histopathology in challenging cases of canine mammary tumors. Although mean proliferation rates of malignant tumors, as determined by Ki67 expression, were significantly higher than those of benign tumors ($p < 0.026$), poor sensitivity and specificity were obtained (57.1% and 60.7%, respectively, with a cut-off proliferation rate of 6.5%), precluding the use of Ki67 immunostaining as a diagnostic tool for canine mammary tumors. The correlation between p27 scores and Ki67 expression was poor ($r = -0.30$).

Keywords: p27, mammary tumors, dog, immunohistochemistry, Ki67, cell cycle.

Table des matières

Résumé.....	iii
Abstract.....	iv
Table des matières.....	v
Liste des tableaux.....	viii
Liste des figures.....	ix
Liste des sigles et abréviations.....	x
Dédicace.....	xi
Remerciements.....	xii

INTRODUCTION.....	1
--------------------------	----------

CHAPITRE PREMIER : RECENSION DE LA LITTÉRATURE.....	6
--	----------

1. Le cycle cellulaire.....	7
1.1. Définition.....	7
1.2. Phases.....	7
1.3. Mécanismes de régulation.....	8
1.3.1. <i>Les cyclines et les CDK</i>	8
1.3.2. <i>Les points de contrôle</i>	9
1.3.3. <i>L'interface G1-S</i>	11
1.3.4. <i>La régulation des complexes cycline-CDK</i>	12
2. Le cycle cellulaire et la néoplasie.....	15
2.1. Principes généraux.....	15
2.2. Les anomalies du cycle cellulaire.....	16
2.2.1. <i>Généralités</i>	16
2.2.2. <i>Les CDKI</i>	16
3. La protéine p27.....	17
3.1. Mécanisme d'action sur le cycle cellulaire.....	17
3.2. Autres rôles.....	18
3.2.1. <i>Différenciation et développement</i>	18

3.2.2. Apoptose.....	18
3.2.3. Prolifération induite par les virus.....	19
4. p27 et néoplasie.....	19
4.1. Pathogénie.....	19
4.2. Observations en médecine humaine.....	20
4.3. Observations en médecine vétérinaire.....	20
4.3.1. p27 et tumeurs cutanées canines.....	21
4.3.2. p27 et lymphomes félins.....	21
4.4. Mécanismes de régulation des niveaux d'expression.....	22
4.4.1. La voie ubiquitine-protéasome.....	22
4.4.2. Mécanismes affectant l'expression de p27 dans les néoplasmes.....	23
4.5. p27 et cancer du sein.....	25
5. Les tumeurs mammaires canines.....	26
5.1. Épidémiologie.....	26
5.2. Difficultés diagnostiques.....	27
5.3. Classification.....	27
5.4. Pathogénie.....	28
6. Marqueurs de prolifération.....	28
7. But du projet.....	30

CHAPITRE DEUXIÈME : ARTICLE.....31

Expression of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27^{kip1} in benign and malignant mammary tumors of dogs.

Sébastien Overvelde DMV; Michel Desnoyers DMV, MSc, DACVP; Christiane Girard DMV, MSc, DACVP.

Université de Montréal, Faculté de Médecine Vétérinaire, Département de pathologie et microbiologie, 3200 rue Sicotte, C.P. 5000, Saint-Hyacinthe, Québec, J2S 7C6, Canada.

Soumis à : Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, Mars 2004.

Abstract.....	32
Introduction.....	33
Materials and Methods.....	36
Results.....	39
Discussion.....	41
Acknowledgements.....	45
Tables.....	46

Illustrations.....	48
Captions.....	49
Sources and manufacturers.....	50
References.....	51
CHAPITRE TROISIÈME : DISCUSSION GÉNÉRALE DES RÉSULTATS ET CONCLUSION.....	55
BIBLIOGRAPHIE.....	62

Liste des tableaux

Chapitre deuxième

Table I. Mean p27 scores and Ki67 expression (proliferation rate) of malignant tumors.

Table II. Mean p27 scores and Ki67 expression (proliferation rate) of benign tumors.

Liste des figures

Chapitre premier

Figure 1. Le cycle cellulaire et les complexes cycline-CDK qui assurent sa progression.

Figure 2. Le mécanisme de régulation de la protéine du rétinoblastome (pRb).

Figure 3. Les mécanismes d'activation des kinases dépendantes des cyclines (CDK).

Figure 4. La destruction de la p27 par la voie ubiquitine-protéasome.

Chapitre deuxième

Figure 1. Strong p27 immunostaining in epithelial cells of a benign canine mammary tumor.

Figure 2. Sharp contrast in p27 expression between malignant and non-neoplastic canine mammary cells.

Figure 3. Strong p27 immunostaining in epithelial cells of a benign canine mammary tumor.

Figure 4. Poor p27 immunostaining in epithelial cells of a malignant canine mammary tumor.

Figure 5. Rare Ki67-positive cells in a benign canine mammary tumor.

Figure 6. Frequent Ki67-positive cells in a malignant canine mammary tumor.

Liste des sigles et abréviations

ADN :	Acide désoxyribonucléique
AFX:	<i>ALL (acute lymphocytic leukemia) fused gene from chromosome X</i>
AgNOR :	<i>Silver-staining nucleolus organizer regions</i>
ARNm :	Acide ribonucléique messenger
CAK :	<i>CDK-activating kinase</i> ; kinase activant la CDK
CDC25 phosphatase :	<i>Cell division control 25 phosphatase</i>
CDK:	<i>Cyclin-dependant kinase</i> ; kinase dépendante des cyclines
CDKI :	<i>Cyclin-dependant kinase inhibitor</i> ; inhibiteur des kinases dépendantes des cyclines
Cip/Kip:	<i>CDK/kinase inhibitory protein</i> ; protéine inhibant la CDK/kinase
FKHR:	<i>Forkhead homolog rhabdomyosarcoma</i>
FKHR-L1 :	<i>Forkhead homolog rhabdomyosarcoma-like 1</i>
GRB2:	<i>Growth factor receptor-bound protein 2</i> ; protéine liée au récepteur pour le facteur de croissance 2
HER2:	<i>Human epidermal growth factor (EGF) receptor 2</i> ; récepteur humain pour l'EGF 2.
INK4:	<i>Inhibitor of CDK 4</i> ; inhibiteur de CDK 4
JAB1 :	<i>Jun activation domain-binding protein 1</i>
KAP :	<i>CDK-associated protein phosphatase</i> ; phosphatase associée à CDK
MAPK :	<i>Mitogen-activated protein kinase</i> ; protéine kinase activée par les signaux mitogènes.
PCNA:	<i>Proliferating cell nuclear antigen</i>
PCR :	<i>Polymerase chain reaction</i>
pRb:	Protéine du rétinoblastome
PTEN :	<i>Phosphatase and tensin homolog</i>
SKP2 :	<i>S-phase kinase-associated protein 2</i> ; protéine associée à la kinase en phase S, 2
TGF- β :	<i>Tumor growth factor-β</i>
VHL:	Von-Hippel-Lindau

Dédicace

*À Anne-Catherine,
pour ton support et ta patience au cours des trois dernières années.*

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Dr Michel Desnoyers, mon superviseur à la résidence et directeur de recherche, pour son implication tout au long de ce projet et au cours de ma formation en pathologie clinique. Sa passion pour ce domaine, son dévouement, l'étendue de ses connaissances et la qualité de son travail représentent pour moi une grande source d'inspiration.

À ma co-directrice, Dre Christiane Girard, pour sa patience et son dur labeur durant plusieurs semaines lors de la révision des diagnostics histopathologiques ainsi que pour ses précieux conseils dans l'interprétation des résultats et la rédaction de l'article.

À Dr Pierre Hélie pour avoir révisé plusieurs lames de tumeurs mammaires lorsqu'une troisième opinion était nécessaire.

À Dre Caroline Piché pour son assistance dans le développement du protocole immunohistochimique utilisé durant ce projet.

À Dr Christian Bédard pour ses judicieux conseils concernant la rédaction de ce mémoire.

À Dre Monique Doré pour m'avoir généreusement accueilli dans son laboratoire.

À M. Guy Beauchamp, pour son aide précieuse dans l'analyse statistique des données.

Enfin, je remercie le Fonds du Centenaire de la Faculté de Médecine Vétérinaire qui a assuré le financement de ce projet.

Introduction

En 2000, un comité *ad hoc* a été mis sur pied par l'American College of Veterinary Pathologists (ACVP) afin de promouvoir l'étude et l'évaluation de nouvelles techniques diagnostiques pour les néoplasmes chez les animaux domestiques. La vision adoptée par ce comité est de procurer des bases morphologiques, immunologiques et moléculaires en pathologie vétérinaire qui conviennent aux besoins diagnostiques et pronostiques des praticiens traitant les animaux atteints de cancer. Plusieurs oncologues interrogés par ce comité ont d'ailleurs indiqué que, selon eux, les outils diagnostiques moléculaires seront éventuellement plus utiles que l'examen histopathologique dans la détermination du plan de traitement et du pronostic des tumeurs en médecine vétérinaire. Parmi la liste des sujets plus spécifiquement ciblés par ce comité, on trouve l'étude des tumeurs mammaires et l'étude immunohistochimique des néoplasmes (McGill et al 2002).

L'étude des tumeurs mammaires chez le chien possède un intérêt certain étant donné leur fréquence élevée et leur classification histopathologique parfois difficile. En effet, le cancer de la glande mammaire est le type de néoplasme malin le plus fréquent chez la chienne et son taux d'incidence annuelle est estimé à environ 198/100 000 (Misdorp 2002). De façon générale, on considère qu'environ 50% de ces tumeurs sont malignes (Rutteman et al 2001, Henson 2001, Morrison 1998), mais certains auteurs estiment plutôt ce chiffre à 30% (Misdorp 2002). Les tumeurs mammaires canines sont souvent composées de populations cellulaires hétérogènes démontrant une anaplasie et une invasion tissulaire parfois très focalisées de sorte que leur malignité est parfois difficile à déterminer à l'histopathologie. Il semble aussi qu'il existe une certaine mésentente au sein des pathologistes vétérinaires quant aux critères de malignité utilisés dans le diagnostic de ce type de tumeur (Rutteman et al 2001). Ces difficultés justifient le besoin de développer des méthodes complémentaires plus objectives et plus fiables qui faciliteraient la classification de ces néoplasmes. Aussi, l'établissement de corrélations entre ces nouveaux marqueurs et le pronostic des tumeurs pourrait grandement influencer le traitement des patients. Ces dernières années, les marqueurs du cycle cellulaire se trouvent parmi les molécules les plus étudiées pour leur implication dans la carcinogénèse, particulièrement en médecine humaine. Leur utilité diagnostique et pronostique a d'ailleurs été prouvée pour maints types de cancer (MacLachlan et al 1995, Lee et Yang 2001).

Le cycle cellulaire représente l'ensemble des événements qui se produisent dans une cellule en division, incluant la réplication du matériel génétique et la ségrégation chromosomale. Il s'agit d'un processus complexe comprenant plusieurs étapes et dont l'exécution est étroitement modulée par l'interaction séquentielle de molécules particulières : les cyclines et les kinases dépendantes des cyclines (CDK) (Schafer 1998, Cotran et al 1999). L'influence de ces dernières fait aussi l'objet de mécanismes régulateurs qui constituent l'accélérateur ou le frein favorisant ou ralentissant la progression du cycle cellulaire selon les signaux perçus par la cellule (Lee et Yang 2001). Par exemple, la détection de dommages à l'ADN déclenche généralement l'arrêt temporaire du cycle cellulaire afin de permettre la réparation du matériel génétique altéré, évitant ainsi la réplication d'une cellule mutante. Ce type d'interruption est modulé par des molécules ayant une action inhibitrice sur les cyclines et les CDK, les inhibiteurs de CDK (CDKI) (Slingerland et Pagano 2000, Lee et Yang 2001, Schafer 1998). Parmi ces inhibiteurs, on retrouve la protéine p27 dont le rôle est d'empêcher ou de retarder la progression de la cellule dans le cycle cellulaire lorsque nécessaire.

Par définition, un néoplasme est un tissu anormal qui croît par prolifération cellulaire généralement rapide et dont la croissance se poursuit après le retrait du stimulus qui l'a initiée (Schafer 1998). Bien que d'innombrables recherches aient démontré que l'origine de cette multiplication incontrôlée est sans doute multifactorielle et que les néoplasmes présentent une hétérogénéité indéniable (MacLachlan et al 1995), il semble que des anomalies du cycle cellulaire soient fréquemment impliquées (Lee et Yang 2001, Sgambato et al 2000). En effet, les cellules néoplasiques acquièrent fréquemment, durant leur transformation, la capacité de synthétiser des molécules diverses pouvant stimuler leur entrée et leur progression dans le cycle cellulaire malgré l'absence de signaux mitogènes exogènes. Dans d'autres cas, ce sont les mécanismes de régulation du cycle cellulaire eux-mêmes qui semblent atteints. Les molécules à la base des mécanismes de régulation du cycle cellulaire, telles que les cyclines, les CDK et les CDKI font donc l'objet de nombreuses études visant à déterminer si une augmentation ou une diminution de leur expression contribue à la prolifération cellulaire incontrôlée lors de cancers (MacLachlan et al 1995, Lee et Yang 2001). Dans le cas des CDKI, comme la p27, leur rôle dans la carcinogénèse serait attribué à une diminution de leur expression causant une inhibition des

mécanismes de freinage du cycle cellulaire (Lloyd et al 1999, Slingerland et Pagano 2000, Sgambato et al 2000).

L'immunohistochimie permet l'étude des anomalies du cycle cellulaire dans les tissus néoplasiques. Il s'agit d'une technique mettant en évidence la présence de protéines (désignées antigènes) sur des coupes histologiques à l'aide d'anticorps étiquetés. Grâce à cette technique, plusieurs patrons de dérèglements de marqueurs du cycle cellulaire ont été observés avec une fréquence particulière dans certains types de néoplasmes humains (Lee et Yang 2001, MacLachlan et al 1995, Cotran et al 1999). Les taux d'expression de p27 ont été étudiés dans une vaste gamme de tumeurs et, dans une grande majorité de cas, une perte de cette expression semble corrélée avec le phénotype malin et représente un marqueur pronostique négatif (Slingerland et Pagano 2000, Lloyd et al 1999, Sgambato et al 2000). Plusieurs études portant sur le cancer du sein ont ainsi permis de démontrer qu'une faible expression de p27 dans ces néoplasmes est associée à un degré de malignité plus élevé et à un pronostic défavorable (Sgambato et al 1997, Tan et al 1997, Porter et al 1997, Catzavelos et al 1997). Cette perte d'expression a également été corrélée avec une période de rémission après traitement ainsi qu'un temps de survie général plus courts (Catzavelos et al 1997). D'ailleurs, on considère aujourd'hui en médecine humaine que le degré d'expression de p27 est un critère pronostique plus fiable que le grade histologique et que d'autres marqueurs précédemment employés tels que les niveaux d'expression de la protéine p53 (Porter et al 1997).

En médecine vétérinaire, la détermination immunohistochimique des niveaux d'expression de la p27 dans les néoplasmes n'a été effectuée, à notre connaissance, qu'à deux reprises (Madewell et al 2001, Sakai et al 2001) et jamais encore sur les tumeurs mammaires canines. Si l'étude de ce type de néoplasme démontrait des résultats similaires à ceux observés dans le cancer du sein chez l'humain, il pourrait s'agir d'un outil diagnostique complémentaire qui pourrait grandement influencer le traitement des patients ainsi qu'aider à mieux classifier certaines tumeurs mammaires.

Le but de notre étude est donc de tester l'hypothèse suivante : le taux d'expression de la protéine p27 dans les tumeurs mammaires canines malignes est significativement

inférieur à celui des tumeurs bénignes, établissant ainsi une corrélation entre ce marqueur du cycle cellulaire et le degré de malignité pour ce type de néoplasme.

Pour tester cette hypothèse, les objectifs seront les suivants : 1) mettre au point une méthode immunohistochimique permettant l'évaluation des niveaux d'expression de la p27 dans le tissu mammaire canin 2) déterminer les taux d'expression de p27 dans les tissus canins mammaires sains ainsi que dans les tumeurs mammaires bénignes ou malignes, 3) évaluer l'utilité de l'expression de cette protéine dans la classification des tumeurs mammaires canines, et 4) comparer l'expression de la p27 à celle d'un marqueur de prolifération cellulaire, la protéine Ki-67.

Chapitre premier

Recension de la littérature

1. Le cycle cellulaire

1.1. Définition

Le cycle cellulaire consiste en une suite d'événements moléculaires impliqués dans la réplication des cellules. Le rôle ultime de ce processus est d'orchestrer les étapes nécessaires à la formation de deux cellules-filles à partir d'une cellule-mère initiale (Schafer 1998). Il s'agit d'un processus d'une grande importance dans de nombreux mécanismes physiologiques et pathologiques stimulant la prolifération cellulaire tels que la croissance et le développement, la réparation des tissus, l'hyperplasie et la néoplasie. L'entrée de la cellule dans le cycle cellulaire peut être déclenchée par une grande variété de facteurs de croissance ou par une inhibition de signaux anti-mitogènes. La transduction de ces signaux extra-cellulaires aux milieux intra-cellulaire et nucléaire est ensuite assurée par une chaîne d'interactions moléculaires impliquant des récepteurs cellulaires, des messagers intra-cellulaires et des facteurs de transcription. Si le stimulus mitogène est suffisant, il mène à la division cellulaire en déclenchant l'initiation du cycle cellulaire (Schafer 1998, Cotran et al 1999).

1.2. Phases

Le cycle cellulaire comprend 4 phases : G1 (gap1), S (synthèse), G2 (gap2) et M (mitose) (Cotran et al 1999, Schafer 1998, Cockerell et Cooper 2002) (figure 1). Les cellules qui ne sont pas en réplication, aussi appelées cellules quiescentes, sont à l'extérieur du cycle cellulaire, en phase G0 (Cotran et al 1999). Lorsqu'elle reçoit des signaux mitogènes adéquats, la cellule stimulée débute le cycle cellulaire en phase G1 durant laquelle elle se prépare à la réplication du matériel génétique. La synthèse d'ADN se déroule ensuite au cours de la phase suivante, S. Par la suite, la cellule passe en phase G2 où elle se prépare à la ségrégation des chromosomes. La mitose, incluant la prophase, la métaphase, l'anaphase et la télophase, est ensuite accomplie durant la phase M, ce qui complète le cycle cellulaire (Schafer 1998). Une fois la réplication terminée, selon l'action nette des divers signaux mitogènes et anti-mitogènes qui l'influencent, la cellule peut alors soit recommencer le cycle cellulaire en phase G1 et se diviser à nouveau, soit se retirer du cycle cellulaire en entrant en phase G0 pour y attendre la prochaine division ou pour s'y différencier. La durée de chacune des phases du cycle est variable d'un type cellulaire à un

autre, mais, de façon générale, dans les cultures cellulaires, les phases G1, S, G2 et M durent environ 16, 6, 6 et 0.5 heures respectivement, pour une durée totale approximative de 24 heures (Cockerell et Cooper 2002)

1.3. Mécanismes de régulation

La progression des cellules dans le cycle cellulaire est étroitement contrôlée par une série d'interactions moléculaires qui permettent une orchestration précise des diverses étapes critiques de ce processus complexe. Ces mécanismes de régulation sont requis pour assurer l'accomplissement des phases précédentes, évitant ainsi la multiplication de cellules endommagées ou recelant un matériel génétique dont la réplication est incomplète (Elledge et Harper 1994). Grâce à ces mécanismes, le cycle cellulaire peut être temporairement arrêté pour donner le temps à la cellule de procéder aux réparations requises si une anomalie est détectée (Cotran et al 1999). Lorsque la cellule est incapable de se rétablir, elle est éliminée par l'induction des mécanismes internes menant à l'apoptose. D'autres facteurs, tel que la taille et la nutrition cellulaires, peuvent également influencer l'induction et la durée du cycle cellulaire (Schafer 1998).

1.3.1. Les cyclines et les CDK

Le déroulement ordonné du cycle cellulaire est contrôlé par l'interaction de deux familles de protéines : les cyclines et les kinases dépendantes des cyclines (CDK). Il existe plusieurs types de cyclines (A à H) et de CDK (1 à 9) (Sgambato et al 2000). Les plus importantes dans la régulation du cycle cellulaire sont sans doute les cyclines A, B, D et E ainsi que les CDK 1, 2, 4 et 6. En réalité, ce sont les CDK qui permettent la progression du cycle cellulaire, mais, pour y arriver, elles doivent préalablement se lier avec les cyclines qui les activent par phosphorylation (Schafer 1998, Slingerland et Pagano 2000, Sgambato et al 2000). Les cyclines renferment également des signaux moléculaires de localisation nucléaire qui ne sont pas présents sur les CDK. La formation de complexes avec ces dernières permet ainsi leur translocation vers le noyau de la cellule où elles exercent leur action (Schafer 1998). C'est l'interaction séquentielle de cyclines bien spécifiques avec les CDK appropriées, à des moments précis du cycle cellulaire, qui permet l'enchaînement des différentes phases. En effet, chacune des étapes du cycle ne peut être initiée que si les étapes précédentes ont été complétées avec succès (Elledge et Harper 1994). Lorsque la cellule débute le cycle cellulaire, il y a formation de complexes cycline D-CDK4 et cycline

D-CDK6 qui permettent la progression en phase G1. Des complexes cycline E-CDK2 apparaissent vers la fin de cette phase. C'est l'action combinée de ces trois complexes cycline-CDK qui permet à la cellule de passer en phase S. Au cours de cette phase, les complexes cycline-CDK de la phase précédente sont détruits et de nouveaux complexes naissent entre la cycline A et les CDK 2 et 1 qui signalent à leur tour la progression du cycle cellulaire. En phase G2, ces complexes sont dégradés et il y a formation de complexes cycline B-CDK1 qui permettent la transition en phase M. Ces derniers sont à leur tour éliminés durant cette dernière phase du cycle cellulaire (Cotran et al 1999, Schafer 1998) (figure 1).

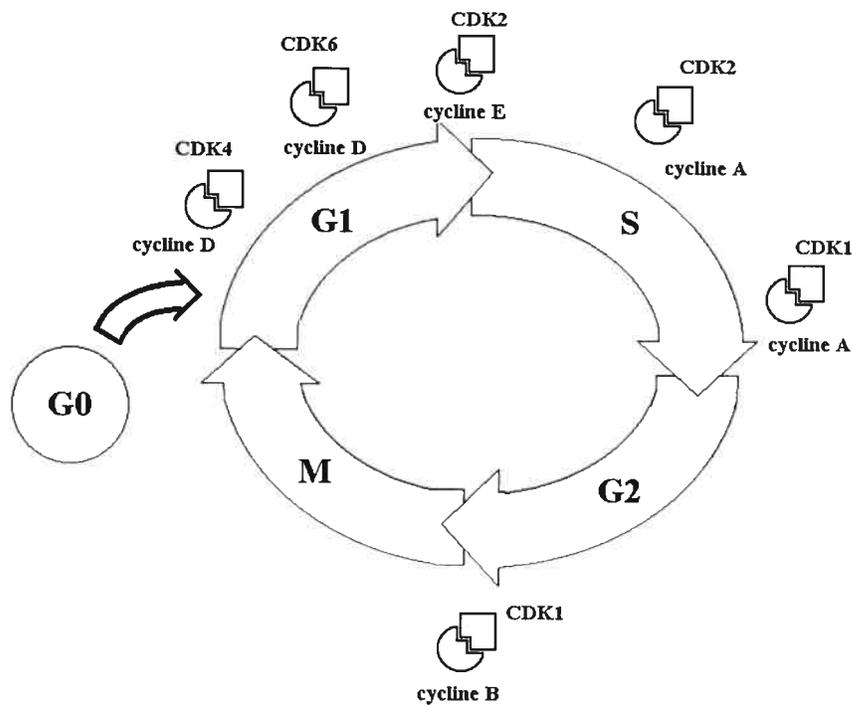


Figure 1. Le cycle cellulaire. La cellule qui n'est pas en prolifération (G0) entre dans le cycle cellulaire en phase G1 et franchira par la suite les phases S, G2 et M. Des complexes cycline-CDK précis modulent séquentiellement la progression de la cellule dans le cycle.

1.3.2. Les points de contrôle

La transition entre les phases G1 et S est assurée par l'action des complexes cycline-CDK sur la protéine du rétinoblastome (pRb). Dans les cellules quiescentes, celle-ci se trouve liée à une autre protéine, E2F, dans un état hypophosphorylé; en effet, la formation

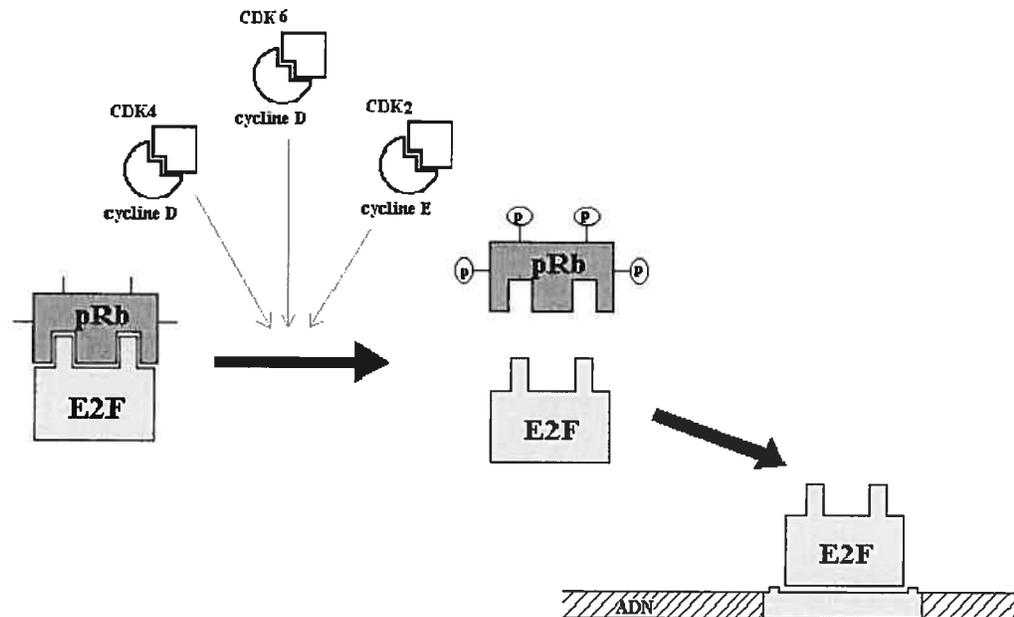


Figure 2. Rôle de la pRb au point de transition G1-S. La pRb lie la protéine E2F dans un état hypophosphorylé. Sa phosphorylation par les complexes cycline-CDK appropriés entraîne la libération de E2F qui active la transcription des gènes, initiant ainsi la synthèse d'ADN et la réplication du matériel génétique.

1.3.2. L'interface G1-S

L'interface G1-S est particulièrement important dans la régulation du cycle cellulaire, car il représente un point de non-retour. Durant la phase G1, les niveaux de cycline D augmentent graduellement. Puisque cette protéine a une durée de vie relativement courte (demie-vie de 25 minutes), la cellule doit constamment être exposée aux signaux mitogènes pour que la synthèse de cycline D soit suffisante pour lui permettre de poursuivre dans le cycle cellulaire (Sherr et Roberts 1995). Si le stimulus initial faiblit ou disparaît, le cycle cellulaire est arrêté et la cellule peut revenir en phase G0. Cependant, si le stimulus persiste, les complexes cycline D-CDK4 et cycline D-CDK6 permettront à la cellule de franchir le point de restriction en fin de phase G1. En franchissant ce seuil, la cellule s'engage à compléter le reste du cycle cellulaire, même en l'absence des facteurs de croissance qui l'ont déclenché (Elledge et Harper 1994), faute de quoi, elle devra subir l'apoptose. Le franchissement de ce point de restriction dépend de l'état de phosphorylation

de complexes cycline-CDK adéquats permet la phosphorylation de pRb, ce qui libère E2F. Cette dernière active ensuite la transcription des gènes nécessaires à la réplication de l'ADN (Schafer 1998, Cotran et al 1999, MacLachlan et al 1995, Sgambato et al 2000) (figure 2). Quant au point de transition entre G2 et M, il est contrôlé majoritairement par le complexe cycline B-CDK1. Celui-ci exerce principalement son rôle par la phosphorylation de la protéine histone H1. Cela permet l'incorporation de l'enzyme ADN topoisomérase II dans les chromosomes qui provoque la condensation de l'ADN. Le complexe cycline B-CDK1 est d'ailleurs également impliqué dans la formation du fuseau mitotique et dans la dégradation de l'enveloppe nucléaire en empêchant la polymérisation de la laminine qui la compose (Schafer 1998, Cotran et al 1999, MacLachlan et al 1995).

Cette suite d'événements moléculaires est indispensable à l'orchestration stricte de la réplication de l'ADN et de la ségrégation des chromosomes. Ainsi, la précision exceptionnelle de ces mécanismes de contrôle permet l'interruption temporaire du cycle cellulaire en cas de problème. Les points de transition entre les phases G1-S et G2-M représentent deux points de contrôle critiques où le cycle cellulaire peut être stoppé si nécessaire (Cotran et al 1999, Schafer 1998). À l'interface entre les phases G1 et S, la détection d'irrégularités dans l'ADN de la cellule cause l'arrêt en G1 pour permettre à la cellule de procéder à la réparation des dommages avant de débiter la synthèse et la réplication en phase S. Entre les phases G2 et M, le cycle cellulaire peut être retardé en G2 si des aberrations dans l'intégrité des chromosomes sont décelées, de façon à assurer leur réparation avant la séparation des chromosomes en phase M. Des délais en phase S peuvent également se produire afin de ralentir la synthèse de l'ADN en cas de besoin (Schafer 1998).

de la pRb, tel que discuté précédemment. Il est aussi important de noter que le complexe cycline E-CDK2 est essentiel pour permettre à la cellule de terminer la fin de la phase G1 et d'entrer en phase S. En effet, des études ont démontré que les cellules mammaliennes modifiées de sorte à ne pas posséder de pRb fonctionnelle doivent obligatoirement recourir à l'action de la cycline E, mais non à celle de la cycline D, pour passer de la phase G1 à la phase S (Sherr et Roberts 1995). Le mécanisme d'action exact qui rend le complexe cycline E-CDK2 indispensable pour passer en phase S est encore mal compris. Certains auteurs rapportent que, bien que ce complexe puisse vraisemblablement contribuer à la phosphorylation de la protéine Rb en fin de phase G1, il phosphoryle probablement aussi d'autres substrats dont le rôle serait de déclencher la réplication de l'ADN une fois le point de restriction franchi (Sherr et Roberts 1995).

1.3.4. La régulation des complexes cycline-CDK

L'interaction des cyclines et des CDK représente donc l'accélérateur qui permet la progression du cycle cellulaire. Des mécanismes de freinage existent également afin d'éviter une progression indéfinie du cycle cellulaire et de permettre l'arrêt en cas de problème (Lee et Yang 2001). Trois mécanismes régulateurs existent :

- Tout d'abord, les cyclines ne sont pas continuellement présentes dans la cellule. Comme leur nom l'indique, leur synthèse est cyclique et n'est stimulée qu'à des moments bien précis du cycle cellulaire, de sorte qu'elles ne sont disponibles pour interagir avec les CDK qu'au moment opportun. Après l'action du complexe cycline-CDK, la cycline est rapidement détruite (Schafer 1998, Sgambato et al 2000) (figure 3).
- Les CDK, quant à elles, ne sont pas synthétisées uniquement de façon intermittente, mais plutôt à un rythme constant afin qu'elles soient présentes à des niveaux relativement stables, quel que soit le stade de prolifération de la cellule. Leur régulation est effectuée par l'état de phosphorylation de certains de leurs résidus d'acides aminés (Sgambato et al 2000). Ainsi, la phosphorylation de certains résidus thréonine de la boucle T des CDK, par une enzyme kinase activant le CDK (CAK), stimule leur activité suite à leur liaison avec les cyclines. D'un autre côté, la déphosphorylation de ce résidu par une protéine phosphatase associée aux CDK (KAP) l'inhibe. La position de ce résidu thréonine peut varier d'une CDK à une autre. Sur la CDK2 humaine, il est situé

en position 160 (T160). D'autres résidus sont également impliqués dans la modulation de l'activité des CDK selon leur état de phosphorylation. En effet, la déphosphorylation des résidus thréonine 14 (T14) et tyrosine 15 (Y15) par la protéine CDC25 phosphatase stimule l'activité des CDK, alors que leur phosphorylation par les kinases Wee1 les inhibe (Schafer 1998, Lee et Yang 2001) (figure 3).

- Enfin, l'action des CDK et des complexes cycline-CDK peut être inhibée par leur liaison avec des inhibiteurs de CDK (CDKI). Deux familles de CDKI existent : INK4 et Cip/Kip. Les inhibiteurs de la famille INK4 incluent les protéines p15, p16, p18 et p19. Celles-ci compétitionnent avec la cycline D pour les sites de liaison sur les CDK4 et 6, exerçant ainsi l'arrêt du cycle cellulaire en G1. La famille Cip/Kip comprend les protéines p21, p27 et p57 (Schafer 1998, Lee et Yang 2001, Slingerland et Pagano 2000, Sgambato et al 2000). Leur action inhibitrice est due à leur association avec les CDK qui sont liées à des cyclines (figure 3). Contrairement aux INK4, les sites de liaison des Cip/Kip sur les CDK ne sont pas les mêmes que ceux sur lesquels se lient les cyclines. Ainsi, l'action nette de la CDK ne résulte pas d'une compétition entre les cyclines et les CDKI, mais bien de l'équilibre entre les quantités de cycline et de CDKI présentes (Sherr et Roberts 1995). Les protéines Cip/Kip ont un spectre d'action beaucoup plus large que les protéines INK4 (Schafer 1998, Sgambato et al 2000). En effet, elles peuvent inactiver tous les complexes cycline-CDK impliqués dans le cycle cellulaire. Bien que leur structure d'acides aminés démontrent une homologie considérable, ces protéines possèdent néanmoins des propriétés fonctionnelles distinctes. La protéine p21 possède d'ailleurs une fonction particulière étroitement liée à une autre protéine très importante dans la régulation du cycle cellulaire, p53. Cette dernière surveille constamment l'intégrité du matériel génétique et, lorsqu'une anomalie est détectée, elle stimule la synthèse de la protéine p21, entraînant ainsi l'arrêt du cycle cellulaire. C'est aussi la protéine p53 qui stimulera l'apoptose en cas d'échec de la réparation (Schafer 1998, MacLachlan et al 1995, Cotran et al 1999).

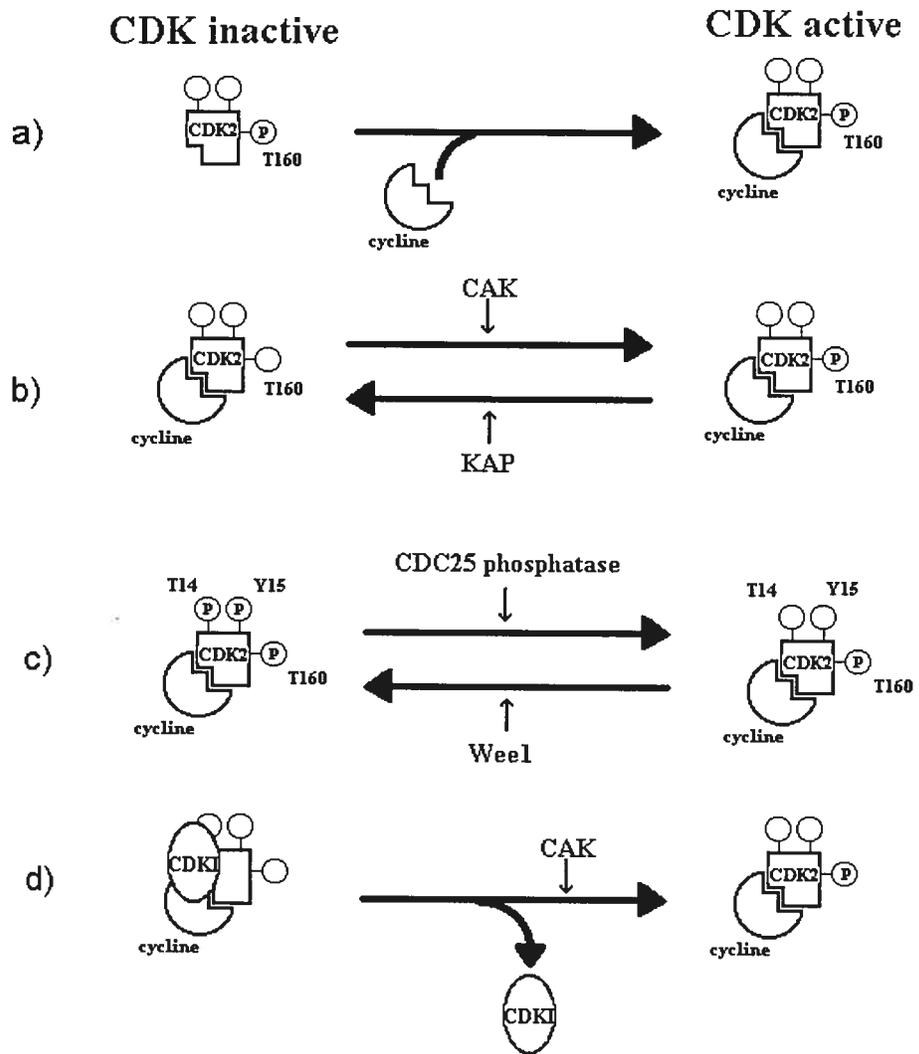


Figure 3. Mécanismes de régulation de l'activité des CDK : a) la liaison avec la cycline; b) et c) la modulation de l'état de phosphorylation des résidus T160, T14 et Y15; d) l'inhibition par le CDKI.

2. Le cycle cellulaire et la néoplasie

2.1. Principes généraux

Au cours des dernières années, l'association entre les anomalies dans la régulation du cycle cellulaire et le développement de néoplasmes a été rigoureusement investiguée. Par définition, le cancer représente une condition pathologique durant laquelle les cellules perdent le contrôle de leur propriétés prolifératives menant à une division cellulaire rapide et incontrôlée, à l'augmentation des capacités de survie des cellules et, finalement, à l'invasion des tissus adjacents. Ceci s'accompagne généralement d'une dé-différenciation et d'une accumulation d'altérations génétiques (MacLachlan et al 1995). Évidemment, les mécanismes responsables de cette transformation sont très variés et généralement multifactoriels, de sorte que la carcinogénèse des néoplasmes est très hétérogène (MacLachlan et al 1995). Il a cependant été constaté que les irrégularités du cycle cellulaire associées à une prolifération cellulaire incontrôlée constituent une des altérations les plus fréquemment rencontrées lors de la transformation néoplasique des cellules (Lee et Yang 2001, Sgambato et al 2000, MacLachlan et al 1995). Dans certains cas, l'activation d'oncogènes ou la suppression de gènes onco-suppresseurs peut entraîner des anomalies dans la transmission de signaux mitogènes, menant à la stimulation exagérée d'un cycle cellulaire pourtant normal. L'augmentation de l'expression de facteurs de croissance, de leurs récepteurs, de protéines impliquées dans la transduction intra-cytoplasmique des signaux et des activateurs de transcription, de même qu'une diminution de l'expression de leurs inhibiteurs sont des exemples de ces anomalies (Cotran et al 1999, Schafer 1998). Des anomalies aux points de contrôle du cycle cellulaire peuvent aussi survenir, causant une prolifération malgré l'absence de signaux mitogènes adéquats et/ou la présence de matériel génétique endommagé. Ainsi, non seulement ces anomalies entraînent-elles une division cellulaire incontrôlée, mais elles contribuent également à l'accumulation d'altérations génétiques (MacLachlan et al 1995). Ces irrégularités du cycle cellulaire peuvent être associées à un déséquilibre dans les niveaux de cyclines, de CDK ou de CDKI (Cotran et al 1999). L'expression de ces protéines est étudiée avec grand intérêt afin de tenter de détecter si certains types de cancers sont fréquemment associés à des types de

dérangements du cycle cellulaire plus spécifiques, indiquant leur contribution possible dans la transformation néoplasique des cellules (MacLachlan et al 1995).

2.2. Les anomalies du cycle cellulaire

2.2.1. Généralités

Une des méthodes les plus utilisées pour évaluer l'expression des protéines ciblées est l'immunohistochimie. Cette technique permet de mettre en évidence la présence de protéines (désignées antigènes) sur des coupes histologiques de tissu en incubant celles-ci avec un anticorps étiqueté. L'examen microscopique des tissus, après l'incubation avec un révélateur, indique la localisation de la protéine et l'intensité de la coloration permet une estimation semi-quantitative des concentrations de protéines présentes. L'utilisation de cette technique a permis plusieurs découvertes importantes, tant en médecine humaine qu'en médecine vétérinaire. Par exemple, il a été démontré en médecine humaine, que la surexpression du gène codant pour la cycline D est une altération fréquente dans le cancer du sein et les carcinomes spino-cellulaires de la tête et du cou (Schafer 1998), alors qu'une amplification du gène codant pour CDK4 survient fréquemment dans les mélanomes et les glioblastomes (MacLachlan et al 1995). Ces irrégularités permettent aux cellules transformées de former des complexes cycline-CDK de façon autonome, autorisant le franchissement du point de transition G1-S malgré l'absence de signaux mitogènes adéquats et malgré la présence de dommages à l'ADN. Ceci entraîne par la suite une prolifération cellulaire incontrôlée. La liste d'aberrations des niveaux de cycline et de CDK dans divers types de tumeurs ne cesse de croître.

2.2.2. Les CDKI

Un autre type de dérèglement du cycle cellulaire qui a été associé au développement de cancers est la perte d'expression des CDKI. Ceci entraîne un manque d'inhibition des complexes cycline-CDK et résulte en l'incapacité d'arrêter le cycle cellulaire; il s'ensuit une prolifération cellulaire incontrôlée. Ce type d'anomalie a été recensé dans les deux familles de CDKI. Par exemple, des études ont démontré que le gène codant pour la protéine p16 est fréquemment muté dans les mélanomes, les mésothéliomes, les leucémies lymphocytaires aiguës, les ostéosarcomes, les carcinomes rénaux et plusieurs autres types de néoplasmes (Lee et Yang 2001). D'autres recherches ont mis en évidence que la méthylation de la région promotrice du gène codant pour la protéine p15 joue un rôle

important dans le développement de cancers hématopoïétiques (Lee et Yang 2001). Quant à la p21, bien que son rôle dans la carcinogénèse semble encore nébuleux et bien que des études démontrent des résultats contradictoires quant à ses niveaux d'expression dans les tumeurs, une diminution de son expression a été corrélée avec le pouvoir invasif et métastatique de certains types de cancer (Lee et Yang 2001). Une des CDKI les plus étudiées pour son association avec le développement de cancer est sans doute la protéine p27 (Lee et Yang 2001).

3. La protéine p27

3.1. Mécanisme d'action sur le cycle cellulaire

La p27 a été découverte en 1993 et, depuis, de nombreuses recherches ont permis de mieux caractériser ses multiples fonctions (Sgambato et al 2000). Comme pour toutes les CDKI de la famille Cip/Kip, son action inhibitrice est vaste. Elle agit majoritairement sur les complexes cycline-CDK actifs en phase G1, incluant cycline D-CDK4 et cycline D-CDK6, mais son rôle principal demeure l'inhibition du complexe cycline E-CDK2 qui participe à la transition entre les phases G1 et S du cycle cellulaire (Slingerland et Pagano 2000, Sgambato et al 2000). Lorsqu'elle s'associe au complexe cycline E-CDK2, la p27 bloque l'activité de la CDK2 en empêchant la phosphorylation de son résidu T160 par l'enzyme CAK (Elledge et Harper 1994).

Dans la plupart des tissus normaux dans lesquels le taux de prolifération cellulaire est généralement faible, il a été observé que les niveaux d'expression de p27 sont invariablement élevés. À l'opposé, dans les tissus à fort potentiel prolifératif, tels que les couches basales des épithéliums et les centres germinatifs des follicules lymphoïdes, son expression est faible ou inexistante (Slingerland et Pagano 2000). Il semble que ce soit l'équilibre entre les quantités de complexes cycline-CDK et de p27 qui est responsable de l'effet net des CDK sur la progression du cycle cellulaire. Ainsi, dans les cellules quiescentes, les niveaux de p27 surpassent ceux des complexes cycline-CDK, alors que, dans les cellules en phase G1 du cycle cellulaire, l'expression des complexes cycline-CDK doit être supérieure à celle de la p27 pour permettre une prolifération (Sherr et Roberts 1995). Les agents qui inhibent la formation de complexes cycline-CDK peuvent ainsi

sélectivement mener à une augmentation des niveaux de p21 et de p27 libres, inhibant ainsi les complexes cycline E-CDK2 et causant l'arrêt en G1 (Sherr et Roberts 1995). L'inhibition physiologique de la prolifération cellulaire modulée par la p27 joue un rôle primordial dans l'arrêt en G1 induit par le TGF- β , l'inhibition de contact et l'arrêt de croissance des cellules en suspension (Slingerland et Pagano 2000, Sakai et al 2001, Ferrando et al 1996, Sgambato et al 2000).

3.2. Autres rôles

3.2.1. Différenciation et développement

Il a également été démontré que la p27 joue un rôle dans le développement de l'organisme et la différenciation cellulaire. Des chercheurs ont observé que des souris génétiquement modifiées déficientes en p27 (-/-) démontrent une taille corporelle plus élevée que les souris contrôles et développent fréquemment de l'hyperplasie de multiples organes, de la dysplasie rétinienne et des tumeurs hypophysaires (Nakayama et al. 1996). De façon intéressante, des souris déficientes en p27 de façon hétérozygote (+/-) avaient une taille intermédiaire (Sgambato et al 2000). Ceci suggère que p27 est un gène haplo-suffisant, c'est-à-dire que le nombre de copies du gène influence la quantité de protéine synthétisée. Dans plusieurs types de cellules *in vivo* et *in vitro*, il a été démontré que la p27 joue un rôle important dans la différenciation des cellules (oligodendrocytes, myocytes, ostéoblastes, cellules ovariennes de la granulosa, astrocytes, cellules épithéliales kératinisées, etc.) (Sgambato et al 2000, Lloyd et al 1999).

3.2.2. Apoptose

Plusieurs expériences sur des cultures cellulaires ont démontré des rôles contradictoires de la p27 dans l'apoptose. Que la p27 possède bel et bien un rôle dans l'apoptose est cependant indéniable, bien que les mécanismes en cause soient mal connus pour le moment. Cependant, lorsque des cellules sont soumises à des conditions de stress, comme la privation de facteurs de croissance ou l'inflammation, la p27 contribue à l'arrêt du cycle cellulaire, ce qui est essentiel pour leur survie (Sgambato et al 2000, Lloyd et al 1999). Dans ces mêmes conditions, des cellules déficientes en p27 sont incapables de sortir du cycle cellulaire et subissent la mort cellulaire par apoptose (Sgambato et al 2000). D'autres études ont, à l'opposé, impliqué la p27 comme étant un promoteur de l'apoptose (Sakai et al 2001, Lloyd et al 1999). Une autre étude a démontré que la p27 peut conférer à

des cellules tumorales la capacité de résistance aux médicaments anti-néoplasiques. En effet, on a noté qu'une surexpression de p27 dans une lignée cellulaire de leucémie humaine résulte en une résistance à l'induction de l'apoptose par divers agents cytotoxiques (Madewell et al 2001, Sgambato et al 2000, Lloyd et al 1999).

3.2.3. Prolifération induite par les virus

Les virus ADN assurent leur réplication en favorisant l'induction et la progression du cycle cellulaire des cellules infectées. Ceci est surtout dû à leur action ciblant les molécules modulant le cycle cellulaire. Le contournement des mécanismes impliqués dans la régulation des points de contrôle est l'une de ces stratégies (Schafer 1998, Sgambato et al 2000). En médecine humaine, il a été démontré que certaines oncoprotéines virales peuvent interagir directement avec la p27 de sorte à empêcher son association avec les complexes cycline-CDK. Par conséquent, plus de complexes cycline-CDK sont libres, ce qui permet à la cellule d'entrer plus facilement en phase de prolifération. Des exemples de ce type d'interaction sont les oncoprotéines E1a de l'adénovirus type 5 et E7 du papillomavirus humain (Slingerland et Pagano 2000, Sgambato et al 2000).

4. p27 et néoplasie

4.1. Pathogénie

Dans les néoplasmes, le taux de prolifération élevé des cellules transformées a été fréquemment associé à une perte d'expression de p27 (Lee et Yang 2001, Slingerland et Pagano 2000, Sgambato et al 2000). Le rôle important de cette protéine dans la carcinogénèse est vraisemblablement associé au fait qu'elle est un régulateur important de la progression en G1. Il semble en effet que les agents carcinogènes ciblent fréquemment les molécules impliquées dans la régulation de cette phase du cycle cellulaire, car les cellules qui s'y trouvent répondent encore aux signaux extra-cellulaires (Sgambato et al 2000). Pour que la prolifération cellulaire survienne malgré l'absence de stimulation par des signaux mitogènes et malgré la présence de dommages à l'ADN, la cellule néoplasique doit donc éviter les mécanismes inhibiteurs de la progression en G1 et forcer le franchissement du point de restriction, auquel moment la cellule s'engage à terminer le cycle cellulaire.

4.2. Observations en médecine humaine

Une perte variable, mais significative, d'expression de p27 a été détectée par immunohistochimie dans tous les types de néoplasmes humains examinés jusqu'à présent incluant les cancers du sein, de la prostate, de l'estomac, des poumons, de la peau, du colon et des ovaires. (Lee et Yang 2001, Sgambato et al 2000). Ces constatations ont aussi été rapportées dans plusieurs autres types d'adénocarcinomes, les tumeurs du cerveau et les maladies lymphoprolifératives (Slingerland et Pagano 2000). Ainsi, la détermination immunohistochimique des niveaux d'expression de p27 représente un outil diagnostique potentiel pour une vaste gamme de tumeurs (Lloyd et al 1999). De façon intéressante, une corrélation importante a même pu être établie entre les niveaux d'expression de p27 et le pronostic de plusieurs tumeurs, dans lesquelles il a été noté que la perte d'expression de p27 est associée à la progression du cancer et à un pauvre taux de survie (Lee et Yang 2001, Slingerland et Pagano 2000). La protéine p27 ayant un rôle important dans la différenciation cellulaire, il est également intéressant de noter qu'une perte de son expression est associée à un phénotype pauvrement différencié dans les tumeurs (Sgambato et al 2000). Bien que cette diminution des niveaux de p27 ne semble pas être une cause primaire de la carcinogénèse, elle accélère sans doute la progression des néoplasmes (Madewell et al 2001). Ainsi, la perte d'expression de p27 dans les tumeurs représente probablement le résultat plutôt que la cause de la transformation néoplasique des cellules. La corrélation entre le degré d'expression de la p27 et le pronostic des tumeurs humaines a été observée dans les carcinomes du sein, du colon, de l'oesophage, du poumon et de la prostate, ainsi que dans les mélanomes malins (Lloyd et al 1999) et les cancers des ovaires, du larynx et de la bouche (Slingerland et Pagano 2000). Une corrélation entre l'expression de la p27 et l'agressivité ou le grade histologique a également été noté dans les carcinomes spino-cellulaires oraux, les tumeurs endocriniennes, les tumeurs parathyroïdiennes, les tumeurs hypophysaires et les lymphomes (Lloyd et al 1999).

4.3 Observations en médecine vétérinaire

À notre connaissance, jusqu'à présent, seulement deux études ont évalué l'expression immunohistochimique de p27 dans les néoplasmes en médecine vétérinaire.

4.3.1. *p27 et tumeurs cutanées canines*

Cette étude a évalué l'expression de p27 dans les tumeurs cutanées canines par immunohistochimie. Cent quarante-huit tumeurs cutanées ont été examinées, incluant des tumeurs des cellules basales, des pilomatrixomes, des trichoépithéliomes, des kératoacanthomes et des carcinomes spino-cellulaires. Comme on pouvait s'y attendre, l'examen de la peau normale a permis de démontrer une faible expression de p27 dans les cellules hautement prolifératives des couches basales de l'épithélium cutané et des follicules pileux. Dans les tumeurs, il a été démontré que l'expression de p27 était significativement plus faible dans les carcinomes spino-cellulaires comparativement à la plupart des tumeurs bénignes. Une exception a cependant été notée : aucune différence d'expression de p27 n'a été détectée entre les carcinomes spino-cellulaires et les pilomatrixomes. Les auteurs de cette étude émettent l'hypothèse que le fort potentiel prolifératif normal des follicules pileux pourrait expliquer la faible expression de p27 dans ce type de tumeur bénigne (Sakai et al 2001).

4.3.2. *p27 et lymphomes félins*

La deuxième étude portant sur l'expression de la p27 en médecine vétérinaire a été effectuée sur les lymphomes chez le chat. Les chercheurs ont observé que la p27 est bel et bien exprimée dans les lymphocytes des noeuds lymphatiques normaux et dans les lymphocytes circulants, mais non dans les lymphocytes activés. Dans les cellules néoplasiques de lymphomes, les auteurs ont noté une perte significative d'expression de p27 presque universelle, tant dans les lymphomes de type B que de type T. Les chercheurs ont aussi évalué l'expression de p27 dans les lymphocytes des lésions entériques lymphoplasmocytaires et, dans la plupart des cas, celle-ci était diffuse et éparpillée, permettant de les différencier des lymphomes. Ceci suggère donc que les effets antiprolifératifs de la p27 sont réprimés dans ce type de tumeur et que cette altération permet aux cellules transformées de contourner les mécanismes de contrôle du point de transition G1-S du cycle cellulaire (Madewell et al 2001).

4.4. Mécanismes de régulation des niveaux d'expression

4.4.1. *La voie ubiquitine-protéasome*

D'autres études ont cherché à découvrir la raison de cette perte d'expression de p27 lors de néoplasie. Une diminution de la transcription du gène codant pour la p27 a d'abord été suspectée. Cependant, une étude portant sur 500 tumeurs humaines n'a permis d'identifier que 5 tumeurs dont les cellules présentaient des mutations de p27 (Lloyd et al 1999). Deux études portant sur 36 et 30 tumeurs mammaires chez l'humain n'ont pu en relever que 2 (Lloyd et al 1999) et 0 respectivement (Ferrando et al 1996). D'autres chercheurs ont observé que de telles mutations sont également très peu fréquentes dans les cas de tumeurs hypophysaires primaires et les leucémies (Mayr et al 2000). En médecine vétérinaire, l'évaluation du taux de mutation du gène p27 dans 101 tumeurs félines variées n'a permis de détecter aucune mutation significative (Mayr et al 2000). Ces résultats suggèrent que les mutations du gène p27 sont peu fréquentes dans les néoplasmes, contrairement à ce qui a été observé pour les gènes des CDKI p15 et p16 (Ferrando et al 1996, Lloyd et al 1999). Il a aussi été démontré que les niveaux d'ARNm codant pour la p27 sont relativement constants dans les cellules quiescentes et tout au long du cycle cellulaire, supportant l'hypothèse que les niveaux d'expression de p27 sont plutôt affectés par des mécanismes post-transcriptionnels (Madewell et al 2001, Hengst et Reed 1996, Pagano et al 1995, Tan et al 1997). Une autre étude a révélé que ceci résulte en fait de la destruction de la p27 par la voie ubiquitine-protéasome (Lee et Yang 2001, Slingerland et Pagano 2000, Sgambato et al 2000) (figure 4). Cette voie est responsable de la dégradation de nombreuses protéines cellulaires impliquées dans les processus physiologiques. La protéine ciblée, en l'occurrence, la p27, est d'abord liée à l'ubiquitine ce qui lui permet d'être reconnue par le complexe cytoplasmique multimérique protéasome qui s'y lie et la détruit. L'ubiquitine est ensuite recyclée. (Lloyd et al 1999) (figure 4). Une destruction accrue de la p27 lors de la prolifération cellulaire est indéniable puisqu'on a mesuré que sa demie-vie est 6 fois plus courte dans les cellules prolifératives que dans les cellules quiescentes (Slingerland et Pagano 2000, Lloyd et al 1999). Des études ont révélé que le complexe cycline E-CDK2 lui-même peut stimuler la destruction de la p27. En effet, lorsque la p27 se lie à ce complexe, il s'ensuit une phosphorylation de son résidu thréonine 187 (T187). Ceci représente le signal induisant son ubiquitination et sa destruction subséquente (Slingerland et Pagano 2000). Des études de l'ubiquitination de la p27 dans les cellules quiescentes et dans les cellules en prolifération ont révélé que la destruction de la

p27 est plus faible dans les cellules quiescentes, expliquant la plus longue demie-vie de la protéine dans ces cellules (Pagano et al 1995, Tan et al 1997).

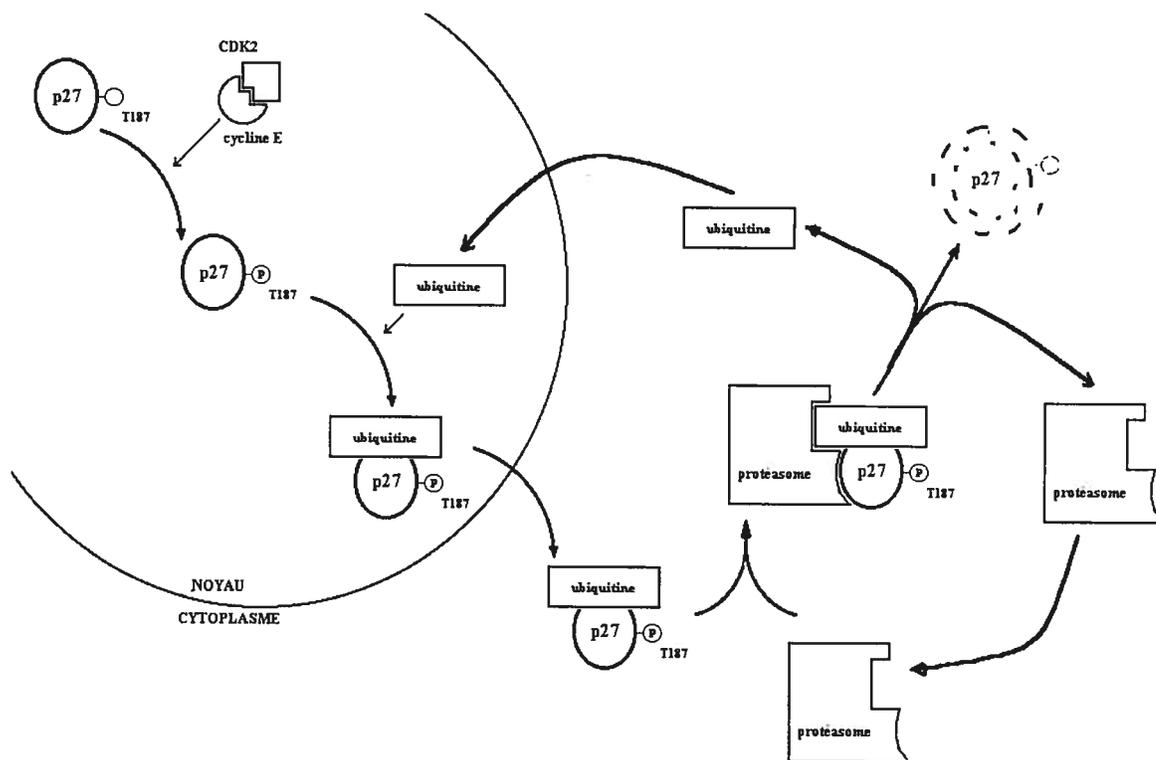


Figure 4. La dégradation de la p27 par la voie ubiquitine-protéasome. La phosphorylation de la p27 en position T187 stimule sa liaison à l'ubiquitine et son exportation cytoplasmique. Le complexe est reconnu par le protéasome qui s'y lie et détruit la p27. L'ubiquitine est ensuite recyclée.

4.4.2. Mécanismes affectant l'expression de p27 dans les néoplasmes

La perte d'expression de p27 dans les cancers semble ainsi être principalement le reflet de sa destruction accélérée par la voie ubiquitine-protéasome (Slingerland et Pagano 2000). Cependant, plusieurs recherches ont démontré que les niveaux d'expression de p27 sont influencés par un grand nombre de molécules et par divers mécanismes.

Le facteur de transcription c-myc, fréquemment surexprimé dans certains types de tumeurs, peut affecter les niveaux d'expression de p27 en induisant l'expression de cyclines D auxquelles se lie la p27. Ceci entraîne alors une séquestration de p27 par les complexes cycline D-CDK4 et cycline D-CDK6, laissant les complexes cycline E-CDK2 libres d'agir et de stimuler la progression du cycle cellulaire (Lee et Yang 2001).

Également, le gène onco-suppresseur PTEN (*phosphatase and tensin homolog*), un des gènes les plus communément inactivés dans les néoplasmes chez l'humain, provoque une augmentation des niveaux de p27 entraînant une réduction de l'activité de CDK2 et, conséquemment, l'arrêt du cycle cellulaire (Sgambato et al 2000). Ceci s'explique par le fait que la protéine codée par PTEN réduit la destruction de la p27 en diminuant l'activité de SKP2, une composante importante de l'ubiquitine responsable de la destruction de la p27. Cependant, lors de l'inactivation du gène, la stabilité de la p27 est réduite et sa destruction accrue, menant à une diminution de ses niveaux d'expression (Lee et Yang 2001).

De plus, une surexpression des facteurs de transcription Forkhead (AFX, FKHR, FKHR-L1) provoque l'arrêt du cycle cellulaire en G1 en stimulant la transcription de p27. Certains chercheurs émettent l'hypothèse qu'une inactivation de ces facteurs pourrait être impliquée dans la carcinogénèse des néoplasmes associés à une faible expression de p27 bien qu'aucune étude n'ait encore évalué clairement cette possibilité (Lee et Yang 2001).

La protéine Von-Hippel-Lindau (VHL), impliquée dans un syndrome de cancers multiples familiaux, est également impliquée dans la régulation négative du cycle cellulaire par une augmentation des niveaux de p27. Cependant, son mécanisme d'action demeure pour le moment obscur (Lee et Yang 2001).

HER2, un oncogène récepteur tyrosine kinase surexprimé dans plusieurs types de cancers est impliqué dans la voie HER2-Grb2-MAPK qui cause une réduction de la stabilité de la p27 et augmente ainsi sa destruction. HER2 perturbe la localisation de la protéine JAB1. Cette dernière étant impliquée dans l'exportation de la p27, il s'ensuit une exportation accrue de protéines vers le cytoplasme, favorisant sa destruction par le complexe ubiquitine-protéasome (Lee et Yang 2001).

La protéine *ras* peut elle aussi entraîner une diminution de l'expression de p27 (Slingerland et Pagano 2000). Ceci s'effectue par la voie RhoA qui stimule l'activité cycline E-CDK2 ou par la voie MAPK qui peut phosphoryler p27 *in vivo* (Sgambato et al 2000).

D'autres mécanismes contrôlant les niveaux d'expression et l'activité de la p27 ont été proposés. Récemment, on a observé que la localisation cellulaire de la p27 pourrait être anormale dans plusieurs types de tumeurs (Sgambato et al 2000). Une étude sur l'expression de p27 dans les sarcomes a démontré que, dans 30% des tumeurs, la p27 se trouvait localisée dans le cytoplasme des cellules alors qu'aucune expression n'était détectée dans leur noyau. Ceci suggère que la séquestration de la p27 au niveau du cytoplasme pourrait entraver son déplacement et son action au niveau nucléaire et causer l'inhibition de l'arrêt en G1. (Capodieci et al 1999). D'autres études ont démontré des résultats similaires dans les glioblastomes, les cancers du colon, des ovaires et de l'oesophage (Slingerland et Pagano 2000). D'autres chercheurs ont noté une coloration cytoplasmique accrue dans certains carcinomes du colon bien différenciés au début de leur développement ainsi qu'une expression plutôt faible dans les tumeurs à haut grade. Ceci suggère que le déplacement cytoplasmique de la p27 pourrait être un mécanisme d'inactivation de cette protéine au début du développement de ce type de cancer, alors que sa perte d'expression pourrait jouer un rôle dans les stages plus avancés de la maladie. (Sgambato et al 2000).

Enfin, il a été démontré que la méthylation du gène p27 peut taire son expression dans des cultures de cellules hypophysaires chez le rat, mais l'importance de cette méthylation dans la régulation de la fonction de p27 demeure cependant inconnue et son implication potentielle dans la carcinogénèse reste à déterminer (Sgambato et al 2000, Lloyd et al 1999).

4.5. p27 et cancer du sein

En médecine humaine, le cancer du sein est un des néoplasmes les plus étudiés. Ce type de tumeur représente la deuxième cause la plus fréquente de mortalité attribuée au cancer chez les femmes en Amérique du Nord (Catzavelos et al 1997). Il a été démontré que les niveaux d'expression de p27 y sont significativement faibles. On rapporte même que, à mesure que le tissu mammaire progresse de tissu sain, à tumeur bénigne, à tumeur maligne, les niveaux d'expression de p27 diminuent graduellement (Sgambato et al 2000). Cette perte d'expression semble d'ailleurs corrélée avec le degré d'agressivité et le grade histologique : plus la tumeur est agressive, plus les niveaux d'expression de p27 sont bas (Catzavelos et al 1997). Cette étude, portant sur 168 tumeurs mammaires, a d'ailleurs

révélé que l'expression de p27 constitue un facteur pronostic indépendant qui peut grandement influencer le traitement des patientes. Dans cette étude il s'agissait du plus fort indicateur de pronostic après la présence de métastases au nœud lymphatique (Catzavelos et al 1997). Il a aussi été démontré que les niveaux d'expression de p27 sont de meilleurs indicateurs pronostiques que les niveaux d'expression de la p53 (Porter et al 1997). Dans une étude portant sur 202 patientes ayant une tumeur mammaire de moins de un centimètre de diamètre, une expression réduite de p27 dans plus de 50% des cellules néoplasiques était associée avec un risque de mortalité 3.4 fois plus élevé (Tan et al 1995). Catzavelos et al ont démontré que l'expression de p27 était faible dans 56% des tumeurs mammaires évaluées et que ceci était associé à une risque de récurrence 2.7 fois plus élevé (Catzavelos et al 1997). Toutes ces études ont démontré qu'une perte d'expression de p27 dans le cancer du sein chez la femme représente une valeur prédictive négative de la survie et indique que le recours à des méthodes thérapeutiques plus agressives est indiqué (Catzavelos et al 1997, Porter et al 1997, Tan et al 1995).

Quelques études portant sur les tumeurs mammaires humaines et l'expression de la p27 ont paradoxalement obtenu des résultats contradictoires qui ne peuvent être ignorés. En effet, certains chercheurs ont découvert une expression paradoxalement élevée de p27 dans certaines lignées de tumeurs mammaires en association avec une augmentation des cyclines D et E. Ces résultats sont difficiles à expliquer, mais les auteurs émettent l'hypothèse que ceci pourrait refléter un mécanisme régulateur homéostatique qui protège les cellules des effets potentiellement toxiques d'une expression accrue de cycline E et/ou D, comme l'induction de l'apoptose (Sgambato et al 1997).

5. Les tumeurs mammaires canines

5.1. Epidémiologie

Les tumeurs mammaires sont aussi très fréquentes chez l'espèce canine. La glande mammaire représente le deuxième site anatomique le plus communément atteint de néoplasie chez la femelle, après la peau (Henson 2001). Les tumeurs mammaires malignes constituent le type de cancer le plus fréquent chez la chienne; son taux d'incidence annuel serait d'environ 198/100 000 (Misdorp 2002). Une fois ajusté en fonction de l'âge et de la

distribution de la population, ce taux serait 3 fois plus élevé que celui du cancer du sein chez la femme (Misdorp 2002). En général, on estime qu'environ 50% de ces tumeurs sont malignes (Rutteman et al 2001, Henson 2001, Morrison 1998), mais certains auteurs rapportent plutôt une fréquence approximative de 30% (Misdorp 2002).

5.2. Difficultés diagnostiques

En réalité, la proportion exacte de tumeurs mammaires canines bénignes et malignes est difficile à établir, pour plusieurs raisons. D'abord, un nombre inconnu de ces tumeurs ne sont jamais examinées en histopathologie (Misdorp 2002). Aussi, l'aspect histologique des tumeurs mammaires canines est très variable d'une masse à l'autre et au sein d'une même masse (Henson 2001). Effectivement, les cellules présentes dans une même masse peuvent se trouver à divers stades de différenciation, de sorte qu'un foyer de cellules malignes peut être retrouvé enclavé à l'intérieur d'une tumeur bénigne. Dans un tel cas, la région maligne pourrait être malencontreusement exclue lors de la préparation ou de l'examen microscopique de sections histologiques. Enfin, un des facteurs les plus importants est sans doute le manque de suivi auquel font face les pathologistes vétérinaires. Ainsi, le comportement réel des tumeurs mammaires canines est plutôt mal connu et les pathologistes ont souvent des opinions divergentes quant à l'importance des différents critères de malignité utilisés dans la classification de ces néoplasmes. Ceci illustre indubitablement qu'il pourrait être très utile de développer un outil diagnostique complémentaire plus objectif pour ce type de tumeur.

5.3. Classification

Bien que la majorité des tumeurs malignes soient d'origine épithéliale, des sarcomes sont parfois rencontrés. Des carcinosarcomes sont également possibles lorsqu'une tumeur maligne mixte naît à la fois du tissu épithélial et du tissu mésenchymateux, mais ils sont peu communs. Pour ce qui est des tumeurs bénignes, le type le plus commun est la tumeur mixte bénigne, mais des adénomes (simples ou complexes) et des fibroadénomes sont aussi fréquents (Misdorp 2002, Rutteman et al 2001, Morrison 1998).

5.4. Pathogénie

Il a été observé que l'expression de plusieurs gènes impliqués dans la transduction cellulaire des signaux mitogènes est souvent anormale dans les tumeurs mammaires humaines. Des études similaires ont été effectuées chez le chien afin de déterminer si de telles altérations sont également retrouvées chez cette espèce, mais peu d'aberrations de ce genre ont été recensées. Une étude par PCR n'a pas démontré d'expression anormale du gène *ras* dans les tumeurs mammaires canines. Des résultats contradictoires ont été obtenus quant à l'expression de *c-erbB-2*. Également, des mutations du gène *p53*, le gène le plus fréquemment muté dans les néoplasmes humains, n'ont été détectées que dans 3 tumeurs mammaires canines sur 10 dans une étude et 6 sur 40 dans une autre. Les altérations de *BRCA1*, qui sont responsables d'une partie des cancers du sein héréditaires chez l'humain, n'ont été démontrées que dans quelques cas chez le chien. D'autres études ont tenté de mettre en évidence des anomalies nucléaires et l'aneuploidie de l'ADN a été observée dans 50 à 60% des cellules malignes et 15 à 25% des cellules de tumeurs mammaires bénignes (Rutteman et al 2001, Misdorp 2002). À notre connaissance, une seule étude a évalué l'expression de marqueurs du cycle cellulaire dans les tumeurs mammaires canines par immunohistochimie. Sfacteria et al ont démontré tout récemment que la cycline D1 était exprimée en grande quantité dans 60% des lésions mammaires pré-cancéreuses et 44% de lésions cancéreuses. Les auteurs ont aussi évalué l'expression de *p27*, mais seulement par Western blot et les résultats n'ont été interprétés qu'en relation avec les niveaux d'expression de cycline D1 (Sfacteria et al 2003).

6. Marqueurs de prolifération

Plusieurs méthodes sont fréquemment utilisées pour mesurer le taux de prolifération de cellules néoplasiques afin de mieux comprendre la biologie des tumeurs et estimer leur pronostic. Ces techniques incluent l'index mitotique, les techniques d'incorporation, le *DNA cytometric percentage S phase*, les AgNOR (*silver nucleolar organizer regions*) et la mesure d'antigènes associés à la prolifération. Les techniques les plus fréquemment utilisées sont les AgNOR et la mise en évidence de marqueurs de la prolifération cellulaire. Ceux-ci incluent le PCNA et la Ki-67 (Madewell 2001). Cette dernière est une protéine nucléaire non-histone dont l'expression est évaluée par immunohistochimie. Elle est exprimée tôt en phase G1 et durant les phases S, G2 et M du cycle cellulaire (Madewell

2001). Elle n'est pas exprimée en G0 et permet donc d'identifier les cellules qui sont activement dans le cycle cellulaire. L'expression de Ki-67 a été évaluée dans les études susmentionnées qui ont examiné l'expression de p27 dans les tumeurs cutanées chez le chien et les lymphomes félines. Ceci a été effectué dans le but de vérifier si les cellules exprimant peu de p27 étaient bien celles qui proliféraient. Les résultats démontrent que les niveaux d'expression de Ki-67 et de p27 étaient inversement corrélés et, à l'immunohistochimie, on remarque des colorations diamétralement opposées sur les sections histologiques d'une même masse évaluée pour les deux antigènes (Sakai et al 2001, Madewell et al 2001).

En médecine humaine, l'expression de PCNA et de Ki-67 sont parfois utilisées dans la détermination du pronostic des tumeurs. Au moins deux études en médecine humaine ont évalué l'expression de p27 et de Ki-67 dans les tumeurs mammaires (Porter et al 1997, Tan et al 1995) et ont démontré que le taux d'expression de p27 et le taux de prolifération illustré par l'expression de Ki-67 ne sont pas corrélés (Sgambato et al 2000, Tan et al 1995). Les auteurs ont suggéré que ceci indique que la perte d'expression de p27 ne se manifeste pas seulement par une prolifération accrue de la tumeur (Tan et al 1995) et que les anomalies du cycle cellulaire ne peuvent pas uniquement s'expliquer par leurs effets sur la prolifération (Porter et al 1997). Autrement dit, ceci suggère que d'autres fonctions de la protéine p27 (telles que celles associées à l'apoptose et/ou à la différenciation cellulaire) peuvent expliquer l'association entre une expression réduite de p27 et la progression tumorale (Sgambato et al 2000). L'expression de Ki-67 a également été étudiée dans les tumeurs mammaires chez le chien et il a été démontré que celle-ci était plus élevée dans les tumeurs malignes que dans les lésions dysplasiques et bénignes et qu'elle était directement corrélée avec le pouvoir métastatique, la mortalité associée au néoplasme, un taux de rémission plus court et un taux de survie général plus bas (Pena et al 1998). Une seconde étude a évalué la corrélation entre le taux d'expression de Ki-67 et le grade histologique de ces tumeurs. Les auteurs ont aussi remarqué une différence significative entre les tumeurs malignes et bénignes quant à l'index de prolifération moyen de chacun des groupes. Cependant, bien que les moyennes soient statistiquement différentes, le recoupement était considérable entre les catégories de tumeurs et les auteurs concluent que ceci rend difficile l'établissement d'une valeur limite utile au diagnostic. À cause de cela, les auteurs concluent que cette méthode n'a qu'un faible impact sur les procédures diagnostiques et prédictives du pronostic de ces tumeurs (Löhr et al 1997).

7. But du projet

Si l'expression de p27 dans les tumeurs mammaires canines s'avère similaire à celle dans les cancers du sein chez l'humain, il pourrait s'agir d'une méthode efficace pour mieux déterminer le degré de malignité de ces néoplasmes. Considérant que l'expression de p27 est corrélée avec la différenciation des cellules néoplasiques chez l'humain, si de telles altérations sont détectées chez le chien, l'immunohistochimie pourrait constituer un outil diagnostique important dans les cas où la classification et la détermination du degré de malignité sont moins aisées. De plus, si l'expression de p27 dans les tumeurs mammaires canines est altérée, il pourrait éventuellement être utile de déterminer si elle est corrélée avec le pronostic, comme c'est le cas chez l'humain. Le but de notre étude est donc d'évaluer l'expression de la p27 dans les cellules épithéliales de tumeurs mammaires bénignes et malignes par immunohistochimie afin de déterminer s'il existe des différences significatives entre les deux groupes. Nous allons également évaluer l'expression de Ki-67 parallèlement à celle de la p27 afin de vérifier si l'expression de Ki-67 est effectivement corrélée avec la malignité et afin d'étudier la relation entre les taux d'expression de p27 et de prolifération dans ce type de tumeur. Nous tenterons d'évaluer lequel est le meilleur indicateur de malignité.

Chapitre deuxième : Article

Expression of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27^{kip1} in benign and malignant mammary tumors of dogs.

Sébastien Overvelde, Michel Desnoyers, Christiane Girard

Université de Montréal, Faculté de Médecine Vétérinaire, Département de pathologie et microbiologie, 3200 rue Sicotte, C.P. 5000, Saint-Hyacinthe, Québec, J2S 7C6, Canada.

Correspondance to :

Sébastien Overvelde.

Faculté de Médecine Vétérinaire, 3200 rue Sicotte, Saint-Hyacinthe, Québec, J2S 7C6, Canada.

Soumis à : Journal of Veterinary Diagnostic Investigation (mars 2004).

Abstract

The cyclin-dependant kinase inhibitor p27 is an important inhibitor of cell cycle progression. In human and veterinary medicine, immunohistochemistry has revealed that neoplastic cells of many tumor types frequently show reduced p27 expression. This results in altered cell cycle regulation allowing transformed cells to undergo uncontrolled proliferation by bypassing inhibitory checkpoints. In human breast cancer, loss of p27 expression by neoplastic cells has been correlated with degree of malignancy and is regarded as one of the best indicators of prognosis. Canine mammary tumors are very frequent and often represent a diagnostic challenge for histopathologists as malignancy may be difficult to determine in many cases. This has been attributed to the fact that many mammary tumors are heterogenous in nature and may contain only very localized areas of anaplasia and invasiveness. Also, criteria used to define malignancy may vary slightly among pathologists. The purpose of this study was to determine if p27 immunohistochemistry may be useful as an objective complementary diagnostic tool to histopathology for canine mammary neoplasia. p27 expression was evaluated by immunohistochemistry in 28 benign and 28 malignant canine mammary tumors and a score was calculated for each tumor according to the intensity and frequency of immunostaining in epithelial tumoral cells. To study the relation between p27 expression and neoplastic cell proliferation, a marker of proliferation, Ki67, was also evaluated. Results showed that the mean p27 score of malignant tumors was significantly lower than that of benign tumors ($p < 0.0001$). When a cut-off p27 score of 6 was used to differentiate benign from malignant tumors, good sensitivity (89.3%) and specificity (85.7%) were obtained. Although mean proliferation rates of malignant tumors, as determined by Ki67 expression, were significantly higher than those of benign tumors ($p < 0.026$), considerable overlap was noticed between the two categories. A cut-off proliferation rate of 6.5% yielded poor sensitivity (57.1%) and specificity (60.7%), precluding the use of Ki67 immunostaining as a complementary diagnostic tool for canine mammary tumors. A poor negative correlation ($r = -0.30$) was found between p27 scores and Ki67 expression. p27 immunostaining has good sensitivity and specificity and could thus be useful in improving the objectivity of histopathologic examination in challenging cases of canine mammary tumors.

Article

The cell cycle consists of a series of complex molecular events involved in cell replication. Its final result is the production of 2 identical daughter-cells from an original cell.^{3,27} This process is implicated in a number of physiological and pathological events favoring cell proliferation such as growth and development, tissue repair following injury, hyperplasia and neoplasia.³

The cell cycle is divided into 4 phases: G1 (gap1), S (synthesis), G2 (gap2) and M (mitosis). The progress of cells through this cycle is regulated by a series of molecular interactions ensuring the precise control and orchestration of the critical events involved in this process.⁴ Orderly progression and timing are brought about by the sequential phosphorylation of specific cyclin-dependent kinases (CDKs) by the appropriate cyclins.^{27,29,32} Checkpoints are present to ensure adequate completion of DNA replication, DNA repair and chromosome segregation. Upon detection of an irregularity, the cell cycle will be arrested, allowing sufficient time for resolution or repair.³ The G1-S interface is particularly important as it represents the point-of-no-return in cell replication. Before this stage, if cells are not constantly exposed to the signals that initiated their proliferation, they return to the resting state (G0).³¹ On the other hand, as the G1-S threshold is crossed, the cell commits to the completion of the cell cycle and, if unable to do so, it shall suffer cell death through apoptosis.

Two families of CDK inhibitors (CDKIs) have been identified : INK4 and Cip/Kip.^{11,27,29,32} These proteins arrest the cell cycle by inactivating CDKs.^{11,20, 27,29,32} The p27 CDKI is a member of the Cip/Kip family which has a broad range of inhibition. It can inactivate most cyclin-CDK complexes implicated in the cell cycle.^{11,27,29} Mainly though, p27 is an important regulator of G1 cell cycle arrest; its inhibitory role is largely attributed to its inactivation of the cyclinE-CDK2 complex which is essential for the G1-S transition.^{8,29,32}

Abnormalities in cell cycle regulation are associated with the uncontrolled cellular proliferation in neoplastic cells.^{11,14,29} In particular, irregularities in the control of checkpoints allow cellular proliferation despite the absence of adequate mitogenic stimulus and/or in the presence of a damaged genetic apparatus.¹⁴ Such irregularities can be due to alterations in the cellular levels of cyclins, CDKs and/or CDKIs. Cellular expression of

these proteins has been closely studied to detect patterns of cell cycle alterations in specific tumor types.

A decrease in the expression of CDKIs, for example, results in the lack of inhibition of cyclin-CDK complexes and a subsequent inability to arrest the cell cycle. This allows unchecked cellular proliferation.¹¹ p27 is one of the most studied CDKIs in relation to carcinogenesis. Apart from its roles as regulator of the cell cycle and its implication in cellular proliferation in neoplasia, it is involved in physiologic processes such as cellular differentiation,^{12,29} growth and development²⁹ and susceptibility to apoptosis.^{12,16,26,29}

Intracellular levels of p27 have been intensely examined by immunohistochemistry in many types of human tumors and a variable loss of its expression has been observed in all human malignancies examined to date, including breast, prostate, gastric, lung, skin, colon and ovarian cancers.^{11,29} Interestingly, for most types of cancer, an important correlation between prognosis and p27 levels was also established.^{11,29,32}

In veterinary medicine, 2 studies have evaluated p27 expression in cancer. The first study evaluated p27 expression in 148 skin tumors of dogs.²⁶ It was demonstrated that p27 levels were significantly lower in squamous cell carcinomas as opposed to benign tumors, except for pilomatrixomas. The authors hypothesize that the normally highly proliferative potential of hair follicles could account for the low levels of p27 in the latter. The second study examined p27 expression in feline lymphomas.¹⁶ Again, it was demonstrated that neoplastic cells showed a significant loss of p27 expression, suggesting that the anti-proliferative effects of p27 are abrogated in this type of tumor and that such alterations would allow cells to bypass the G1-S checkpoint of the cell cycle.

Breast cancer is the second most common cause of death related to neoplasia in North American women.² In these tumors, p27 expression was shown to be significantly altered.^{2,24,33} It was demonstrated that, as mammary tissue progresses from normal tissue, to benign tumor, to malignant tumor, there is progressive loss of p27 expression²⁹, which also appears to be correlated with the aggressiveness of these tumors.² Other studies have demonstrated that p27 expression in human mammary tumors represents a predictive positive measurement of survival and that it is an independent prognostic factor that can

considerably influence patient treatment.^{2,24,33} Paradoxically, a recent study has shown contradictory data, having found high expression of p27 in a subset of human mammary neoplastic cells.³⁰

Mammary tumors are the most common type of malignant neoplasm in bitches and their annual incidence rate is evaluated at 198/100 000.¹⁹ It is thought that approximately 50% of these tumors are malignant and the majority are of epithelial origin.^{7,21,25} The exact proportions of benign and malignant canine mammary tumors are difficult to evaluate mainly because there can be marked variation in histologic features between different masses and even within one mass⁷ but also because histologic criteria used to define malignancy may vary among pathologists.²⁵

Various molecular techniques have been evaluated to assess their use as complementary diagnostic tools for canine mammary tumors, but these studies have not shown frequent patterns of alterations.^{13,15,23} To our knowledge, only one recent study has evaluated the immunohistochemical expression of a cell cycle marker in canine mammary tumors.²⁸ This study showed that cyclin D1 was overexpressed in 60% of pre-cancerous and 44% of cancerous mammary lesions. p27 expression was also evaluated in that study, but only by Western blotting and only interpreted in relation to cyclin D1 expression of cells.

If p27 expression in canine mammary tumors is similar to what is present in human breast cancer, its evaluation could constitute an important complementary diagnostic tool in cases for which histological classification and determination of malignancy are difficult. The purpose of our study was to evaluate p27 expression in epithelial cells of malignant and benign canine mammary tumors and to determine if a significant difference exists between the two groups. p27 and Ki67 expressions were also compared to determine if a correlation exists between the two and to identify which one would be the best complementary diagnostic tool for this type of neoplasm.

Materials and Methods

Case selection

One hundred and four canine mammary tumors were randomly selected from the archives of the diagnostic service of the Faculté de Médecine Vétérinaire (Université de Montréal, Québec, Canada) among biopsy cases submitted in 2000 and 2001. Tissues had been fixed in 10% neutral buffered formalin and embedded in paraffin wax. Original diagnoses of benign or malignant mammary tumor had been established by microscopic examination of hematoxylin-eosin-saffron-stained sections at the time of submission. The slides were blindly re-examined by one of us (CG) to confirm the original diagnoses. Upon disagreement, a third opinion was sought. Only cases for which a consensus was reached between two pathologists were included in this study. Twenty-eight benign and 28 malignant mammary tumors were ultimately selected.

Immunohistochemical staining for p27

Tissue sections (3 μm thick) were first deparaffined in toluene, hydrated in graded alcohols to distilled water and rinsed for 5 minutes in phosphate-buffered saline (PBS). Antigen retrieval was then performed in a citrate-buffered solution by incubation in a food steamer^a at 100°C for 20 minutes. Slides were then allowed to cool for 20 minutes in a humidified chamber at room temperature and were then rinsed twice in PBS for 5 minutes. Endogenous peroxidase activity was quenched by incubating slides in a 0.3% hydrogen peroxide methanol solution for 30 minutes. This was followed by three 5-minute rinses in PBS. Incubation with normal goat serum^b at a 1:20 dilution for 20 minutes was then performed to inhibit subsequent non-specific binding of antibodies. After blotting, the primary mouse monoclonal antibody anti-human p27^{kip1}^c was applied at a 1:400 dilution and incubated overnight in a humidified chamber at 4°C. The next day, tissues were rinsed in PBS twice for 5 minutes, then incubated with biotinylated goat anti-mouse antibodies^b (1:200 dilution) for 45 minutes at room temperature. After 2 more 5-minute rinses in PBS, incubation with avidin-biotin-peroxidase complex^b was performed for 45 minutes at room temperature. Following two more 5-minute rinses in PBS, the chromogen diaminobenzidine^b was applied and incubated for 15 minutes at room temperature. Slides were then rinsed in distilled water for 5 minutes, counterstained with Gill's hematoxylin^d,

rinsed in distilled water for another 5 minutes and mounted using an aqueous mounting medium.

Immunohistochemical staining for Ki67

Procedures for Ki67 staining were similar to those of p27 staining, except that the primary antibody used was a mouse monoclonal anti-human Ki67 antibody^c at a 1:800 dilution.

Controls

For each group of slides, negative controls were provided by a duplicate section of one sample on which the same immunostaining procedure was performed except that the primary antibody was replaced by mouse IgG1^b at a 1:400 dilution. Positive controls for p27 and Ki67 staining were provided by sections of normal canine mammary tissue and normal canine jejunum, respectively. Normal tissues were obtained from a healthy beagle bitch euthanized for reasons unrelated to health problems. Normal mammary epithelium also provided an internal positive control on p27-immunostained sections.

Microscopic examination

Considering that, for p27, both the intensity of the staining and the approximate number of positive cells are of importance to accurately determine its expression, a p27 score was calculated for each tumor as previously described⁹ taking both parameters into account. Sections were blindly examined by light microscopy by two independent observers (SO, MD). The percentage of p27 positive cells was graded as follows : 0 = no positive cells; 1 = 1-25% positive cells; 2 = 26-50% positive cells; 3 = 51-75% positive cells; 4 = 76-100% positive cells. Staining intensity was graded as follows : 0 = no staining; 1 = light staining; 2 = moderate staining; 3 = strong staining. The total p27 score was obtained by adding the products of percentage of positive cells and intensity. For example, if 10% of cells were lightly positive, 60% were moderately positive, 10% were strongly positive and 20% did not stain, the total score was calculated as : $(1 \times 1) + (3 \times 2) + (1 \times 3) + (1 \times 0) = 10$. A mean score was calculated when values from both observers differed from less than 2 points. For tumors for which the difference was greater than 2 points, the slides were conjointly reviewed by both observers until a consensus was reached. For Ki67 staining, since the intensity of the staining has no influence on the proliferation state, we calculated the percentage of Ki67 positive cells on 500 cells in order to determine a proliferation rate.

When the difference in calculated proliferation rates between the two observers was greater than 5%, the slides were conjointly re-examined by both observers until a consensus was reached.

Statistical analysis

Mean p27 scores and mean Ki67 proliferation indexes were compared between malignant and benign mammary tumor groups using Student's t test. Prior to testing, the distribution of the Ki67 proliferation indexes had to be normalized; the arcsinus of the square root was used for the transformation. The correlation between p27 scores and transformed Ki67 indexes was evaluated by the Pearson correlation analysis. The latter was also used to measure agreement between observers in scoring p27 and measuring the Ki67 proliferation index. Finally, sensitivity and specificity of p27 and Ki67 expression, alone and in combination were calculated. $P < 0.05$ was considered to be statistically significant.^f

Results

Descriptive statistics

Twenty eight malignant and 28 benign tumors were examined for both p27 and Ki67 immunostaining. The age of dogs with malignant tumors (simple or complex carcinomas) ranged from 3.5 to 12.8 years with a mean and standard deviation of 9.7 ± 1.8 years, whereas the age of dogs with benign tumors (simple or complex adenomas) ranged from 6 to 11.3 years with a mean and standard deviation of 8.7 ± 1.3 years. (Tables I and II)

p27 Immunostaining

Evaluation of normal canine mammary tissue revealed strong nuclear expression of p27 in almost all epithelial cells. In benign tumors, staining was also frequent and intense throughout most of the tumors (Fig. 1, 3). The mean p27 score for this group ranged from 3 to 12.5 with a mean and standard deviation of 8.7 ± 2.2 (Table II). In malignant tumors, the staining of epithelial cells for p27 was somewhat more heterogenous but, nevertheless, weaker and less frequent than in normal tissue and benign tumors (Fig. 2, 4). In this group, the p27 scores ranged from 0 to 9 with a mean and standard deviation of 5.7 ± 2.4 (Table I). The mean p27 score of malignant tumors was significantly lower than that of benign tumors ($p < 0.0001$).

Ki-67 immunostaining

The percentage of Ki67 positive cells (Fig. 5, 6) varied considerably among and between tumor groups. In benign tumors, the transformed proliferation index ranged from 4% to 52% with a mean and standard deviation of $23\% \pm 13\%$ (Table II) whereas, in malignant tumors, it ranged from 3% to 77% with a mean and standard deviation of $34\% \pm 19\%$ (Table I). The transformed proliferation index of malignant tumors was significantly greater than that of benign tumors ($p < 0.026$).

Correlation between p27 scores and Ki67 indexes

The Pearson correlation analysis indicated the presence of a poor negative but significant correlation between the p27 scores and Ki67 proliferation indexes ($r = -0.30$, $p = 0.026$) and between p27 scores and transformed Ki67 indexes ($r = -0.28$, $p = 0.034$).

Specificity and sensitivity

Further statistical analysis revealed that, for p27 scores, specificity and sensitivity were most similar at a cut-off value of 6. When this value was applied to our data, the test showed a specificity of 85.7% and a sensitivity of 89.3%. For Ki67, the cut-off value associated with the closest similarity between specificity and sensitivity was 6.5%. The use of this value in our study yielded a specificity of 60.7% and a sensitivity of 57.1%. When both cut-off values were used conjointly, the sensitivity was greatly improved with 92.9%, but specificity decreased to 50%.

Agreement between observers

Correlation in the data between observers was very strong for both p27 scores ($r = 0.98$, $p < 0.0001$) and transformed Ki67 proliferation indexes ($r = 0.94$, $p < 0.0001$).

Discussion

As expected, p27 immunostaining in normal canine mammary epithelial cells was strong and diffuse. Large amounts of p27 effectively maintain these cells in the non-dividing G0 state by causing cell cycle arrest. This allowed sections of normal canine mammary tissue to be used as positive control. The level of expression of benign tumors was usually strong for p27 and, in most cases, was similar to that of normal mammary tissue. Malignant tumors exhibited a more heterogenous pattern of p27 immunostaining. Although a few of them seemed to stain as intensely and as frequently as benign tumors and normal tissues, most demonstrated patchy areas where loss of p27 expression was clearly evident.

Results showed that the mean p27 score of malignant mammary tumors was significantly lower than that of benign tumors. This is similar to what has been observed in human breast cancer^{2,12,29} and in most types of neoplasms in which p27 immunostaining has been studied to date.^{11,12,16,26} These results indicate that an alteration in p27 expression is associated with a large proportion of canine malignant mammary tumors.

These findings also suggest that p27 immunostaining could be a useful tool for a more accurate diagnosis of canine mammary tumors. Using a cut-off p27 score of 6, this technique has good sensitivity and specificity (89.3% and 85.7% respectively). When applied to our data, 4 of 28 benign tumors (14%) and 3 of 28 malignant tumors (11%) were misclassified. These outliers could be attributed to many factors. First, these tumors may have been misclassified at the time of histological examination, although this is unlikely as only tumors for which there was an agreement between two pathologists were included in this study. Individual tissue variation affecting antigen retrieval such as time spent in formaldehyde before embedding in paraffin is another possibility. Age of tissues does not seem to be a factor since all tumors were collected in 2000 or 2001. Finally, one has to consider the heterogenous nature of neoplastic cells.¹⁴ Indeed, different factors and conditions may result in cell transformation and although specific patterns of alteration are likely to be frequently encountered, it is unlikely that one specific alteration be associated with all canine mammary tumors. This has recently been demonstrated in human medicine when a subset of breast cancer cells was shown to express paradoxically high levels of p27 in association with high levels of cyclins E and D.³⁰ Researchers hypothesized that, for this subset of neoplastic cells, high levels of p27 might contribute to malignancy by protecting

these cells from potentially toxic effects of high levels of cyclins D and/or E, such as apoptosis. Despite the occurrence of some false positive and false negative results, the present study shows a very frequent and significant pattern of alteration in canine mammary tumors that justifies the use of p27 immunostaining as a complementary diagnostic tool.

Ki67 expression was significantly more frequent in malignant than in benign tumors, indicating a higher cell proliferation rate. A similar relationship between Ki67 expression and histological tumor grades has been reported in human breast cancer^{1,10,18,34} and in previous veterinary studies on canine mammary tumors.^{13,23} On the other hand, whereas mean Ki67 expression was higher in malignant than in benign tumors, one study on canine mammary neoplasms has shown that a considerable overlap exists between mean values of benign and malignant categories precluding the use of this method as an aid for diagnosis.¹³ Our study reveals similar findings. The cut-off value of 6.5% was determined to be the proliferation rate at which sensitivity and specificity were the most similar. Using this value, specificity and sensitivity were low at 60.7% and 57.1%, respectively. These results indicate that Ki67 immunostaining alone is unreliable to differentiate benign from malignant mammary tumors in the bitch. The poor correlation between malignancy and the proliferation rate of many tumors is not completely unexpected. Indeed, one must consider that attributes other than the rate of proliferation are responsible for tumor malignancy, such as metastatic ability, resistance to apoptosis and cellular differentiation.³ Thus, proliferation rates may not be the best indicators of malignancy in all tumors.

There is no doubt that histopathological examination of tumors remains the fastest and least expensive method of diagnosis despite the fact that it may be challenging in many cases due to the heterogeneity of neoplastic cell populations and despite that criteria used to define malignancy may vary slightly among pathologists.²⁵ On the other hand, in difficult cases, histopathology alone may be less accurate to clearly differentiate between malignant and benign tumors. This supports the fact that more objective complementary methods would undoubtedly be useful in many cases. In this study, a Pearson correlation test was performed to evaluate the similarity of the data provided by both independent observers. Very good correlations were calculated for both the p27 score ($r = 0.98$) and the proliferation rate determined by percentage of Ki67 expression ($r = 0.94$). These results

indicated that these two parameters are repeatable and objective enough to justify their use as potential diagnostic tools. Considering that the sensitivity and specificity of p27 scores are much higher than that of proliferation rates assessed by Ki67 immunohistochemistry, it is clear that, between these two tests, p27 immunostaining is the better diagnostic tool. Thus, if only one immunohistochemical test could be performed as an aid to diagnosis, p27 immunostaining should prevail over Ki67 immunostaining. Despite very acceptable sensitivity and specificity, this test may yield occasional false positive and false negative results, but its use as a complement to histopathological examination will likely significantly improve the latter's reliability. On the other hand, if both p27 and Ki67 immunostains are performed, one should keep in mind that, although the sensitivity is greatly improved (92.9%), caution should be used in the interpretation of positive results as this combination yields poor specificity (50%).

A Pearson analysis was also used to assess the correlation between p27 scores and proliferation rates determined by Ki67 immunostaining. Results showed a poor negative association between the two values ($r = -0.30$). This was unexpected as, in cells that show poor p27 expression, loss of cell cycle checkpoint inhibition would likely allow uncontrolled proliferation which should be accompanied by a proportionate increase in Ki67 expression. Nevertheless, our results do not support this association nor do similar studies on breast cancer in women.^{29,33} In human medicine, it is thought that functions of p27 which are not associated with its role in cell proliferation may be involved in mammary carcinogenesis. Such functions may include the roles of p27 in apoptosis and cellular differentiation and may explain why a simple indicator of cellular proliferation such as Ki67 expression may not correlate with tumor malignancy as accurately as p27 expression.

One major problem was encountered during the course of this study. The heterogenous patterns of p27 immunostaining made visual interpretation of slides and calculation of the p27 score sometimes complicated. This was mostly problematic in tumors classified as malignant based on the identification, within an apparently benign tumor, of foci of cells showing more obvious criteria of malignancy. This also appears to be a common observation in human medicine where researchers have reported heterogenous p27 immunostaining in breast tumors as well.^{2,30} In one study on p27 immunostaining and its correlation with prognosis, the authors clearly mention how this was taken into account and

indicate that tumors were scored according to the areas of highest grade of malignancy because these were most likely to dictate prognosis.² One study on Ki67 immunohistochemistry in canine mammary tumors used a similar approach in selecting tumor areas to be examined for staining.²³ Considering this, we also decided that microscopic examination and p27 score calculation should be focused in these areas. By doing so, a considerable but unavoidable bias was introduced.

In conclusion, p27 expression is significantly lower in malignant canine mammary tumors, as opposed to benign tumors even though p27 scores between malignant and benign categories of tumors may sometimes overlap. This gives p27 immunostaining a good sensitivity and specificity and supports its use as a potential complementary diagnostic tool for canine mammary tumors in cases for which histopathological classification is difficult. Furthermore, the correlation between p27 scores of two independent observers being strong, this method is reliable and repeatable. Thus, it may be useful in improving the objectivity of histopathological examination in many cases. A cut-off p27 score of 6 is recommended to differentiate malignant from benign tumors. As for the proliferation rate determined by the percentage of Ki67 expression, although mean values are significantly higher in malignant tumors than in benign tumors, it was shown to be a more variable parameter and yielded more unreliable sensitivity and specificity. The correlation between p27 and Ki67 expression was poor.

Considering the importance of p27 expression in human breast cancer as an indicator of prognosis,^{2,24,33} further studies will have to be conducted to assess if such a correlation also exists in canine mammary tumors. If so, p27 immunostaining could not only provide important information on diagnosis, but also greatly influence the treatment of affected animals.

Acknowledgements

This study was supported by the Fonds du Centaire of the Faculté de Médecine Vétérinaire of the Université de Montréal. We thank Dr. Pierre Hélie for reviewing some slides, Dr. Caroline Piché for her help with immunohistochemical techniques, Mr. Guy Beauchamp for statistical analyses and Dr. Monique Doré for the use of her laboratory.

Table I. Mean p27 scores and Ki67 expression (proliferation rate) of malignant tumors

Case No.	Breed	Age (years)	p27 score	Ki67 %	Diagnosis
1	Shih Tzu	10	3	6.6	Tubular carcinoma
2	Mixed	10	0.5	16.1	Solid carcinoma
3	Shih Tzu	3.5	1.5	4.3	Tubulopapillary carcinoma
4	Poodle	8.2	2	48.8	Solid carcinoma
5	Golden Retriever	11.3	2	32.6	Solid carcinoma
6	German Shepherd	8.2	4	15.8	Tubular carcinoma
7	Poodle	10.9	1	24.5	Tubular carcinoma
8	Mixed	8.5	0	17.5	Tubulopapillary carcinoma
9	Mixed	7	0.5	0.2	Tubular carcinoma
10	Mixed	11.8	1	5.5	Tubular carcinoma
11	Poodle	12	9	10.5	Complex tubular carcinoma
12	Mixed	9.8	8	5.3	Tubular carcinoma
13	Terrier	9.5	6	30.4	Tubular carcinoma
14	Miniature Schnauzer	11	5	6.1	Solid carcinoma
15	Lhasa Apso	9.8	3	6.2	Tubular carcinoma
16	Labrador Retriever	10.5	3	33.3	Papillary carcinoma
17	Mixed	12.8	6	6.9	Complex tubular carcinoma
18	Yorkshire Terrier	10.4	3	20.5	Solid carcinoma
19	Fox Terrier	10	3	2.4	Tubular carcinoma
20	Beagle	10.7	8	1	Tubular carcinoma
21	Rottweiler	9.8	3	4.7	Complex tubular carcinoma
22	Pomeranian	9.2	3	10.9	Complex tubular carcinoma
23	Cocker Spaniel	11	1	28.1	Tubulopapillary carcinoma
24	Miniature Schnauzer	7.6	1	3.8	Complex carcinoma
25	Samoyed	10.9	0.5	0.1	Tubulopapillary carcinoma
26	Doberman	8.1	1	15	Complex tubular carcinoma
27	Terrier	10	3	1.9	Tubulopapillary carcinoma
28	German Pointer	8.1	2.5	11.8	Complex tubular carcinoma

Table II. Mean p27 scores and Ki67 expression (proliferation rate) of benign tumors

Case No.	Breed	Age (years)	p27 score	Ki67 %	Diagnosis
1	Cocker Spaniel	8	9	24.8	Tubulopapillary adenoma
2	Yorkshire Terrier	7	11	0.6	Complex adenoma
3	Schnauzer	11	9	17	Tubulopapillary adenoma
4	Lhasa Apso	11.3	10	9.5	Benign mixed tumor
5	Pekingese	9	8	3	Benign mixed tumor
6	Yorkshire Terrier	9.6	7	9.3	Papillary cystadenoma
7	Shih Tzu	7.7	6	12.1	Tubular adenoma
8	Belgian Sheepdog	8.7	6	6.2	Basaloid adenoma
9	Terrier	9.5	8	17.6	Complex adenoma
10	Rottweiler	7.7	9	13.2	Complex adenoma
11	Labrador Retriever	6	8.5	2.5	Complex adenoma
12	Lhasa Apso	8.5	8	4.5	Complex tubular adenoma
13	Mixed	8.1	8	1.4	Benign mixed tumor
14	Collie	10.2	8	5	Complex tubular adenoma
15	Collie	9	7	10.3	Complex tubular adenoma
16	Cocker Spaniel	8	9	1	Complex tubular adenoma
17	Pomeranian	6	12	2.7	Benign mixed tumor
18	Cocker Spaniel	Unknown	10	0.2	Tubulopapillary adenoma
19	Cocker Spaniel	7.5	11.5	1.4	Tubular adenoma
20	Mixed	9.1	11.5	15.7	Benign mixed tumor
21	Pomeranian	9.2	11	3	Benign mixed tumor
22	Cocker Spaniel	8.6	12.5	1.4	Tubular adenoma
23	Pit Bull	10	8	1.1	Complex adenoma
24	Lhasa Apso	8.8	9	1.2	Benign mixed tumor
25	Schnauzer	8.8	5	3.5	Complex tubular adenoma
26	Mixed	8.9	8	8.4	Benign mixed tumor
27	Golden Retriever	9.5	11	15.4	Benign mixed tumor
28	Dachshund	Unknown	3	1.6	Benign mixed tumor

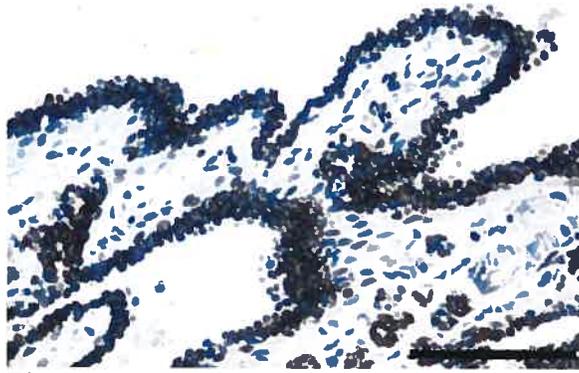


Figure 1

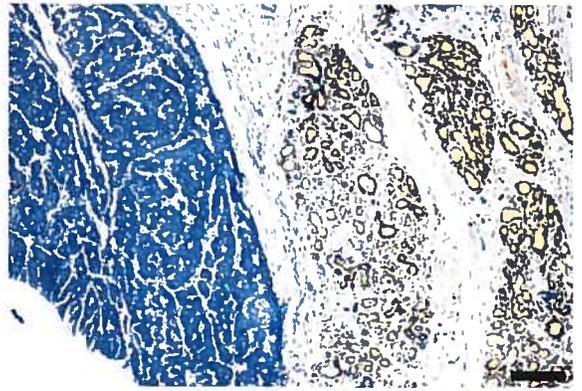


Figure 2

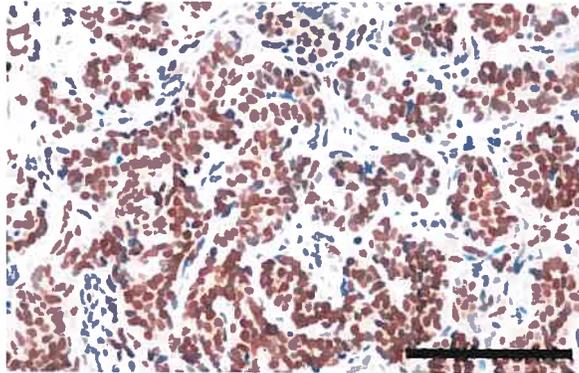


Figure 3

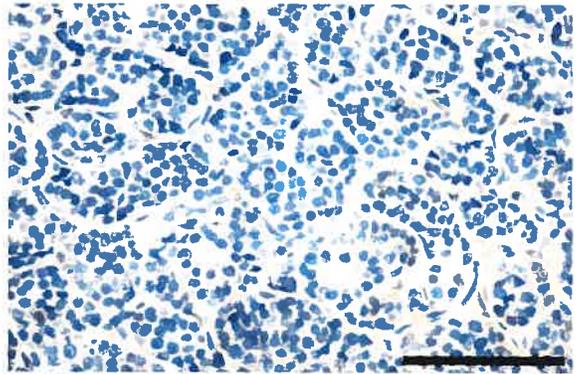


Figure 4

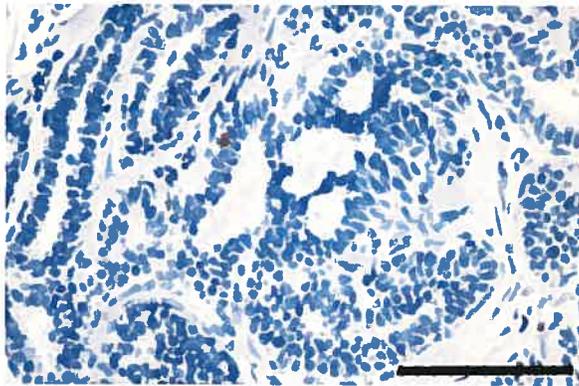


Figure 5

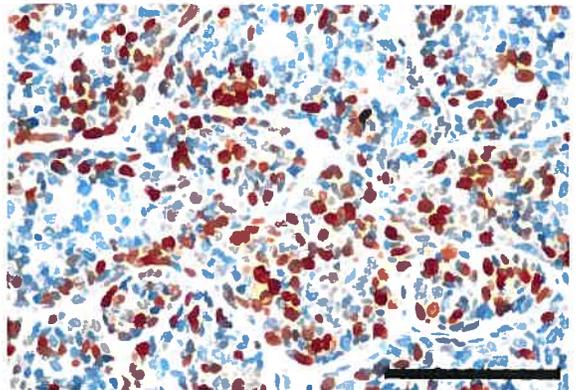


Figure 6

Captions for illustrations

Figure 1. Strong p27 immunostaining in epithelial cells of a benign canine mammary tumor. Avidin-biotin-diamobenzidene-peroxidase complex method with hematoxylin counterstain. Bar = 100 μ m.

Figure 2. Sharp contrast in p27 expression between malignant and non-neoplastic canine mammary cells. On the left, epithelial cells of a malignant tumor show poor p27 immunostaining. On the right, cells from a benign hyperplastic mammary tissue show strong p27 immunostaining. Avidin-biotin-diamobenzidene-peroxidase complex method with hematoxylin counterstain. Bar = 100 μ m.

Figure 3. Strong p27 immunostaining in epithelial cells of a benign canine mammary tumor. Avidin-biotin-diamobenzidene-peroxidase complex method with hematoxylin counterstain. Bar = 100 μ m.

Figure 4. Poor p27 immunostaining in epithelial cells of a malignant canine mammary tumor. Avidin-biotin-diamobenzidene-peroxidase complex method with hematoxylin counterstain. Bar = 100 μ m.

Figure 5. Rare Ki67-positive cells in a benign canine mammary tumor. Avidin-biotin-diamobenzidene-peroxidase complex method with hematoxylin counterstain. Bar = 100 μ m.

Figure 6. Frequent Ki67-positive cells in a malignant canine mammary tumor. Avidin-biotin-diamobenzidene-peroxidase complex method with hematoxylin counterstain. Bar = 100 μ m.

Sources and manufacturers

^a Sunbeam Corporation, Schaumburg, IL.

^b DakoCytomation Inc., Mississauga, Ont.

^c Clone SX53G8, DakoCytomation Inc., Mississauga, Ont.

^d Sigma Diagnostics, St.Louis, MO.

^e Clone MIB-1, DakoCytomation Inc., Mississauga, Ont.

^f NCSS Statistical Software, Kaysville, UT.

References

1. Barnard NJ, Hall PA, Lemoine NR, Kadar N : 1987, Proliferative index in breast carcinoma determined in situ by Ki67 immunostaining and its relationship to clinical and pathological variables. *J Pathol* 152:287-295.
2. Catzavelos C, Bhattacharya N, Ung YC, et al: 1997, Decreased levels of the cell cycle inhibitor p27 protein: prognostic implications in primary breast cancer. *Nat Med* 3:227-230.
3. Cotran RS, Kumar V, Collins T : 1999, Cell cycle and the regulation of cell division and Neoplasia. In : *Robbins pathologic basis of disease*, 6th ed., pp. 89-112 and pp.260-327. W.B. Saunders Company, Philadelphia, PA.
4. Elledge SJ, Harper JW: 1994, Cdk inhibitors: on the threshold of checkpoint and development. *Curr Opin Cell Biol* 6:847-852.
5. Ferrando AA, Balbin M, Pendas AM, et al: 1996, Mutational analysis of the human cyclin-dependent kinase inhibitor p27 in primary breast carcinomas. *Hum Genet* 97: 91-94.
6. Hengst L, Reed SI : 1996, Translational control of p27kip1 accumulation during the cell cycle. *Science* 271:1861-1863.
7. Henson KL : 2001, Reproductive system. In: *Atlas of canine and feline cytology*, ed. Raskin RE, Meyer DJ, pp.277-312. W.B. Saunders Company, Philadelphia, PA.
8. Hunter T, Pines J : 1994, Cyclins and cancer II : cyclin D and CDK inhibitors come of age. *Cell* 79:573-582.
9. Krajewska M, Krajewski S, Epstein JI, et al : 1996, Immunohistochemical analysis of bcl-2, bax, bcl-xl, and mcl-1 expression in prostate cancers. *Am J Pathol* 148:1567-1576.
10. Kunz J, Schmidt A : 1993, Ki67 growth fraction in carcinomas and benign lesions of the breast. *Zentralbl Pathol* 139:201-205.

11. Lee MH, Yang HY : 2001, Negative regulators of cyclin-dependent kinases and their roles in cancers. *Cell Mol Life Sci* 58:1907-1922.
12. Lloyd RV, Erickson LA, Jin L, et al : 1999, p27kip1 : a multifunctional cyclin-dependent kinase inhibitor with prognostic significance in human cancers. *Am J Pathol* 154:313-323.
13. Löhr CV, Teifke JP, Failing K, Weiss E : 1997, Characterization of the proliferation state in canine mammary tumors by the standardized AgNOR method with postfixation and immunohistologic detection of Ki67 and PCNA. *Vet Pathol* 34:212-221.
14. MacLachlan TK, Sang N, Giordano A: 1995, Cyclins, cyclin-dependant kinases and cdk inhibitors: implications in cell cycle control and cancer. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 5:127-156.
15. Madewell BR : 2001, Cellular proliferation in tumors : a review of methods, interpretation, and clinical applications. *J Vet Intern Med* 15:334-340.
16. Madewell B, Griffey S, Walls J, Gandour-Edwards R : 2001, Reduced expression of cyclin-dependent kinase inhibitor p27kip1 in feline lymphoma. *Vet Pathol* 38:698-702.
17. Mayr B, Wilhelm B, Reifinger M, Brem G : 2000, Absence of p21 WAF1 and p27 Kip1 gene mutations in various feline tumours. *Vet Res Commun* 24:115-124.
18. Mink D, Villena-Heinsen C, Tossounidis I, Schmidt W : 1995, Comparison of different methods for determination of proliferative activity of breast carcinomas. *Gynakol Geburtshilfliche Rundsch* 35:53-56.
19. Misdorp W: 2002, Tumors of the mammary gland. In: *Tumors in domestic animals*, ed. Meuten DJ, 4th ed., pp. 576-606. Iowa State University Press, Ames, IA.
20. Morgan DO : 1995, Principles of CDK regulation. *Nature* 374:131-134.

21. Morrison WB: 1998, Canine and feline mammary tumors. In: Cancer in dogs and cats, ed. Cann CC, pp.591-598. Williams & Wilkins, Baltimore, MD.
22. Pagano M, Tam SW, Theodoras AM, et al : 1995, Role of the ubiquitin-proteasome pathway in regulating abundance of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27. *Science* 269:682-685.
23. Pena LL, Nieto AI, Perez-Alenza, et al: 1998, Immunohistochemical detection of Ki-67 and PCNA in canine mammary tumors: relationship to clinical and pathologic variables. *J Vet Diagn Invest* 10:237-246.
24. Porter PL, Malone KE, Heagerty PJ, et al: 1997, Expression of cell-cycle regulators p27 and cyclin E, alone and in combination, correlate with survival in young breast cancer patients. *Nat Med* 3:222-225.
25. Rutteman GR, Withrow SJ, MacEwen EG : 2001, Tumors of the mammary gland. In : Small animal clinical oncology, ed. Withrow SJ, MacEwen EG, 3rd ed., pp.455-477, W.B. Saunders Company, Philadelphia, PA.
26. Sakai H, Yamane T, Yanai T, et al : 2001, Expression of cyclin kinase inhibitor p27kip1 in skin tumours of dogs. *J Comp Pathol* 125:153-158.
27. Schafer KA : 1998, The cell cycle : a review. *Vet Pathol* 35:461-478.
28. Sfacteria A, Bertani C, Costantino G, et al : 2003, Cyclin D1 expression in pre-cancerous and cancerous lesions of the canine mammary gland. *J Comp Path* 128:245-251.
29. Sgambato A, Cittadini A, Faraglia B, Weinstein IB : 2000, Multiple functions of p27kip1 and its alterations in tumor cells : a review. *J Cell Physiol* 183:18-27.
30. Sgambato A, Zhang YJ, Arber N, et al: 1997, Deregulated expression of p27 in human breast cancers. *Clin Cancer Res* 3:1879-1887.

31. Sherr CJ, Roberts JM: 1995, Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes Dev* 9:1149-1163.
32. Slingerland J, Pagano M : 2000, Regulation of the cdk inhibitor p27 and its deregulation in cancer. *J Cell Physiol* 183:10-17.
33. Tan P, Cady B, Wanner M, et al : 1997, The cell cycle inhibitor p27 is an independent prognostic marker in small (T1a,b) invasive breast carcinomas. *Cancer Res* 57:1259-1263.
34. Wiesener B, Hauser-Kronberger CE, Zipperer E, et al : 1998, p34cdc2 in invasive breast cancer : relationship to DNA content, Ki67 index and c-erbB-2 expression. *Histopathology* 33:522-530.

Chapitre troisième

Discussion générale des résultats et conclusion

Tel qu'attendu, les cellules épithéliales du tissu mammaire canin sain démontraient une forte expression de p27. A l'immunohistochimie, leur coloration était intense et très fréquente. L'effet inhibiteur de la p27 sur le cycle cellulaire joue donc un rôle important dans le maintien de ces cellules en état de quiescence (phase G0). Ceci nous a permis d'utiliser des sections de tissu mammaire canin sain en guise de contrôle positif au cours des colorations effectuées sur les néoplasmes. Pour ce qui est des tumeurs bénignes, nous avons observé une coloration généralement forte souvent similaire à celle notée dans les cellules des tissus mammaires sains ce qui suggère que la perte d'expression de p27 est peu prononcée dans la plupart de ces lésions. Quant aux tumeurs malignes, elles démontraient une coloration d'intensité et d'étendue beaucoup plus hétérogènes.

Les résultats ont démontré que le score p27 moyen calculé pour les tumeurs mammaires malignes était significativement plus faible que celui des tumeurs mammaires bénignes. Ceci est similaire à ce qui a été décrit pour le cancer du sein chez la femme (Catzavelos et al 1997, Lloyd et al 1999, Sgambato et al 2000) et pour la plupart des néoplasmes, tant en médecine vétérinaire qu'en médecine humaine, pour lesquels l'expression de p27 a été étudiée jusqu'à maintenant (Lee et Yang 2001, Lloyd et al 1999, Madewell et al 2001, Sakai et al 2001). Nos résultats indiquent qu'une altération de l'expression de p27 est associée à une forte proportion des tumeurs mammaires malignes chez la chienne. Les cellules transformées pourraient ainsi proliférer plus aisément, leur entrée et leur progression dans le cycle cellulaire étant favorisée par la perte d'inhibition des points de contrôle du cycle cellulaire.

Non seulement ces résultats permettent-ils de mieux connaître l'oncogénèse des tumeurs mammaires canines, mais ils indiquent que la détermination immunohistochimique du taux d'expression de p27 pourrait être utile en tant que méthode diagnostique pour ce type de néoplasme. En effet, on peut conclure que les tumeurs pauvres en p27 sont plus susceptibles d'être malignes alors que celles qui sont riches en p27 ont plus de chances d'être bénignes. Notre étude démontre cependant qu'il faut être prudent dans l'interprétation des résultats, car la sensibilité et la spécificité calculées à partir de nos données, bien qu'élevées, indiquent que des faux positifs et des faux négatifs peuvent

survenir. L'analyse statistique révèle que la spécificité et la sensibilité du test sont les plus semblables à une valeur limite de 6. Ainsi, en classifiant nos 56 tumeurs comme étant malignes lorsqu'elles ont un score p27 de 6 ou moins et comme étant bénignes avec un score de plus de 6, la sensibilité et la spécificité du test étaient de 89.3% et 85.7%, respectivement. En appliquant cette valeur limite à nos données, on s'aperçoit que 3 tumeurs malignes et 4 tumeurs bénignes auraient été mal classifiées. Plusieurs hypothèses pourraient expliquer l'obtention de ces quelques résultats inattendus. Tout d'abord, il se peut que certaines tumeurs aient été mal classifiées au départ au moment de l'examen histopathologique. Cependant, puisque deux observateurs indépendants ont examiné les tumeurs et que seules les tumeurs pour lesquelles il y avait un accord ont été incluses dans l'étude, il est peu probable qu'une telle erreur se soit produite. Il est également possible que des problèmes techniques soient survenus lors de la coloration immunohistochimique de certaines tumeurs. L'utilisation de contrôles positif et négatif a permis de limiter les variations pouvant être attribuées aux manipulations. Cependant, des facteurs individuels peuvent avoir influencé les résultats. Par exemple, l'âge des échantillons et le temps passé par les tissus dans la formaldéhyde avant leur incorporation dans la paraffine peuvent affecter le recouvrement antigénique dans certains cas. Cependant, toutes les tumeurs ayant été prélevées en 2000 ou en 2001, la variation pouvant être attribuée à l'âge des spécimens était limitée. Finalement, il est important de prendre en considération que la carcinogénèse est un phénomène multifactoriel et que les cellules tumorales représentent invariablement une population hétérogène (MacLachlan et al 1995). Les facteurs et conditions associés à la transformation néoplasique des cellules peuvent donc varier d'une tumeur à une autre et ceci pourrait expliquer pourquoi le score p27 obtenu n'était pas celui attendu pour certains tissus. Cette théorie s'illustre d'ailleurs en médecine humaine par la découverte, il y a quelques années, de lignées cellulaires mammaires malignes démontrant une expression paradoxalement élevée de p27 en association avec une augmentation des cyclines D et E (Sgambato et al 1997). Les chercheurs auxquels est attribuée cette découverte ont émis l'hypothèse que ceci pourrait être le reflet d'un mécanisme régulateur homéostatique qui protège les cellules tumorales des effets potentiellement toxiques d'une expression accrue de cycline E et/ou D, comme l'induction de l'apoptose. Quoiqu'il en soit, notre étude démontre que le taux de p27 dans les cellules néoplasiques mammaires canines démontre un patron d'altération très fréquent et que, malgré l'occurrence de certains faux-positifs et faux-négatifs, la fréquence de ce bouleversement est assez significative pour justifier

l'utilisation complémentaire de l'immunohistochimie pour la p27 dans le diagnostic de ces tumeurs.

Pour ce qui est du taux d'expression moyen de Ki67, on note qu'il est significativement plus élevé dans les tumeurs malignes, comparativement aux tumeurs bénignes. Ceci reflète une prolifération cellulaire plus élevée dans les tumeurs malignes. Ce résultat est similaire à ce qui a été observé dans le cancer du sein chez la femme (Barnard et al 1987, Kunz et Schmidt 1993, Mink et al 1995, Wiesener et al 1998). D'autres études ayant évalué l'expression de Ki67 dans les tumeurs mammaires canines ont également obtenu des résultats semblables (Löhr et al 1997, Pena et al 1998). Cependant, Löhr et al ont démontré que le recouplement des données individuelles est considérable entre les catégories de tumeurs malignes et bénignes, ce qui rend l'utilisation de cette méthode peu recommandable comme outil diagnostique (Löhr et al 1997). Notre étude démontre des résultats similaires. En effet, lorsque l'on utilise un taux de prolifération limite de 6.5% (valeur pour laquelle la sensibilité et la spécificité sont les plus semblables), la sensibilité et la spécificité du test ne sont que de 57.1% et 60.7%, respectivement. Cette grande variation du taux de prolifération des cellules néoplasiques n'est pas inhabituelle. En effet, plusieurs autres caractéristiques des cellules cancéreuses, autres que leur potentiel prolifératif doivent être prises en considération. Par exemple, le potentiel métastatique d'une tumeur, le degré de différenciation de ses cellules et leur résistance à l'apoptose jouent un rôle important dans la malignité d'un néoplasme, sans nécessairement que ces caractéristiques ne soient associées à la prolifération des cellules (Cotran et al 1999).

La nature hétérogène des populations cellulaires néoplasiques composant plusieurs tumeurs mammaires canines et la variation entre pathologistes quant aux critères de malignité utilisés dans leur classification représentent un problème de taille qui rend leur diagnostic parfois difficile. Aussi, l'examen histopathologique des tissus, en tant que méthode diagnostique seule, est sujet à une certaine subjectivité et justifie le développement d'outils complémentaires montrant une meilleure répétitivité. Dans cette étude, deux observateurs ont indépendamment déterminé le score p27 et le taux d'expression de Ki67 des tumeurs mammaires canines bénignes et malignes. L'étude statistique des données a permis de révéler que l'accord entre les deux observateurs était fort pour les deux paramètres. Ainsi, la variabilité semble minime et les données des deux

observateurs peuvent être considérées équivalentes. Ces résultats indiquent que le calcul du score p27 et la détermination du taux de prolifération par l'expression de Ki67 sont des méthodes relativement objectives. Étant peu sujettes aux variations individuelles, elles ont donc un potentiel diagnostique incontestable. Cependant, il est évident que le score p27 est un outil diagnostique préférable au taux d'expression de Ki67 étant donné sa meilleure sensibilité et spécificité. D'un autre côté, il faut prendre en considération qu'aucune méthode seule n'est infaillible et que ces outils diagnostiques ne devraient être utilisés que de façon complémentaire à l'examen histopathologique des tissus. Nos données indiquent cependant que, si l'on ne devait faire qu'une coloration immunohistochimique complémentaire, il serait préférable de choisir la p27 plutôt que la Ki67. Les résultats ainsi obtenus auraient une sensibilité et une spécificité très acceptables. L'analyse combinée de la p27 et de la Ki67 peut également être utile. En effet, la sensibilité s'en trouve grandement augmentée (92.9%), mais il faut être prudent dans l'interprétation des résultats positifs, car la spécificité de cette analyse combinée est pauvre (50%).

L'étude statistique de nos résultats a également démontré une faible corrélation négative entre le score p27 et le taux de prolifération cellulaire déterminé par l'expression de Ki67. Cette observation est similaire à ce qui a été rapporté pour les tumeurs mammaires chez la femme (Sgambato et al 2000, Tan et al 1997). On s'attendrait pourtant à ce que l'expression de Ki67 soit élevée dans les cellules malignes pauvres en p27 étant donné le manque d'inhibition du cycle cellulaire qui les autorise à proliférer de manière incontrôlée. Cependant, nos résultats démontrent que cela n'est pas nécessairement le cas. L'expression de p27 semble corrélérer plus adéquatement avec le degré de malignité que la Ki67. En médecine humaine, on émet l'hypothèse que d'autres fonctions de la p27, qui ne sont pas associées à son rôle dans la prolifération, soient impliquées dans la carcinogénèse (Sgambato et al 2000). Ainsi, les rôles de la p27 dans l'apoptose et la différenciation cellulaire contribueraient probablement au caractère malin des cellules et expliqueraient pourquoi la détermination de l'expression de la p27 semble refléter la malignité de ces néoplasmes plus efficacement qu'un simple marqueur de prolifération comme la Ki67. Nous pouvons donc supposer que ceci pourrait également être le cas pour l'espèce canine.

Un problème majeur a compliqué le déroulement de cette étude : un biais considérable, mais inévitable, a dû être introduit lors de l'interprétation des résultats à cause

de l'hétérogénéité des cellules rencontrées dans une même tumeur. En effet, dans plusieurs néoplasmes, bien que la plupart des cellules avaient une apparence bénigne, certains foyers de cellules démontraient des critères de malignité plus inquiétants. Cette variation se reflétait également dans l'expression de p27 et de Ki67 à l'immunohistochimie. La même observation a d'ailleurs été rapportée dans la littérature médicale (Catzavelos et al 1997, Sgambato et al 1997). Les régions présentant plus de critères de malignité à l'histopathologie étant plus susceptibles de dicter le pronostic, Catzavelos et al ont sélectionné ces régions lors de l'évaluation du taux d'expression de p27. Aussi, dans une étude portant sur l'expression de Ki67 dans les tumeurs mammaires canines, une approche similaire a été utilisée (Pena et al 1998). Lors du calcul du score p27 et du taux d'expression de Ki67, nous avons donc évalué l'expression des cellules dans les régions démontrant les critères de malignité sur lesquels était basée la classification maligne de la tumeur.

En conclusion, nous avons démontré que le taux d'expression moyen de p27 est plus faible dans les tumeur mammaires canines malignes que dans les tumeurs bénignes. Aussi, le recoupement des scores p27 entre les catégories de néoplasmes est minime. La sensibilité et la spécificité de cette méthode sont suffisamment élevées pour justifier son utilisation dans le diagnostic des tumeurs mammaires canines. Le score p27 possédant une excellente répétitivité, il pourrait grandement améliorer l'objectivité de l'examen histopathologique dans les cas de tumeurs mammaires canines dont la malignité est douteuse. Nos résultats suggèrent qu'un score p27 limite de 6 pourrait être utilisé pour le diagnostic. Pour ce qui est du taux de prolifération déterminé par l'expression de Ki67, bien qu'il soit significativement plus élevé dans les tumeurs malignes que dans les tumeurs bénignes, sa sensibilité et sa spécificité rendent inacceptables son utilisation comme outil diagnostique pour ce type de néoplasme. Son usage en combinaison avec le score p27 améliore cependant la sensibilité de ce dernier, mais réduit considérablement sa spécificité. La corrélation entre le score p27 et l'expression de Ki67 est pauvre.

Étant donné la corrélation importante en médecine humaine entre l'expression de p27 et le pronostic du cancer du sein, il pourrait maintenant être utile de déterminer si une telle association existe chez l'espèce canine par une étude prospective. Si c'est le cas,

l'immunohistochimie pour la p27 pourrait alors grandement influencer le traitement des chiennes atteintes de tumeurs mammaires.

Bibliographie

Barnard NJ, Hall PA, Lemoine NR, Kadar N. Proliferative index in breast carcinoma determined in situ by Ki67 immunostaining and its relationship to clinical and pathological variables. *J Pathol* 1987; 152:287-295.

Capodieci P, Gerald W, Woodruff J, et al. Cytoplasmic localization for p27 in sarcoma. *Proc Am Assoc Cancer Res* 1999; 40:687.

Catzavelos C, Bhattacharya N, Ung YC, et al. Decreased levels of the cell cycle inhibitor p27 protein: prognostic implications in primary breast cancer. *Nat Med* 1997; 3:227-230.

Cockerell GL, Cooper BJ. Disorders of cell growth and cancer biology. Dans: Slauson DO et Cooper BJ, eds. *Mechanisms of disease: a textbook of comparative general pathology*, 3^e édition. St-Louis, MO: Mosby, 2002; 298-377.

Cotran RS, Kumar V, Collins T. Tissue repair, cellular growth, fibrosis, and wound healing. Dans: *Robbins Pathologic basis of disease*, 6^e édition. Philadelphie, PA: W.B. Saunders Company, 1999; 89-112.

Cotran RS, Kumar V, Collins T. Neoplasia. Dans: *Robbins Pathologic basis of disease*, 6^e édition. Philadelphie, PA: W.B. Saunders Company, 1999; 260-327.

Elledge SJ, Harper JW. Cdk inhibitors: on the threshold of checkpoint and development. *Curr Opin Cell Biol* 1994; 6:847-852.

Ferrando AA, Balbin M, Pendas AM, et al. Mutational analysis of the human cyclin-dependent kinase inhibitor p27 in primary breast carcinomas. *Hum Genet* 1996; 97: 91-94.

Hengst L, Reed SI. Translational control of p27 accumulation during the cell cycle. *Science* 1996; 271:1861-1863.

Henson KL. Reproductive system. Dans: Raskin RE et Meyer DJ, éditeurs. Atlas of canine and feline cytology. Philadelphie, PA: W.B. Saunders Company, 2001; 277-312.

Hunter T, Pines J. Cyclins and cancer II: cyclin D and CDK inhibitors come of age. Cell 1994; 79:573-582.

Krajewska M, Krajewski S, Epstein JI, et al. Immunohistochemical analysis of bcl-2, bax, bcl-xl, and mcl-1 expression in prostate cancers. Am J Pathol 1996; 148:1567-1576.

Kunz J, Schmidt A. Ki67 growth fraction in carcinomas and benign lesions of the breast. Zentralbl Pathol 1993; 139:201-205.

Lee MH, Yang HY. Negative regulators of cyclin-dependent kinases and their roles in cancers. Cell Mol Life Sci 2001; 58:1907-1922.

Lloyd RV, Erickson LA, Jin L, et al. p27: a multifunctional cyclin-dependent kinase inhibitor with prognostic significance in human cancers. Am J Pathol 1999; 154:313-323.

Löhr CV, Teifke JP, Failing K, et al. Characterization of the proliferation state in canine mammary tumors by the standardized AgNOR method with postfixation and immunohistologic detection of Ki-67 and PCNA. Vet Pathol 1997; 34:212-221.

MacLachlan TK, Sang N, Giordano A. Cyclins, cyclin-dependant kinases and cdk inhibitors: implications in cell cycle control and cancer. Crit Rev Eukaryot Gene Expr 1995; 5:127-156.

Madewell BR. Cellular proliferation in tumors: a review of methods, interpretation, and clinical applications. J Vet Intern Med 2001; 15:334-340.

Madewell B, Griffey S, Walls J, et al. Reduced expression of cyclin-dependant kinase inhibitor p27 in feline lymphoma. Vet Pathol 2001; 38:698-702.

Mayr B, Wilhelm B, Reifinger M, et al. Absence of p21 WAF1 and p27 Kip1 gene mutations in various feline tumors. *Vet Res Comm* 2000; 24:115-124.

McGill LD, Blue J, Powers B. Commentary: Report of the ad hoc committee on oncology to the ACVP membership and interested pathology community. *Vet Pathol* 2002; 39:525-528.

Mink D, Villena-Heinsen C, Tossounidis I, Schmidt W. Comparison of different methods for determination of proliferative activity of breast carcinomas. *Gynakol Geburtshilfliche Rundsch* 1995; 35:53-56.

Misdorp W. Tumors of the mammary gland. Dans: Meuten DJ, éditeur. *Tumors in domestic animals*, 4^e édition. Ames, IA: Iowa State Press, 2002; 575-606.

Morgan DO. Principles of CDK regulation. *Nature* 1995; 374:131-134.

Morrison WB. Canine and feline mammary tumors. Dans: Cann CC, éditeur. *Cancer in dogs and cats*. Baltimore, MD: Williams & Wilkins, 1998; 591-598.

Nakayama K, Ishida N, Shirane M, et al. Mice lacking p27 display increased body size, multiple organ hyperplasia, retina dysplasia and pituitary tumors. *Cell* 1996;85:707-721.

Pagano M, Tam SW, Theodoras AM, et al. Role of the ubiquitin-proteasome pathway in regulating abundance of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27. *Science* 1995; 269:682-685.

Pena LL, Nieto AI, Perez-Alenza, et al. Immunohistochemical detection of Ki-67 and PCNA in canine mammary tumors: Relationship to clinical and pathologic variables. *J Vet Diagn Invest* 1998; 10:237-246.

Porter PL, Malone KE, Heagerty PJ, et al. Expression of cell-cycle regulators p27 and cyclin E, alone and in combination, correlate with survival in young breast cancer patients. *Nat Med* 1997; 3:222-225.

Rutteman GR, Withrow SJ, MacEwen EG. Tumors of the mammary gland. Dans: Small animal clinical oncology, 3^e édition. Philadelphie, PA: W.B. Saunders Company, 2001; 455-477.

Sakai H, Yamane T, Yanai T, et al. Expression of cyclin kinase inhibitor p27 in skin tumors of dogs. *J Comp Path* 2001; 125:153-158.

Schafer KA. The cell cycle: a review. *Vet Pathol* 1998; 35:461-478.

Sfacteria A, Bertani C, Costantino G, et al. Cyclin D1 expression in pre-cancerous and cancerous lesions of the canine mammary gland. *J Comp Path* 2003; 128:245-251.

Sgambato A, Cittadini A, Faraglia B, et al. Multiple functions of p27 and its alterations in tumor cells: a review. *J Cell Physiol* 2000; 183:18-27.

Sgambato A, Zhang YJ, Arber N, et al. Deregulated expression of p27 in human breast cancers. *Clin Cancer Res* 1997; 3:1879-1887.

Sherr CJ, Roberts JM. Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes Dev* 1995; 9:1149-1163.

Slingerland J, Pagano M. Regulation of the cdk inhibitor p27 and its deregulation in cancer. *J Cell Physiol* 2000; 183:10-17.

Tan P, Cady B, Wanner M, et al. The cell cycle inhibitor p27 is an independent prognostic marker in small (T1a,b) invasive breast carcinomas. *Cancer Res* 1997; 57:1259-1263.

Wiesener B, Hauser-Kronberger CE, Zipperer E, et al. p34cdc2 in invasive breast cancer: relationship to DNA content, Ki67 index and c-erbB-2 expression. *Histopathology* 1998; 33:522-530.

ACCORD ET PERMISSION DES COAUTEURS D'UN ARTICLE¹

IDENTIFICATION DE L'ÉTUDIANT

Nom de l'étudiant Sébastien Overvelde		Code permanent [REDACTED]
Sigle du programme M.Sc.	Titre du programme Sciences vétérinaires	Option Pathologie

DESCRIPTION DE L'ARTICLE

Auteurs Sébastien Overvelde, Michel Desnoyers, Christiane Girard	
Titre Expression of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 ^{kip1} in benign and malignant mammary tumors of dogs.	
Revue Journal of Veterinary Diagnostic Investigation	Date de publication Sera soumis en février 2004

DÉCLARATION DES COAUTEURS

Déclaration		
<i>À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, j'autorise le microfilmage du mémoire et je suis d'accord que Sébastien Overvelde inclut cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre : Détermination immunohistochimique de l'expression de p27^{kip1} dans les tumeurs mammaires canines.</i>		
Coauteur Michel Desnoyers	[REDACTED]	Date 02/20/2004
Coauteur Christiane Girard	[REDACTED]	Date 02/20/2004
Coauteur	Signature	Date

Envoyé à la FÉS le

¹Annexe II du Guide de présentation et d'évaluation des mémoires de maîtrise et des thèses de doctorat, mars 2001