

Université de Montréal

Caractérisation du potentiel métastatique des carcinomes mammaires
de phénotype basal

par
Andrée-Anne Grosset

Département de pathologie et biologie cellulaire
Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de M.Sc.
en Pathologie et biologie cellulaire
option Biologie du cancer

Août, 2009

©, Andrée-Anne Grosset, 2009

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Caractérisation du potentiel métastatique des carcinomes mammaires
de phénotype basal

présenté par :

Andrée-Anne Grosset

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Roger Lippé
président-rapporteur

Louis Gaboury
directeur de recherche

Yves St-Pierre
codirecteur

Nicole Leclerc
membre du jury

RÉSUMÉ ET MOTS CLÉS

Au Canada, on estime qu'une femme sur neuf développera un cancer du sein et qu'une femme sur vingt-huit en mourra. Les carcinomes mammaires de phénotype basal qui comprennent environ 15 à 25% des cancers envahissants du sein sont des tumeurs malignes ayant un très mauvais pronostic. Dans ce type tumoral, les métastases sont fréquentes et les décès nombreux. La formation des métastases est un processus complexe qui comprend plusieurs étapes; chacune peut être étudiée par des marqueurs spécifiques. Notre hypothèse de recherche est que le carcinome mammaire de phénotype basal possède des caractéristiques spécifiques qui permettent d'expliquer son potentiel métastatique élevé.

Six micromatrices tissulaires comprenant un total de 213 tumeurs mammaires ont été confectionnées. L'expression des marqueurs usuels de la métastase et celle de nouveaux marqueurs a été étudiée par des techniques d'immunohistochimie.

L'étude comparative de l'expression des marqueurs du potentiel métastatique par les carcinomes mammaires de phénotype basal indique que les protéines Ki-67, EGFR, CD276 et galectine-7 sont étroitement reliées à ce type de cancer. De plus, l'expression du marqueur GATA-3, un marqueur anti-métastatique, fait complètement défaut. Nos résultats confirment que le cancer du sein de phénotype basal possède un plus grand potentiel métastatique que les autres sous-types génétiques et suggèrent que la galectine-7 puisse être impliquée.

Mots clés : cancer du sein, immunohistochimie, métastases, micromatrice tissulaire.

ABSTRACT AND KEYWORDS

In Canada, we estimate that one woman in nine will develop a breast cancer, and one woman in twenty-eight will succumb of her disease. The basal-like breast cancer which represents 15 to 25% of invasive breast cancer, is associated with a poor prognosis. Metastases are the main cause of mortality for patients affected from cancer. Many steps are involved in the metastatic cascade. Each step can be studied using specific markers. Our research hypothesis is that basal-like breast cancer have distinct characteristics which can explain their higher metastatic potential and poor overall survival.

Six tissue microarrays comprising a total of 213 breast tumors were assembled. The relative expression of conventional and putative metastasis related markers was studied using immunohistochemistry.

When the expression of metastatic potential markers was evaluated in breast carcinomas, basal-like breast cancer was found to express higher levels of Ki-67, EGFR, CD276 and galectin-7. Furthermore, GATA-3, an antimetastatic protein, was found to be completely absent in basal-cell type breast cancers. Our results confirm that the basal-like breast cancer has a highest metastatic potential than the other molecular subtypes and suggest that galectin-7 may play a role.

Keywords : basal-like subtype, breast cancer, immunohistochemistry, metastasis, tissue microarray.

TABLE DES MATIÈRES

| | |
|--|-------------|
| RÉSUMÉ ET MOTS CLÉS..... | I |
| ABSTRACT AND KEYWORDS | II |
| TABLE DES MATIÈRES..... | III |
| LISTE DES TABLEAUX..... | VI |
| LISTE DES FIGURES | VIII |
| LISTE DES SIGLES ET DES ABRÉVIATIONS | XII |
| INTRODUCTION | 1 |
| I. LE SEIN..... | 1 |
| II. LE CANCER DU SEIN..... | 2 |
| II.1 Introduction..... | 2 |
| II.2 Les Types histologiques des carcinomes mammaires infiltrants..... | 3 |
| II.2a Le type histologique canalaire..... | 4 |
| II.2b Le type histologique médullaire typique..... | 4 |
| II.3 Les Sous-types d'expression génique des carcinomes mammaires..... | 5 |
| II.3a Le sous-type luminal A..... | 6 |
| II.3b Le sous-type surexprimant la protéine HER-2 | 7 |
| II.3c Le phénotype basal | 9 |
| III. LES MÉTASTASES | 13 |
| III.1 Introduction | 13 |
| III.2 Les étapes de la cascade métastatique et leurs marqueurs | 13 |
| III.2a Prolifération cellulaire : Ki-67 et p53..... | 13 |
| III.2b Invasion de la matrice extracellulaire : galectine-7 et MMP-3 | 14 |
| III.2c Ensemble du processus métastatique : EGFR | 17 |
| III.3 Les marqueurs non-associés à une étape de la cascade métastatique..... | 18 |

| | |
|---|-----------|
| III.3a La protéine CD276 impliquée dans l'adhésion, l'invasion et la migration des cellules tumorales | 19 |
| III.3b GATA-3 : une protéine antimétastatique | 20 |
| HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS DE RECHERCHE | 22 |
| MATÉRIEL ET MÉTHODES | 23 |
| I. SÉLECTION DES PATIENTES | 23 |
| I.1 Comité d'éthique..... | 23 |
| I.2 Sélection des tumeurs..... | 23 |
| II. CONFECTION DES MICROMATRICES TISSULAIRES..... | 24 |
| III. COLORATIONS IMMUNOHISTOCHIMIQUES | 24 |
| IV. QUANTIFICATION DU MARQUAGE IMMUNOHISTOCHIMIQUE..... | 25 |
| V. ANALYSES STATISTIQUES..... | 26 |
| RÉSULTATS..... | 29 |
| I. DÉFINITION DES TYPES DE CANCER DU SEIN..... | 29 |
| II. LES MARQUEURS DU CANCER DU SEIN..... | 30 |
| I.1 Les récepteurs oestrogéniques (ER)..... | 31 |
| I.2 Les récepteurs de progestérone (PR)..... | 31 |
| I.3 La protéine HER-2 | 32 |
| I.4 Les cytokératines 5 et 6 (CK5/6) | 33 |
| I.5 La cytokératine 14 (CK14)..... | 34 |
| II. LES MARQUEURS DU POTENTIEL MÉTASTATIQUE..... | 48 |
| II.1 Ki-67 | 48 |
| II.2 p53 | 49 |
| II.3 CD276..... | 50 |
| II.4 Galectine-7..... | 52 |
| II.5 GATA-3 | 53 |
| II.6 EGFR | 54 |
| II.7 Métalloprotéase de la matrice 3 (MMP-3)..... | 55 |

LISTE DES TABLEAUX

| | | |
|---------------------|--|----|
| Tableau I | Classification et définitions des sous-types d'expression génique du cancer du sein..... | 6 |
| Tableau II | Marqueurs utilisés en immunohistochimie pour vérifier le statut des protéines associées au cancer du sein..... | 26 |
| Tableau III | Marqueurs utilisés en immunohistochimie pour vérifier le potentiel métastatique des carcinomes mammaires..... | 27 |
| Tableau IV | Protocoles d'immunohistochimie pour la révélation des protéines associées au cancer du sein ou au potentiel métastatique | 27 |
| Tableau V | Comparaison des carcinomes mammaires de haut grade de phénotype basal et de bas grade pour le pourcentage de cellules tumorales positives pour les différents marqueurs du cancer du sein..... | 42 |
| Tableau VI | Comparaison des carcinomes mammaires de phénotype basal et luminal A pour le pourcentage de cellules tumorales positives pour les différents marqueurs du cancer du sein | 43 |
| Tableau VII | Comparaison des carcinomes mammaires de phénotype basal et surexprimant HER-2 pour le pourcentage de cellules tumorales positives pour les différents marqueurs du cancer du sein | 44 |
| Tableau VIII | Comparaison des carcinomes mammaires canaux de phénotype basal et médullaires typiques pour le pourcentage de cellules tumorales positives pour les différents marqueurs du cancer du sein | 45 |
| Tableau IX | Comparaison des carcinomes mammaires de haut grade de phénotype basal et de bas grade pour le pourcentage de cellules tumorales positives pour les différents marqueurs du potentiel métastatique..... | 66 |

| | | |
|---------------------|--|----|
| Tableau X | Comparaison des carcinomes mammaires de haut grade de phénotype basal et de bas grade pour l'intensité des cellules tumorales positives pour le marqueur du potentiel métastatique MMP-3 | 66 |
| Tableau XI | Comparaison des carcinomes mammaires de phénotype basal et luminal A pour le pourcentage de cellules tumorales positives pour les différents marqueurs du potentiel métastatique | 67 |
| Tableau XII | Comparaison des carcinomes mammaires de phénotype basal et luminal A pour l'intensité des cellules tumorales positives pour le marqueur du potentiel métastatique MMP-3 | 67 |
| Tableau XIII | Comparaison des carcinomes mammaires de phénotype basal et surexprimant HER-2 pour le pourcentage de cellules tumorales positives pour les différents marqueurs du potentiel métastatique | 68 |
| Tableau XIV | Comparaison des carcinomes mammaires de phénotype basal et surexprimant HER-2 pour l'intensité des cellules tumorales positives pour le marqueur du potentiel métastatique MMP-3 | 68 |
| Tableau XV | Comparaison des carcinomes mammaires canauxiaux de phénotype basal et médullaires typiques pour le pourcentage de cellules tumorales positives pour les différents marqueurs du potentiel métastatique | 69 |
| Tableau XVI | Comparaison des carcinomes mammaires canauxiaux de phénotype basal et médullaires typiques pour l'intensité des cellules tumorales positives pour le marqueur du potentiel métastatique MMP-3 | 69 |

LISTE DES FIGURES

- Figure 1.** Coupe histologique d'un sein normal (lobule) colorée à l'Hémathoxyline-Phloxine-Safran (HPS)..... 1
- Figure 2.** Coupes histologiques de carcinomes mammaires colorées à l'Hémathoxyline-Éosine-Safran (HES) : (A) deux carcinomes *in situ*; (B) un carcinome invasif . 2
- Figure 3.** Coupes histologiques de carcinomes mammaires colorées à l'Hémathoxyline-Éosine-Safran (HES) : (A) un carcinome de bas grade (I); (B) un carcinome de haut grade (III) 3
- Figure 4.** Coupe histologique d'un carcinome mammaire infiltrant canalaire colorée à l'Hémathoxyline-Éosine-Safran (HES) 4
- Figure 5.** Coupe histologique d'un carcinome mammaire médullaire colorée à l'Hémathoxyline-Éosine-Safran (HES) 5
- Figure 6.** Marquage membranaire de la protéine HER-2 à différents niveaux dans le carcinome mammaire de haut grade : (A) 0 (négatif); (B) 1+ (négatif); (C) 2+ (douteux); (D) 3+ (positif) 8
- Figure 7.** Coupe histologique d'un carcinome mammaire canalaire de phénotype basal colorée à l'Hémathoxyline-Éosine-Safran (HES) 11
- Figure 8.** Expression des marqueurs du cancer du sein dans le sein normal : (A) récepteurs oestrogéniques (ER); (B) récepteurs de progestérone (PR)..... 35
- Figure 9.** Expression des marqueurs du cancer du sein dans le sein normal : (A) absence de la protéine HER-2; (B) cytokératines 5 et 6 (CK5/6); (C) cytokératine 14 (CK14)..... 36

| | |
|---|----|
| Figure 10. Marquage nucléaire des récepteurs oestrogéniques (ER) à différents niveaux dans le carcinome mammaire de haut grade. | 37 |
| Figure 11. Marquage nucléaire des récepteurs de progestérone (PR) à différents niveaux dans le carcinome mammaire de haut grade. | 38 |
| Figure 12. Marquage membranaire de HER-2 à différents niveaux dans le carcinome mammaire de haut grade. | 39 |
| Figure 13. Marquage membranaire et cytoplasmique de CK5/6 à différents niveaux dans le carcinome mammaire de haut grade. | 40 |
| Figure 14. Marquage membranaire et cytoplasmique de CK14 à différents niveaux dans le carcinome mammaire de haut grade. | 41 |
| Figure 15. Moyenne du pourcentage de cellules tumorales positives pour les différents marqueurs du cancer du sein pour les carcinomes mammaires de haut grade de phénotype basal et de bas grade. | 46 |
| Figure 16. Moyenne du pourcentage de cellules tumorales positives pour les différents marqueurs du cancer du sein pour les carcinomes mammaires de phénotype basal et luminal A. | 46 |
| Figure 17. Moyenne du pourcentage de cellules tumorales positives pour les différents marqueurs du cancer du sein pour les carcinomes mammaires de phénotype basal et surexprimant HER-2. | 47 |
| Figure 18. Moyenne du pourcentage de cellules tumorales positives pour les différents marqueurs du cancer du sein pour les carcinomes mammaires canauxaires de phénotype basal et médullaires typiques. | 47 |

| | |
|---|----|
| Figure 19. Expression des marqueurs du potentiel métastatique dans le sein normal : (A) Ki-67; (B) absence de p53 muté; (C) CD276..... | 56 |
| Figure 20. Expression des marqueurs du potentiel métastatique dans le sein normal : (A) Galectine-7; (B) GATA-3; (C) EGFR..... | 57 |
| Figure 21. Expression des marqueurs du potentiel métastatique dans le sein normal : Métalloprotéase 3 (MMP-3)..... | 58 |
| Figure 22. Marquage nucléaire de Ki-67 à différents niveaux dans le carcinome mammaire de haut grade | 59 |
| Figure 23. Marquage nucléaire de p53 à différents niveaux dans le carcinome mammaire de haut grade | 60 |
| Figure 24. Marquage membranaire de CD276 à différents niveaux dans le carcinome mammaire de haut grade. | 61 |
| Figure 25. Marquage cytoplasmique et nucléaire de la galectine-7 à différents niveaux dans le carcinome mammaire de haut grade | 62 |
| Figure 26. Marquage nucléaire de GATA-3 à différents niveaux dans le carcinome mammaire de haut grade | 63 |
| Figure 27. Marquage membranaire et cytoplasmique d'EGFR à différents niveaux dans le carcinome mammaire de haut grade..... | 64 |
| Figure 28. Marquage cytoplasmique de MMP-3 à différents niveaux dans le carcinome mammaire de haut grade. | 65 |

- Figure 29.** Moyenne du pourcentage de cellules tumorales positives pour les différents marqueurs du potentiel métastatique pour les carcinomes mammaires de haut grade de phénotype basal et de bas grade. 70
- Figure 30.** Moyenne de l'intensité des cellules tumorales positives pour le marqueur du potentiel métastatique MMP-3 pour les carcinomes mammaires de haut grade de phénotype basal et de bas grade. 70
- Figure 31.** Moyenne du pourcentage de cellules tumorales positives pour les différents marqueurs du potentiel métastatique pour les carcinomes mammaires de phénotype basal et luminal A. 71
- Figure 32.** Moyenne de l'intensité des cellules tumorales positives pour le marqueur du potentiel métastatique MMP-3 pour les carcinomes mammaires de phénotype basal et luminal A. 71
- Figure 33.** Moyenne du pourcentage de cellules tumorales positives pour les différents marqueurs du potentiel métastatique pour les carcinomes mammaires de phénotype basal et surexprimant HER-2. 72
- Figure 34.** Moyenne de l'intensité des cellules tumorales positives pour le marqueur du potentiel métastatique MMP-3 pour les carcinomes mammaires de phénotype basal et surexprimant HER-2. 72
- Figure 35.** Moyenne du pourcentage de cellules tumorales positives pour les différents marqueurs du potentiel métastatique pour les carcinomes mammaires canaux de phénotype basal et médullaires typiques. 73
- Figure 36.** Moyenne de l'intensité des cellules tumorales positives pour le marqueur du potentiel métastatique MMP-3 pour les carcinomes mammaires canaux de phénotype basal et médullaires typiques. 73

LISTE DES SIGLES ET DES ABRÉVIATIONS

CHUM : Centre Hospitalier de l'Université de Montréal

CK : cytokératines

CK5/6 : cytokératines 5 et 6

CK14 : cytokératine 14

CK8/18 : cytokératines 8 et 18

CK17 : cytokératine 17

EGF : facteur de croissance épidermique

EGFR/HER-1 : récepteur du facteur de croissance épidermique humain 1

ER : récepteur œstrogénique

FGF : facteur de croissance fibroblastique

FISH : hybridation fluorescente *in situ*

HER-2 : récepteur du facteur de croissance épidermique humain 2

HES : Hématoxyline-Éosine-Safran

HPS : Hématoxyline-Phloxine-Safran

IHC : immunohistochimie

MMT : micromatrice tissulaire

MMP-3 : métalloprotéase de la matrice 3

PARP1 : Poly(ADP-ribose) polymérase 1

PR : récepteur de progestérone

SAI : sans autre indication

SBR-EE : Scarff-Bloom-Richardson et Elston Ellis

SERM : modulateur sélectif des récepteurs oestrogéniques

TAA : antigène associé aux tumeurs

TNF- α : facteur de croissance transformant alpha

VEGF : facteur de croissance de l'endothélium vasculaire

À l'homme de ma vie

Je remercie mon directeur, le Dr Louis Gaboury, ainsi que les membres de mon laboratoire : Denis Rodrigue, Julie Hinsinger, Micheline Fortin et Melina Narlis pour leur disponibilité, leurs bons conseils et leur amitié.

De plus, je remercie mon co-directeur, le Dr Yves St-Pierre, et son équipe : Diane Tremblay, Carole Campion, Katherine Biron-Pain et Julie Couillard, pour leur collaboration à mon projet.

Je remercie les Instituts de recherche en santé du Canada (IRSC), ainsi que la Faculté des études supérieures et postdoctorales (FESP) et le département de pathologie et biologie cellulaire pour leur soutien financier.

Enfin, je remercie mes proches qui croient toujours en moi.

INTRODUCTION

I. Le sein

Le sein, c'est-à-dire la glande mammaire humaine, est un organe pair solidement appuyé contre le muscle pectoral qui permet l'apport de lait et d'anticorps maternels à l'enfant. La glande mammaire se compose de stroma fibro-adipeux et d'acini sécrétoires contenus dans des lobules et reliés à des canaux. Ce sont les canaux galactophores qui acheminent la sécrétion depuis les lobules jusqu'aux sinus lactifères, puis au mamelon (Robbins et Cotran, 2005). Les canaux et les lobules sont tapissés d'une couche de cellules épithéliales lumineuses entourée elle-même d'une assise de cellules myoépithéliales et d'une membrane basale (Figure 1). Les cellules myoépithéliales, aussi connues sous le nom de cellules basales, sont responsables de l'éjection du lait des cellules lumineuses de par leur fonction contractile. Elles sont aussi importantes pour le maintien de la structure et de la fonction du lobule et de la membrane basale. La majorité des cancers du sein ont pour origine les cellules épithéliales; c'est pourquoi on les appelle carcinomes (Lakhani et O'Hare, 2001).

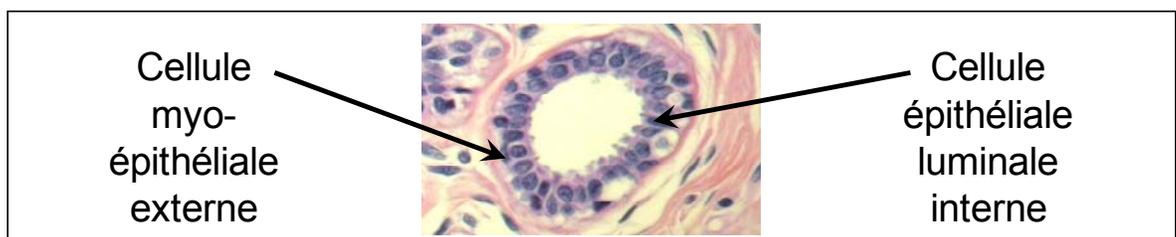


Figure 1. Coupe histologique de sein normal (lobule) colorée à l'Hématoxyline-Phloxine-Safran (HPS). (grossissement original x 400).

II. Le cancer du sein

II.1 Introduction

Au Canada, le cancer du sein est le cancer le plus fréquent chez la femme. Il est aussi responsable du plus grand nombre de décès, après le cancer du poumon. On estime qu'une femme sur neuf développera un cancer du sein et qu'une femme sur vingt-huit en mourra (Comité directeur de la Société canadienne du cancer : Statistiques canadiennes sur le cancer 2009).

On distingue les carcinomes *in situ* des carcinomes infiltrants. Le terme *in situ* (Figure 2A) indique que la population de cellules tumorales est limitée par la membrane basale des canaux et des lobules. Cette barrière anatomique empêche les cellules tumorales de migrer dans les vaisseaux sanguins et lymphatiques pour former des métastases (Silverstein, 2000). En revanche, les carcinomes **infiltrants** (Figure 2B), aussi connus sous le nom de carcinomes envahissants, peuvent envahir le stroma et les vaisseaux pour essaimer à distance, suite à une effraction de la membrane basale (Man et Sang, 2004).

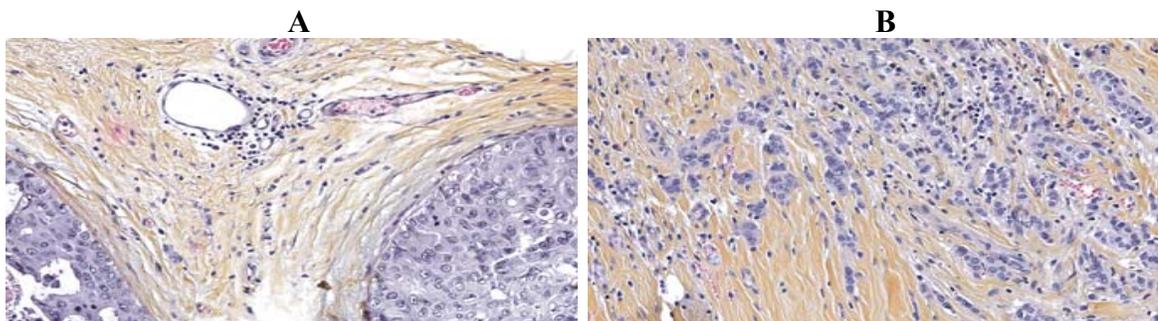


Figure 2. Coupes histologiques de carcinomes mammaires colorées à l'Hématoxyline-Éosine-Safran (HES) : (A) carcinome *in situ* touchant deux canaux; (B) un carcinome infiltrant. (grossissement original x 200).

Les carcinomes mammaires envahissants peuvent aussi être classés selon leur grade histologique. Cette classification porte le nom de Scarff-Bloom-Richardson et Elston-Ellis (SBR-EE). Elle s'appuie sur les critères suivants: formation de tubules, polymorphisme nucléaire et mitoses dans le néoplasme. Les tumeurs de **bas grade** (Figure 3A) conservent une architecture tubulaire, des noyaux petits et uniformes et renferment peu de cellules en mitose. Elles sont donc bien différenciées, connaissent une évolution lente et ne forment que rarement des métastases. Les tumeurs de **haut grade** (Figure 3B) perdent leur architecture tubulaire, sont munies de gros noyaux polymorphes et présentent une activité mitotique élevée. Comme elles sont peu différenciées, elles ont une évolution rapide et une tendance à former plus souvent des métastases (Elston et Ellis, 1991).

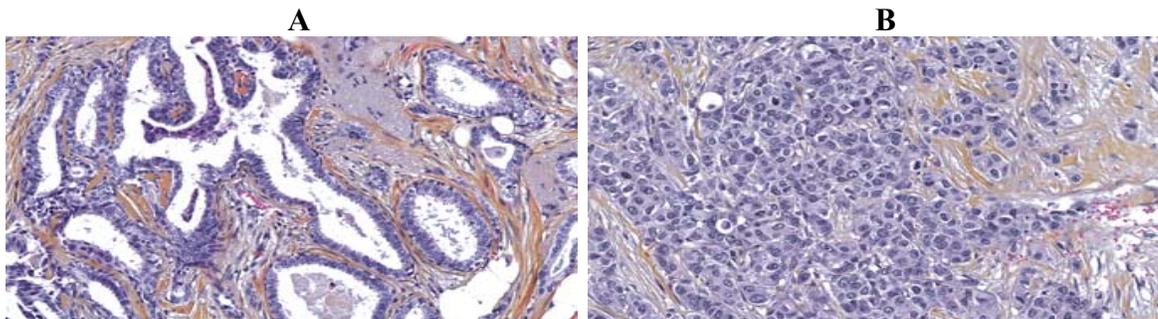


Figure 3. Coupes histologiques de carcinomes mammaires colorées à l'Hématoxyline-Eosine-Safran (HES) : (A) un carcinome de bas grade (I); (B) un carcinome de haut grade (III). (grossissement original x 200).

II.2 Les Types histologiques des carcinomes mammaires infiltrants

On classe généralement les carcinomes mammaires envahissants selon leur type histologique. Par ordre décroissant de fréquence, on reconnaît les types suivants : canalaire SAI (sans autre indication), lobulaire, tubulaire, mucineux, médullaire, papillaire et métaplasique (Robbins et Cotran, 2005).

II.2a Le type histologique canalaire

Les carcinomes mammaires canauxaux envahissants SAI (Figure 4) sont les plus nombreux et comptent pour environ 70% à 80% des cancers infiltrants. Ils comprennent l'ensemble des cancers du sein dépourvus de caractéristiques histologiques distinctes. On croit que ces tumeurs prennent naissance des cellules épithéliales des unités ductulo-lobulaires.

Ces tumeurs varient beaucoup et constituent un groupe très hétérogène. Elles peuvent ou non exprimer les récepteurs hormonaux et surexprimer ou non le récepteur du facteur de croissance épidermique humain 2 (HER-2) (Faratian *et al*, 2009).

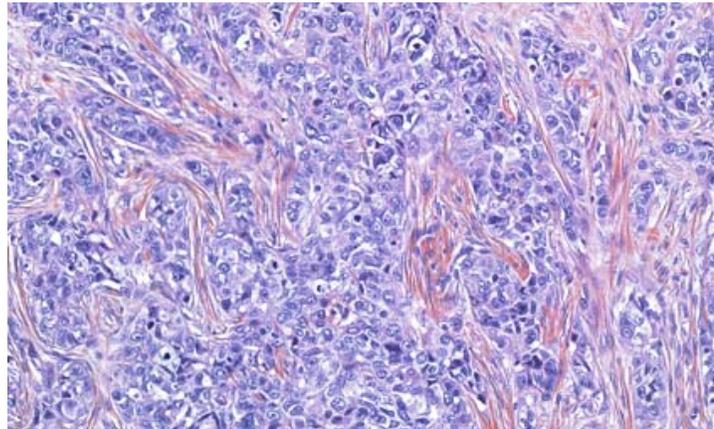


Figure 4. Coupe histologique d'un carcinome mammaire infiltrant canalaire colorée à l'Hémathoxyline-Éosine-Safran (HES). (grossissement original x 200).

II.2b Le type histologique médullaire typique

Les carcinomes mammaires de type médullaire (Figure 5) sont rares (moins de 2% des cancers du sein), mais se reconnaissent aisément. Les critères histologiques établis par le Dr Ridolfi et ses collègues qui permettent de poser ce diagnostic sont les suivants : mode de croissance syncytial dans plus de 75% du volume tumoral, contours nets et bien définis de la

tumeur, infiltrat inflammatoire riche en lymphocytes et plasmocytes autour et à l'intérieur de la tumeur, absence de composantes intracanalaires associées (Ridolfi *et al*, 1977).

D'autres caractéristiques biologiques lui sont souvent associées : grade nucléaire élevé, aneuploïdie, défaut d'expression des récepteurs hormonaux, absence de surexpression de la protéine HER-2 et index de prolifération élevé. De façon paradoxale, ce type histologique conserve un bon pronostic et les métastases ganglionnaires lymphatiques surviennent rarement (Eichhorn, 2004).

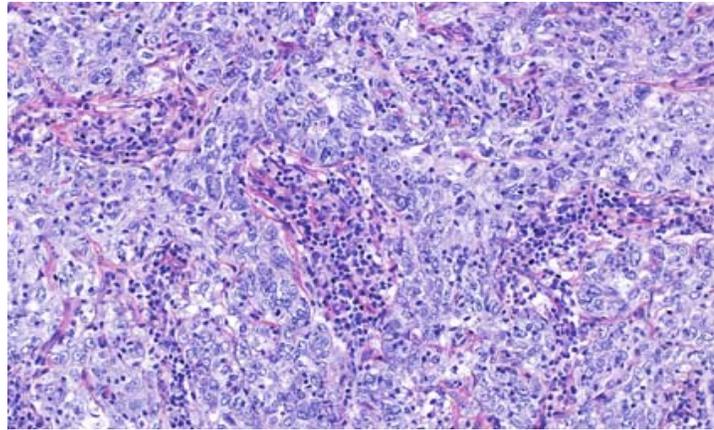


Figure 5. Coupe histologique d'un carcinome mammaire médullaire colorée à l'Hématoxyline-Éosine-Safran (HES). (grossissement original x 200).

II.3 Les Sous-types d'expression génique des carcinomes mammaires

Afin d'améliorer la classification des cancers mammaires et mieux prédire la réponse au traitement, l'équipe du Dr Perou a voulu ranger les carcinomes mammaires en sous-types d'après leur profil d'expression génique. Ainsi, il a été montré que l'on pouvait distinguer plusieurs patrons de différenciation distincts : luminal A, luminal B, phénotype normal, surexpression de la protéine HER-2 et phénotype basal (Perou *et al*, 2000).

Tableau I Classification et définitions des sous-types d'expression génique du cancer du sein

| Sous-types du cancer du sein | Définitions |
|------------------------------|--------------------------------|
| Luminal A | ER+, HER-2- |
| Luminal B | ER+, HER-2+ |
| HER-2 | HER-2+, ER-, PR- |
| Phénotype basal | ER-, HER-2-, CK5/6+, EGFR+ |
| Phénotype normal | ER-, PR-, HER-2-, CK5/6- EGFR- |

(Perou *et al*, 2000) (Sorlie *et al*, 2001) (Nielsen *et al*, 2004)

II.3a Le sous-type luminal A

Ce sous-type se définit par un profil d'expression génique caractéristique des cellules luminales du sein : expression coordonnée des récepteurs hormonaux, oestrogéniques (ER) et de progestérone (PR), des cytokératines luminales, c'est-à-dire les cytokératines 8 et 18 (CK8/18) et du facteur transcriptionnel GATA-3 (Perou *et al*, 2000) (Badve et Nakshatri, 2009).

L'expression des récepteurs hormonaux peut être mise en évidence à l'aide d'une réaction immunohistochimique. Le marquage s'observe dans le noyau des cellules tumorales. Le pourcentage de noyaux marqués dans la tumeur permet de juger de la réponse à l'hormonothérapie (Zafrani *et al*, 2000).

Comme on peut s'y attendre, ce sous-type correspond principalement à des tumeurs de bas grade qui prolifèrent lentement, mais se retrouve également dans les tumeurs de haut grade.

C'est pourquoi le sous-type luminal A confère généralement un meilleur pronostic aux patientes atteintes avec une survie à 5 ans chez plus de 95% des femmes (Badve et Nakshatri, 2009).

L'hormonothérapie est le traitement de choix pour les tumeurs du sein de type luminal A. L'anti-oestrogènes le plus utilisé, aussi connus sous le nom de modulateur sélectif des récepteurs oestrogéniques (SERM), est le tamoxifène. Il agit en bloquant les récepteurs oestrogéniques des cellules cancéreuses et entrave la signalisation par l'oestrogène (Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group, 1998). De nouveaux agents, comme les inhibiteurs de l'aromatase, peuvent limiter la production de l'hormone cible, l'oestrogène, mais leur utilisation est généralement réservée aux femmes post-ménopausées (Mauri *et al*, 2006).

II.3b Le sous-type surexprimant la protéine HER-2

Le récepteur du facteur de croissance épidermique humain 2 (HER-2) est surexprimé dans environ 20% des cancers du sein. Cette surexpression est généralement associée à une amplification du gène *HER-2* situé sur le chromosome 17 (Ross *et al*, 2004).

La surexpression de la protéine HER-2 peut aussi être mesurée en clinique à l'aide d'une réaction immunohistochimique. Le marquage s'observe à la membrane cellulaire. La surexpression est confirmée lorsqu'au moins 30% des cellules tumorales montrent un marquage membranaire intense et circonférentiel (réaction 3+) (Figure 6D). Lorsque le marquage ne répond pas à ces critères, la réaction est qualifiée de négative (0 ou 1+) (Figures 6A et 6B) ou douteuse (2+) (Figure 6C). Dans le cas d'une réaction douteuse, on

mesure directement l'amplification génique au moyen d'une hybridation fluorescente *in situ* (FISH). En fonction du ratio entre le nombre de copies du gène *HER-2* et du nombre de copies du marqueur centromérique du chromosome 17, on qualifie la réaction de positive (ratio supérieur à 2.2), négative (ratio inférieur à 1.8) ou équivoque (ratio situé entre 1.8 et 2.) (Wolff *et al*, 2007).

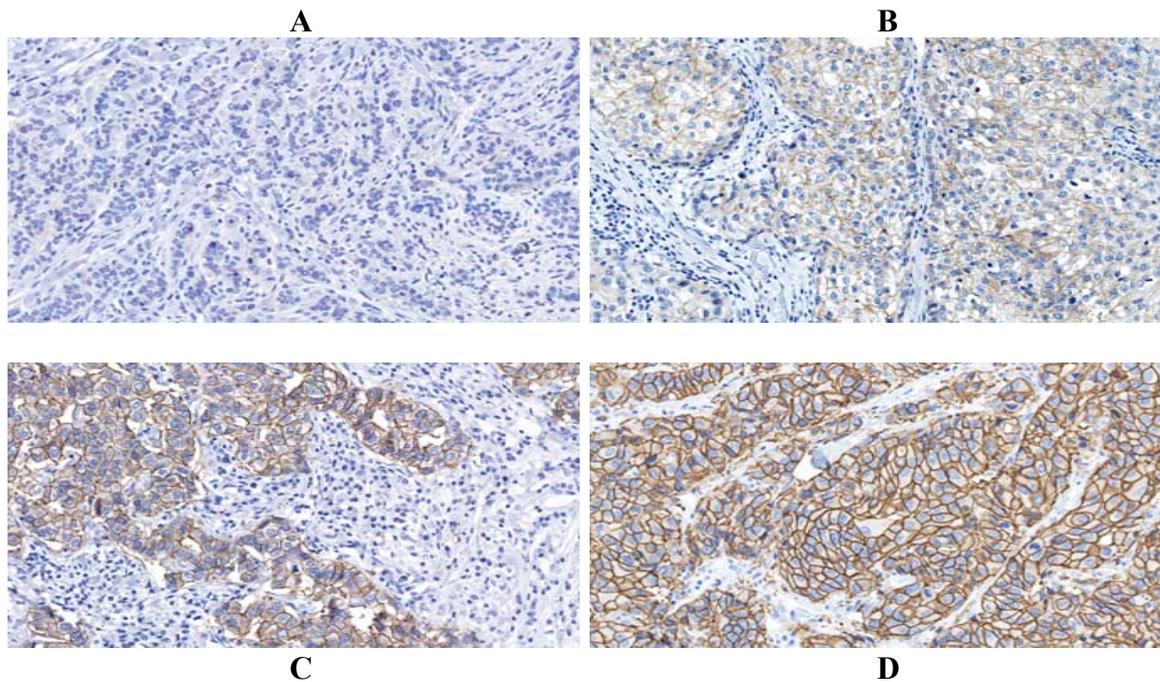


Figure 6. Marquage membranaire de la protéine HER-2 à différents niveaux dans le carcinome mammaire de haut grade : (A) 0 (négatif); (B) 1+ (négatif); (C) 2+ (douteux); (D) 3+ (positif). (grossissement original x 200).

Les carcinomes mammaires HER-2 positifs correspondent le plus souvent à des tumeurs de haut grade qui présentent un haut taux de mutations du gène *p53* (Sorlie *et al*, 2001). En général, ces tumeurs n'expriment pas les récepteurs hormonaux. La coexpression du marqueur HER-2 et des récepteurs oestrogéniques survient dans le sous-type luminal B (Brenton *et al*, 2005).

Les cancers du sein qui surexpriment la protéine HER-2 ont plus souvent une évolution clinique défavorable (Slamon *et al*, 1987). Heureusement, l'introduction en clinique d'un anticorps monoclonal humanisé dirigé contre la protéine membranaire HER-2, encore appelé trastuzumab (Herceptin; Genentech, San Francisco, CA), a permis de contrer la croissance tumorale chez bon nombre de patientes qui surexpriment la protéine HER-2. En effet, des essais cliniques ont démontré que le trastuzumab prolonge le temps de progression de la maladie, améliore le taux et la durée de la réponse, ainsi que la survie globale dans le cancer du sein métastatique (Slamon *et al*, 2001).

II.3c Le phénotype basal

Ce cancer prendrait naissance de cellules situées dans le voisinage de la couche myoépithéliale. Les carcinomes mammaires de phénotype basal expriment à la fois les marqueurs de cellules myoépithéliales (kératines basales, p63, P-cadherin et laminine) et d'autres protéines connues comme étant exprimées dans les cellules souches et progénitrices, comme les cytokératines 5 et 6 (Perou *et al*, 2000).

Le carcinome mammaire de phénotype basal comprend de 8% à 37% des cancers du sein, selon les études (Rakha et Reis-Filho, 2009). Ces tumeurs ont un très mauvais pronostic en raison de leur caractère envahissant et leur croissance rapide (Sorlie *et al*, 2001). Ce sous-type est surreprésenté parmi les cancers qui surgissent dans un court laps de temps, situé entre deux mammographies annuelles (Collett *et al*, 2005). La fréquence d'apparition de ce cancer du sein survient beaucoup plus fréquemment chez les patientes plus jeunes (47-55 ans) (Rakha et Reis-Filho, 2009). L'étude de Carey *et al* (2006) indique que l'incidence varie selon les populations étudiées: environ 39% chez les Afro-américaines pré-

ménopausées, 14% chez les Afro-américaines post-ménopausées et 16% chez les non Afro-américaines.

Le phénotype basal se retrouve non seulement dans les carcinomes canaux SAI, mais aussi dans certains types histologiques spécifiques, comme les carcinomes médullaires et métaplasiques. Ses caractéristiques essentielles sont les suivantes : carcinome mal différencié, haut grade histologique et nucléaire, index de prolifération élevé, défaut d'expression des récepteurs d'oestrogènes (ER) et de progestérone (PR), absence de surexpression et amplification du gène *HER-2* (d'où l'appellation triple négatif), expression des cytokératines de masse moléculaire élevée (CK5/6, CK14, CK17) et expression du récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR) (Kim *et al*, 2006) (Nielsen *et al*, 2004).

L'histologie particulière des cancers du sein de phénotype basal (Figure 7) comprend : une volumineuse tumeur, un infiltrat lymphocytaire au sein du stroma, de larges zones de nécrose, un pléomorphisme cellulaire accusé (changements de morphologie), des nucléoles apparents, des cellules apoptotiques, peu de tubules, un stroma peu abondant, un ratio nucléaire-cytoplasmique élevé, une chromatine vésiculeuse et des éléments métaplasiques (cellules squameuses et allongées et prolifération microvasculaire gloméruloïde) (Rakha et Reis-Filho, 2009).

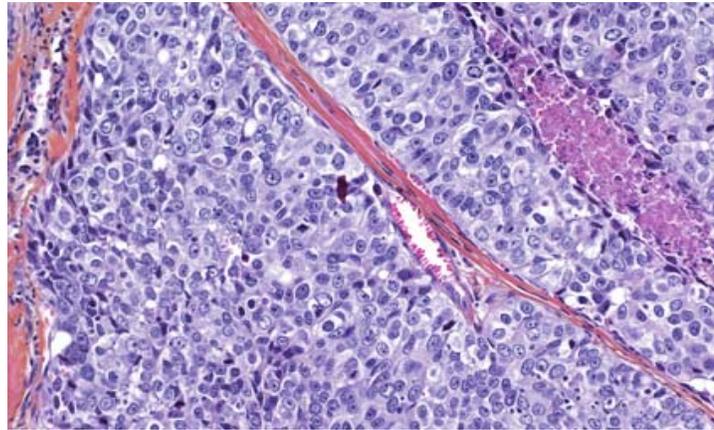


Figure 7. Coupe histologique d'un carcinome mammaire canalaire de phénotype basal colorée à l'Hémathoxyline-Éosine-Safran (HES). (grossissement original x 200).

Les patientes souffrant du cancer du sein de phénotype basal ne répondent pas aussi bien à la chimiothérapie adjuvante à base d'anthracycline que les autres patientes. De plus, ce cancer confère un haut taux de récurrence et un faible taux de survie (sans maladie et globale) (Banerjee *et al*, 2006). Les tumeurs mammaires de phénotype basal semblent métastasier plus souvent au cerveau et aux poumons, mais beaucoup moins aux os, au foie et aux ganglions lymphatiques (Fulford *et al*, 2007) (Luck *et al*, 2008). Les métastases cérébrales et pulmonaires sont associées à un mauvais pronostic (Patanaphan *et al*, 1988). Cette observation pourrait indiquer une dissémination par voie sanguine plutôt que par voie lymphatique.

Bien qu'il n'y ait pas de consensus international pour définir le cancer du sein de phénotype basal, la méthode immunohistochimique la plus utilisée est celle de Nielsen *et al*. Elle consiste en l'absence d'expression des récepteurs oestrogéniques et de la protéine HER-2 au sein des cellules tumorales. De plus, les cellules tumorales doivent exprimer les CK5/6 et/ou EGFR. Ces critères ont une sensibilité de 76% et une spécificité de 100% (Nielsen *et al*, 2004).

Dans quelques cas, les cytokératines de faible masse moléculaire CK8/18 s'expriment dans les cancers du sein de phénotype basal, suggérant qu'elles tirent leur origine de cellules souches mammaires (Kim *et al*, 2006) (Da Silva *et al*, 2007). Qui plus est, d'autres gènes des cellules souches mammaires (*Sox2* et *CD133*) s'expriment également dans ce sous-type de cancer (Rodriguez-Pinilla *et al*, 2007) (Storci *et al*, 2008).

Fait à noter, certaines protéines mutées se retrouvent sélectivement dans les cancers de phénotype basal. L'étude de Sorlie *et al* (2001) a confirmé un taux élevé de mutations de p53 dans ce type de cancer. En outre, les carcinomes mammaires héréditaires qui surviennent dans le contexte de mutations germinales du gène *BRCA1* présentent souvent ce profil d'expression génique (Foulkes *et al*, 2003). D'autres protéines ont aussi été retrouvées dans le cancer du sein de phénotype basal : P-cadhérine, cavéolines 1 et 2, cycline E, Ki-67, c-kit, fascine, moésine, vimentine, nestine et laminine (Rakha et Reis-Filho, 2009).

Quelques une de ces protéines, dont EGFR, alpha-B-crystallin et le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF), sont des cibles thérapeutiques potentielles (Nielsen *et al*, 2004) (Moyano *et al*, 2006) (Pakkiri *et al*, 2009). Par rapport au cancer du sein luminal A et au cancer HER-2 positif, qui peuvent respectivement bénéficier de l'hormonothérapie ou du traitement au trastuzumab, les carcinomes mammaires de phénotype basal ne disposaient jusqu'à tout récemment d'aucune forme de thérapie spécifique. Des études sont présentement en cours pour vérifier l'efficacité des inhibiteurs de la Poly(ADP-ribose) polymérase 1 (PARP1) dans les tumeurs qui se développent dans le contexte de mutations des gènes *BRCA1* et *BRCA2* (Lord *et al*, 2008).

III. Les métastases

III.1 Introduction

Les métastases compliquent l'évolution de la plupart des cancers du sein et constituent la principale cause de mortalité chez les personnes atteintes. Les cellules tumorales quittent la masse tumorale et essaient aux ganglions lymphatiques, et à d'autres organes (os, poumons, foie et cerveau, etc.). Le processus métastatique est complexe et comprend plusieurs étapes (Robbins et Cotran, 2005).

III.2 Les étapes de la cascade métastatique et leurs marqueurs

III.2a Prolifération cellulaire : Ki-67 et p53

Une étape clé pour la formation des métastases réside dans la prolifération cellulaire soutenue. À cet égard, le marqueur de prolifération le plus utilisé en immunohistochimie, pour mettre en évidence des cellules en cycle, est la protéine **Ki-67**. Cet antigène nucléaire se retrouve dans les phases actives du cycle cellulaire: G1, S, G2 et M, aussi bien dire lorsque les cellules se divisent (Gerdes *et al*, 1984). Depuis sa découverte, il y a de cela 25 ans, le rôle précis de cette protéine n'a toujours pas été élucidé, bien que son rôle dans la prolifération cellulaire n'ait jamais été remis en cause (Schlüter *et al*, 1993) (Starborg *et al*, 1996).

Dans le cancer du sein précoce, l'expression du marqueur Ki-67 s'associe à un plus haut risque de récurrences tumorales et à une diminution sensible de la survie (Urruticoechea *et al*, 2005) (de Azambuja *et al*, 2007).

Le facteur transcriptionnel **p53** est responsable du contrôle du cycle cellulaire, particulièrement lors d'un stress de la cellule; en inhibant la prolifération et en permettant aux cellules de quitter le cycle cellulaire, il favorise le processus de réparation des structures cellulaires endommagées, comme par exemple l'ADN. Si le dommage infligé à la cellule est irréparable, p53 enclenche le processus de mort cellulaire programmée, encore appelée apoptose (Vogelstein *et al*, 2000).

Plus de la moitié des cancers humains possèdent une version mutée de la protéine p53 (Lane et Fischer, 2004). Dans 20% à 40% des cancers du sein, des mutations inactivatrices de p53 en abrogent la fonction. Comme la forme mutée de p53 se retrouve à tous les stades d'évolution du cancer mammaire, ce changement mutationnel semble intervenir précocement dans le processus de tumorigenèse. De plus, les mutations de p53 confèrent aux cellules tumorales une résistance aux traitements de chimiothérapie (Borresen-Dale, 2003). L'étude de Sorlie *et al* (2001) confirme également que les mutations de p53 sont plus fréquentes dans les sous-types agressifs de cancers mammaires: HER-2 et phénotype basal. Une fois muté, p53 permet la répllication inappropriée de l'ADN endommagé, ce qui a pour effet d'augmenter le risque de nouvelles mutations. La perte de la fonction pro-apoptotique de p53 constitue donc un net avantage prolifératif pour les cellules tumorales (Borresen-Dale, 2003).

III.2b Invasion de la matrice extracellulaire : galectine-7 et MMP-3

C'est en se détachant de la masse principale et en envahissant la matrice extracellulaire que les cellules tumorales peuvent pénétrer les vaisseaux sanguins et lymphatiques. Plusieurs molécules participent à cette étape du processus métastatique.

Les galectines sont des lectines animales qui possèdent une affinité pour les β -galactosides présentes à la surface des récepteurs glycoprotéiques (Barondes *et al*, 1994). Elles agissent tant à l'intérieur qu'à l'extérieur de la cellule. Leurs rôles s'exercent dans l'immunité, le développement, l'apoptose, les contacts cellules-cellules et cellules-matrices et dans la transformation néoplasique (Rabinovich, 1999).

La **galectine-7** a d'abord été considérée comme un marqueur de l'épithélium stratifié pavimenteux kératinisé (kératinocytes) (Madsen *et al*, 1995). Puis, on lui a attribué le rôle de régulateur négatif de la progression tumorale, car p53, une protéine pro-apoptotique, en régule l'expression à la hausse (Ueda *et al*, 2004) (Kopitz *et al*, 2003).

Mais cette fonction anti-tumorale de la galectine-7 ne pourrait bien s'appliquer qu'à certains types de cancers puisqu'au contraire, elle exerce un rôle pro-tumoral dans les lymphomes. Demers *et al* ont montré que le développement des lymphomes thymiques expérimentaux était accéléré dans les cellules de lymphome surexprimant la galectine-7. De plus ces lymphomes agressifs infiltraient les tissus et formaient des métastases au foie et au rein. (Demers *et al*, 2005). En supprimant l'expression de la galectine-7 à l'aide d'antisens, ils ont pu réduire le nombre de métastases par rapport aux témoins (Demers *et al*, 2007). Demers *et al* proposent que cette galectine induise l'expression de la métalloprotéase-9 (MMP-9) par les cellules cancéreuses (Demers *et al*, 2005). Cette dernière est impliquée dans le remodelage de la matrice extracellulaire, l'angiogenèse, la sécrétion de facteurs de croissance et la modulation du système immunitaire. L'expression de la MMP-9 accélère aussi la dissémination des lymphomes (Kossakowska *et al*, 1998). La galectine-7 est une

cible thérapeutique potentielle puisque son inhibition par le β -lactose bloque la production de MMP-9 (Demers *et al*, 2005).

Chez le rat, la galectine-7 est surexprimée dans les carcinomes mammaires induits par le 1-méthyl-1-nitrosourea (Lu *et al*, 1997). Chez l'homme, Perou *et al* (2000) ont identifié le transcrit de cette protéine dans les cancers mammaires, mais très peu dans le sein normal, ce qui suggère que la galectine-7 puisse exercer un rôle dans les carcinomes mammaires.

Une autre métalloprotéase impliquée dans l'invasion est la stromelysine-1 ou **MMP-3**. Cette protéase zinc-dépendante dégrade le collagène de type IV, les protéoglycanes, la laminine et la fibronectine contenus dans la membrane basale de la matrice extracellulaire. Les cellules tumorales peuvent elles-mêmes sécréter les métalloprotéases ou en induire la production par les cellules de l'hôte. Fait à noter, le remodelage de la matrice extracellulaire survient dans plusieurs processus pathologiques, comme la croissance tumorale, l'invasion et la métastase (Duffy *et al*, 2000).

Dans un modèle de souris transgéniques, la surexpression de la stromelysine-1 induisait la formation de carcinomes mammaires (Sternlicht *et al*, 1999). MMP-3 permet au facteur de croissance fibroblastique (FGF) d'être relâché suite au bris du perlecan, dérivé de l'endothélium. L'augmentation de FGF pourrait notamment stimuler l'angiogenèse. En revanche, la dégradation du plasminogène par MMP-3 induit un inhibiteur de l'angiogenèse, l'angiostatine (Stetler-Stevenson, 1999). Lors de l'invasion tumorale, l'inhibition de la stromelysine-1 par un antisens, au sein de lignées cellulaires du cancer du sein, permet de contrer l'invasion de la membrane basale (Lochter *et al*, 1997).

Plus récemment, Mendes *et al* ont étudié l'expression de MMP-3 dans les métastases cérébrales du cancer mammaire chez le rat. Ils ont montré que les cellules métastatiques contenaient davantage d'ARNm et de protéine MMP-3. En inhibant l'activité enzymatique de MMP-3, on pourrait réduire la formation des métastases *in vitro* et *in vivo*. Cette étude confirme un rôle pour MMP-3 dans la dissémination des cellules cancéreuses au cerveau (Mendes *et al*, 2005).

III.2c Ensemble du processus métastatique : EGFR

Quelques marqueurs contrôlent à eux seuls plusieurs étapes du processus métastatique. C'est le cas d'**EGFR**, aussi connu sous le nom de HER-1. Ce récepteur membranaire tyrosine kinase est présent dans les cellules épithéliales et est activé par divers ligands. Les plus importants sont le facteur de croissance épidermique (EGF) et le facteur de croissance transformant alpha (TGF- α). Lors de la liaison d'un ligand à son récepteur, il y a dimérisation du récepteur, autophosphorylation croisée et activation des voies de signalisation. Les fonctions physiologiques contrôlées par EGFR sont nombreuses : croissance, adhésion, motilité cellulaire et apoptose (Yarden et Sliwkowski, 2001).

Dans le cancer du sein, la surexpression d'EGFR est associée à un mauvais pronostic (Nicholson *et al*, 1991). Ce récepteur participe à la prolifération et la survie médiées par la voie MAPK (Davis, 2000). L'étude de Xue *et al* suggère d'autres fonctions pour ce récepteur. Dans un modèle murin, l'injection de cellules tumorales mammaires surexprimant EGFR permet d'augmenter la capacité des cellules à former des métastases en facilitant l'intravasation, c'est-à-dire le passage des cellules tumorales au travers de l'endothélium vasculaire depuis le lit tumoral primitif jusqu'aux vaisseaux sanguins et

lymphatiques. La motilité des cellules du cancer du sein semble également augmentée. *In vitro*, l'augmentation de l'expression d'EGFR induit le chimiotaxisme par EGF, ce qui facilite la dissémination métastatique (Xue *et al*, 2006). Ce mouvement coordonné des cellules tumorales par l'EGF implique l'activation de la voie de signalisation PI3kinase-Akt-PKC (Sun *et al*, 2005).

EGFR est aussi une cible intéressante pour les traitements anticancéreux. L'anticorps monoclonal IMC-C225 (cetuximab, Erbitux; ImClone Systems Incorporated et Bristol-Myers Squibb Company, New York, NY) peut lier le récepteur et entraver la liaison de ses ligands naturels, réduisant du coup la division des cellules tumorales. En outre, IMC-C225 exalte l'effet cytotoxique de la chimiothérapie et de la radiothérapie. L'inhibiteur de tyrosine kinase ZD1839 (Gefitinib, Iressa; AstraZeneca Pharmaceuticals, LP, Wilmington, DE) permet aussi de contrer l'activation d'EGFR. Son mécanisme d'action consiste à inhiber l'autophosphorylation du récepteur en réduisant l'ATP disponible. ZD1839 permet donc de réduire la prolifération tumorale (Herbst, 2004).

III.3 Les marqueurs non-associés à une étape de la cascade métastatique

Certaines protéines facilitent la dissémination métastatique, mais on n'en connaît pas encore leur mécanisme d'action.

III.3a La protéine CD276 impliquée dans l'adhésion, l'invasion et la migration des cellules tumorales

Le récepteur de surface cellulaire de la famille B7, **CD276**, aussi connu sous le nom de B7-H3 humain, est exprimé par les cellules dendritiques et les monocytes, suite à une stimulation par les cytokines inflammatoires. Depuis sa découverte en 2001, on a pu préciser son mécanisme d'action anti-tumoral : modulation de la réponse lymphocytaire T, de la réponse cytotoxique et de la production d'INF- γ (Chapoval *et al*, 2001) (Suh *et al*, 2003).

Les cellules tumorales qui expriment CD276 se comportent différemment selon l'organe touché. Certaines études suggèrent un rôle anti-tumoral, car la transfection des tumeurs avec B7-H3 murin induit une réponse immunitaire anti-tumorale médiée par les lymphocytes T cytotoxiques CD8⁺ et les cellules tueuses naturelles (NK) (Sun *et al*, 2003) (Luo *et al*, 2004) (Lupu *et al*, 2006). De plus, une hausse des niveaux d'expression de CD276 est associée à l'amélioration de la survie des patients atteints de carcinomes gastriques (Wu *et al*, 2006). Pour d'autres types de cancer, cette protéine exerce, au contraire, un effet pro-tumoral. Les cellules du neuroblastome qui expriment B7-H3 humain voient la lyse cellulaire par les cellules NK diminuée (Castriconi *et al*, 2004). De même, l'expression soutenue de CD276 dans le cancer du poumon non à petites cellules corrèle avec l'apparition de métastases ganglionnaires et la réduction des lymphocytes T intra-tumoraux (Sun *et al*, 2006). Roth *et al* (2007) ont aussi noté que de forts niveaux de CD276 dans les cellules tumorales favorisent la progression du cancer de la prostate. Dans la suite, Zhang *et al* ont confirmé et étendu ces observations en confirmant le rôle péjoratif de CD276 : extension extraprostatique, invasion de la vésicule séminale, augmentation du

risque d'une récurrence métastatique, résistance à l'hormonothérapie et augmentation des décès (Zhang *et al*, 2007).

Le rôle de CD276 dans la métastase a aussi été souligné par l'équipe de Chen *et al*. D'abord, CD276 a été identifié comme antigène associé aux tumeurs (TAA) puisque cette protéine est reconnue par l'anticorps 376.96. Ce dernier favorise l'adhérence de bon nombre de tumeurs, dont le cancer mammaire. Son rôle dans la progression tumorale et la métastase a pu être mis en lumière par l'utilisation de *siRNA* qui ont pour effet de réduire l'expression de CD276, inhiber l'adhésion cellulaire tumorale, prévenir la migration et contrer l'invasion, sans affecter pour autant la prolifération cellulaire (Chen *et al*, 2008). Cette protéine membranaire pourrait représenter une cible thérapeutique intéressante, mais d'autres études sont requises avant que l'on puisse l'utiliser à cette fin.

III.3b GATA-3 : une protéine antimétastatique

GATA-3 est un facteur de transcription qui lie l'ADN via deux domaines à doigt de zinc. Il est responsable de la différenciation de plusieurs types cellulaires, dont les cellules Th2 (Ho et Pai, 2007).

En 2006, l'étude de Kouros-Mehr *et al* a permis d'identifier, dans la glande mammaire, GATA-3 en tant que facteur de transcription essentiel au maintien et à la différenciation des cellules épithéliales luminales, à partir des cellules souches du sein (Kouros-Mehr *et al*, 2006). Dans les carcinomes mammaires, GATA-3 est associé au sous-type luminal A. Ce dernier se caractérise par l'expression des récepteurs oestrogéniques dans les cellules tumorales et par un meilleur pronostic (Sorlie *et al*, 2001). En revanche, le défaut

d'expression de GATA-3 s'observe dans les tumeurs de grande taille, hormonorésistantes, de haut grade histologique, et chez les tumeurs accompagnées de métastases ganglionnaires ou celles qui surexpriment HER-2, bref, les tumeurs de mauvais pronostic (Mehra *et al*, 2005)

Dans un modèle de souris transgénique, Kouros-Mehr *et al* ont confirmé la réduction des niveaux de GATA-3 lors du développement des tumeurs mammaires et de la formation de métastases. Les niveaux d'expression de GATA-3 sont également diminués dans les cellules tumorales disséminées plutôt que dans les cellules tumorales retrouvées au site primitif, suggérant que la perte de GATA-3 pourrait faciliter la propagation des cellules tumorales. Par contre, la seule perte de ce facteur de transcription semble insuffisante pour expliquer la progression tumorale. Dans le carcinome avancé, l'augmentation de GATA-3 induit la différenciation des cellules tumorales et empêche leur propagation. L'activation de GATA-3 pourrait théoriquement être bénéfique pour certains cancers. C'est pourquoi il y a un intérêt évident à identifier les régulateurs de GATA-3 (Kouros-Mehr *et al*, 2008).

HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS DE RECHERCHE

Les carcinomes mammaires qui ont un profil d'expression génique correspondant au phénotype basal ont un très mauvais pronostic. Les métastases demeurent la principale cause de mortalité chez les personnes atteintes du cancer. Plusieurs étapes interviennent lors de la cascade métastatique et chacune peut être caractérisée à l'aide de marqueurs spécifiques.

Notre hypothèse de recherche est que le carcinome mammaire de phénotype basal possède un plus mauvais pronostic que les autres sous-types génétiques, en raison d'une activation des voies pro-métastatiques.

Les objectifs de cette étude sont :

- Identifier les carcinomes mammaires de phénotype basal selon les critères de Nielsen *et al* (2004).
- Évaluer l'expression différentielle de différents marqueurs de la cascade métastatique dans les cancers du sein canalaire de haut grade de phénotype basal.
- Comparer l'expression de ces marqueurs aux cancers du sein canaux de bas grade, de haut grade luminal A et HER-2 positifs, ainsi qu'aux cancers du sein médullaires typiques.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

I. Sélection des patientes

I.1 Comité d'éthique

Cette étude a reçu l'approbation du directeur des services professionnels du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM), et des comités d'évaluation scientifique et d'éthique de la recherche du CHUM, selon les articles 19.1 et 19.2 de la *Loi sur les services de santé et les services sociaux* sous la cote SL 05.019.

I.2 Sélection des tumeurs

Les archives du CHUM Hôtel-Dieu ont permis de répertorier les patientes qui ont subi une chirurgie pour un carcinome mammaire entre 2003 et 2008. Nous avons sélectionné les tumeurs selon les critères suivants :

- Le type histologique : canalaire et médullaire
- L'infiltration du stroma (exclusion des carcinomes *in situ*)
- La taille de la tumeur (exclusion des biopsies)
- Le grade SBR-EE : 1/3 (bas grade) et 3/3 (haut grade)
- Le statut des récepteurs oestrogéniques (ER) et de progestérone (PR)
- Le statut de la surexpression de la protéine HER-2

II. Confection des micromatrices tissulaires

À l'aide de l'appareil automatisé Beecher ATA-27 (Beecher Instruments, Sun Prairie, WI), nous avons confectionné six micromatrices tissulaires, comprenant au total 213 tumeurs et 6 tissus témoins (sein, prostate, carcinome mammaire luminal B, amygdale, carcinome du côlon, peau, rein et placenta). Suite à la coloration HES des tissus, fixés dans de la formaline tamponnée à 10% et enrobés en paraffine, des champs représentatifs ont été sélectionnés au microscope. Nous avons prélevé trois carottes (cylindres) par zone d'intérêt (pathologique ou normale). Ce triplicata permet d'obtenir un échantillonnage adéquat et de vérifier la concordance entre les prélèvements. S'il y a perte d'une carotte, les autres prélèvements autorisent tout de même l'analyse des résultats. Les carottes prélevées mesurent 2mm x 1mm. Elles ont été déposées aléatoirement, selon un diagramme préétabli, mais de façon asymétrique dans un bloc receveur de paraffine. Les carottes manquantes ont été insérées manuellement avec le Beecher MTA-1 (Beecher Instruments, Sun Prairie, WI). Par la suite, des coupes sériées de 3µm ont été réalisées de chacune de ces micromatrices tissulaires, à l'aide du microtome Leica, pour permettre de réaliser les réactions immunohistochimiques requises.

III. Colorations immunohistochimiques

L'appareil Discovery XT (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ) a permis d'effectuer la coloration immunohistochimique automatisée sur les lames des six micromatrices tissulaires. La description des marqueurs ciblés et des protocoles d'immunohistochimie figurent aux tableaux II, III et IV. Ils permettent d'identifier les sous-types d'expression génique (ER, PR, HER-2, CK5/6, EGFR, CK14) ou de caractériser le potentiel métastatique (Ki-67, p53, CD276, MMP-3, galectine-7, GATA-3, EGFR) des carcinomes

mammaires. Les lames de micromatrices déparaffinées ont nécessité un prétraitement pour le démasquage antigénique. Un tampon de pH 8, en plus de la chaleur, permettent l'attachement des anticorps anti-ER, PR, HER-2, CK5/6, Ki-67, p53, CD276, MMP-3, galectine-7 et GATA-3. Pour l'anticorps anti-CK14, un prétraitement à la chaleur à pH 6 est nécessaire pour le démasquage de la protéine d'intérêt. Une protéase est requise comme prétraitement pour la réaction entre l'anticorps anti-EGFR et son antigène. Les anticorps primaires ont été incubés de 30 minutes à 2 heures. Par la suite, l'anticorps secondaire approprié (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ et Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA) a été appliqué de 20 à 40 minutes. L'attachement de l'anticorps à son antigène a été révélé à l'aide de la diaminobenzidine, de couleur marron (DABMAP kit, Ventana Medical Systems, Tucson, AZ). Les témoins négatifs, sans l'ajout de l'anticorps primaire, ont été testés au préalable. Les coupes ont été contre-colorées à l'hématoxyline.

IV. Quantification du marquage immunohistochimique

Les micromatrices tissulaires colorées par immunohistochimie ont été numérisées à l'aide de l'appareil NanoZoomer Digital Pathology (Hamamatsu Photonics, Bridgewater, NJ). Cette technique d'imagerie a permis d'évaluer de façon semi-quantitative le pourcentage des cellules tumorales marquées pour chacune des carottes, par microscopie virtuelle. Par la suite, une moyenne de ce pourcentage pour les trois carottes d'une même tumeur a permis de quantifier le marquage pour chacune des tumeurs. Un résultat de moins de 10% de cellules positives est considéré négatif.

V. Analyses statistiques

Pour comparer les carcinomes mammaires de phénotype basal avec les autres cancers du sein (bas grade; haut grade luminal A, HER-2 et médullaire typique), nous avons utilisé le test Mann-Whitney. La valeur p nous a permis de vérifier si la différence d'expression d'un marqueur, entre deux types de cancers du sein, est statistiquement significative ($p < 0.05$).

Tableau II Marqueurs utilisés en immunohistochimie pour vérifier le statut des protéines associées au cancer du sein

| Marqueurs | Fabricant | Clone | Tissus témoins | Localisation cellulaire |
|------------------|------------------|--------------|---------------------------------------|--------------------------------|
| ER | VMS | 6F11 | Sein | nucléaire |
| PR | Dako | PgR 636 | Sein | nucléaire |
| HER-2 | Dako | - | carcinome mammaire surexprimant HER-2 | membranaire |
| CK5/6 | Dako | D5/16 B4 | prostate | membranaire, cytoplasmique |
| CK14 | Novocastra | NCL-LL002 | peau | membranaire, cytoplasmique |

Tableau III Marqueurs utilisés en immunohistochimie pour vérifier le potentiel métastatique des carcinomes mammaires

| Marqueurs | Fabricant | Clone | Tissus témoins | Localisation cellulaire |
|---------------|--------------------------|--------|--------------------|----------------------------|
| Ki-67 | VMS | 30.9 | amygdale | nucléaire |
| p53 | Novocastra | - | carcinome du côlon | nucléaire |
| CD276 (B7-H3) | R&D Systems | - | carcinome du côlon | membranaire |
| Galectine-7 | R&D Systems | - | peau | cytoplasmique, nucléaire |
| GATA-3 | Santa Cruz | HG3-31 | sein | nucléaire |
| EGFR | Zymed | - | placenta | membranaire, cytoplasmique |
| MMP-3 | Thermo Fisher Scientific | - | placenta | cytoplasmique |

Tableau IV Protocoles d'immunohistochimie pour la révélation des protéines associées au cancer du sein ou au potentiel métastatique

| Anticorps primaire | Pré-traitement | Dilution | Temps d'incubation | Anticorps secondaire | Dilution | Temps d'incubation |
|--------------------|----------------|-----------------|--------------------|----------------------|-----------------|--------------------|
| Anti-ER | sCC1 | prêt à l'emploi | 60 min | USA (VMS) | prêt à l'emploi | 32 min |
| Anti-PR | sCC1 | 1:50 | 60 min | USA (VMS) | prêt à l'emploi | 32 min |
| Anti-HER-2 | sCC1 | 1:500 | 60 min | USA (VMS) | prêt à l'emploi | 32 min |

| Anticorps primaire | Pré-traitement | Dilution | Temps d'incubation | Anticorps secondaire | Dilution | Temps d'incubation |
|---------------------------|-----------------------|-----------------|---------------------------|-----------------------------|-----------------|---------------------------|
| Anti-CK5/6 | sCC1 | 1:40 | 120 min | USA (VMS) | prêt à l'emploi | 32 min |
| Anti-CK14 | sCC2 | 1:200 | 60 min | USA (VMS) | prêt à l'emploi | 24 min |
| Anti-Ki-67 | sCC1 | prêt à l'emploi | 32 min | USA (VMS) | prêt à l'emploi | 20 min |
| Anti-p53 | sCC1 | 1:50 | 60 min | USA (VMS) | prêt à l'emploi | 32 min |
| Anti-CD276 (B7-H3) | sCC1 | 1:100 | 60 min | Anti-chèvre (Jackson) | 1:100 | 40 min |
| Anti-Galectine-7 | sCC1 | 1:150 | 60 min | Anti-chèvre (Jackson) | 1:100 | 32 min |
| Anti-GATA-3 | sCC1 | 1:50 | 60 min | USA (VMS) | prêt à l'emploi | 32 min |
| Anti-EGFR | P1/4 | prêt à l'emploi | 60 min | USA (VMS) | prêt à l'emploi | 32 min |
| Anti-MMP-3 | sCC1 | 1:50 | 60 min | USA (VMS) | prêt à l'emploi | 32 min |

sCC1 : *standard Cell Conditioning 1* (tampon de pH 8 combiné à de la chaleur)

sCC2 : *standard Cell Conditioning 2* (tampon de pH 6 combiné à de la chaleur)

P1/4 : protéase 1 appliquée pendant 4 minutes

USA : *Universal Secondary Antibody* (anticorps secondaire universel)

VMS : Ventana Medical Systems

Jackson : Jackson ImmunoResearch Laboratories

RÉSULTATS

I. Définition des types de cancer du sein

Des 213 carcinomes mammaires invasifs, 155 ont été retenus. Les carcinomes triples négatifs (ER-/PR-/HER-2-), médullaires atypiques, ainsi que les carottes non-représentatives du néoplasme n'ont pas été inclus dans la présente étude. Les grades SBR-EE ont été établis par les pathologistes du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM). Les 34 carcinomes de bas grade appartenaient tous au type histologique canalaire. Pour ce qui est des 121 tumeurs de haut grade, elles ont été classées en plusieurs catégories.

En fonction des données immunohistochimiques, 110 carcinomes canauxaires ont été classés selon leur profil d'expression protéique en sous-types. Les 34 tumeurs luminal A présentent une expression des récepteurs oestrogéniques dans plus de 70% des cellules.

Les 33 carcinomes qui surexpriment la protéine HER-2 s'accompagnent parfois d'une expression des récepteurs hormonaux. Classiquement, les tumeurs triple positives (ER+/PR+/HER-2+) sont assimilées au sous-type luminal B, mais pour les fins de la présente étude, nous n'avons pas souhaité subdiviser les carcinomes HER-2+ en fonction de leur hormono-dépendance. Cela dit, pour se qualifier du statut HER-2+, nous avons retenu seulement les tumeurs ayant plus de 70% de cellules affichant un marquage membranaire complet, circonférentiel et de forte intensité (3+) (Figure 6, p.8).

Le carcinome de phénotype basal, présent chez 43 tumeurs, répond à la définition proposée par Nielsen *et al* (2004): absence d'expression des récepteurs oestrogéniques (ER) et de la protéine HER-2, mais réaction positive pour les marqueurs CK5/6 et/ou EGFR.

Enfin, les carcinomes mammaires de haut grade médullaires typiques ont été diagnostiqués par les pathologistes du CHUM selon les critères généralement reconnus : statut triple négatif (ER-/PR-/HER-2-), prolifération cellulaire de type syncitial, infiltrat lymphoplasmocytaire et bords de la tumeur nets et arrondis. Seulement 11 cas répondaient à cette définition, ce qui s'accorde avec la rareté de ces tumeurs (environ 2% des cancers mammaires).

II. Les marqueurs du cancer du sein

Le cancer du sein de phénotype basal se définit présentement par l'expression différentielle caractéristique de certains marqueurs tumoraux. Cette étude vise à vérifier l'expression des marqueurs ER, PR, HER-2, CK5/6 et CK14 dans plusieurs carcinomes mammaires et confirmer les traits caractéristiques du sous-type basal par rapport aux formes de carcinomes canalaire, c'est-à-dire de bas grade et de haut grade luminal A, HER-2 positif et médullaire typique. Pour mener à bien ce projet, six micromatrices tissulaires, comprenant 213 tumeurs, ont été confectionnées. Une technique d'immunohistochimie a été utilisée sur chacune des matrices en utilisant plusieurs marqueurs tumoraux. Une évaluation semi-quantitative a permis de calculer le pourcentage de cellules tumorales positives pour un épitope donné. Un marquage de moins de 10% des cellules est considéré négatif. Le marquage est considéré modéré lorsque plus de 10%, mais moins de 70% des cellules tumorales expriment le marqueur. Enfin, on considère la réaction forte si plus de 70% des cellules tumorales affichent un marquage spécifique.

I.1 Les récepteurs oestrogéniques (ER)

Les récepteurs oestrogéniques s'expriment de façon caractéristique dans le noyau de la cellule tumorale. Dans la glande mammaire normale, les récepteurs hormonaux se retrouvent exclusivement dans les cellules épithéliales luminales (Figure 8A, p.35).

Le marquage des cellules tumorales se divise en 3 catégories : négatif (moins de 10% de cellules tumorales positives), modéré (de 10% à moins de 70% de cellules tumorales positives) et fort (70% ou plus de cellules tumorales positives) (Figure 10, p.37). Selon nos critères de sélection, nos résultats ont démontré que les carcinomes mammaires de phénotype basal, tout comme les cancers médullaires typiques, n'expriment pas les récepteurs oestrogéniques (Tableau VIII, p.45; Figure 18, p.47). En revanche, les carcinomes de bas grade et de sous-type luminal A expriment fortement ce récepteur (90% et 97% des carcinomes respectivement) (Tableaux V et VI, p.42 et 43; Figures 15 et 16, p.46). Il est à noter que le cancer du sein luminal A a été sélectionné en fonction de l'expression des récepteurs oestrogéniques. Les carcinomes HER-2 positifs expriment rarement les récepteurs hormonaux (79% des carcinomes), mais quelques tumeurs montrent un marquage modéré (15% des carcinomes), voire intense (6% des carcinomes), ce qui tranche avec les carcinomes de phénotype basal (Tableau VII, p.44; Figure 17, p.47).

I.2 Les récepteurs de progestérone (PR)

La localisation cellulaire des récepteurs de progestérone est également nucléaire. Ils se retrouvent, eux-aussi, dans les cellules luminales épithéliales de la glande mammaire (Figure 8B, p.35).

Tout comme les récepteurs oestrogéniques, le marquage des cellules tumorales peut être rangé en 3 catégories : négatif (moins de 10% de cellules tumorales positives), modéré (de

10% à moins de 70% de cellules tumorales positives) et fort (70% ou plus de cellules tumorales positives) (Figure 11, p.38). Les récepteurs de progestérone ne sont pas exprimés dans les carcinomes mammaires de phénotype basal, ce qui est également le cas pour les cancers médullaires typiques (100% des carcinomes) (Tableau VIII, p.45; Figure 18, p.47). Cela n'a rien pour nous surprendre, cependant, car l'absence d'expression des récepteurs hormonaux est un des critères du carcinome médullaire. Le marquage des récepteurs de progestérone est très variable dans les cancers de bas grade : négatif dans 32% des cas, modéré dans 28% des cas et fort dans 40% des cas (Tableaux V, p.42; Figure 15, p.46). Le marquage est similaire pour les cancers luminal A : négatif pour 38% des cas, modéré dans 41% des cas et fort dans 21% des cas (Tableaux VI, p.43; Figure 16, p.46). Ces cancers se distinguent donc des carcinomes mammaires de phénotype basal par l'expression du récepteur de progestérone. Pour ce qui touche aux cancers avec surexpression de la protéine HER-2, seulement 9% des carcinomes expriment moyennement le récepteur de progestérone, alors que son expression fait complètement défaut dans 91% des carcinomes. Cette différence est statistiquement significative entre les carcinomes HER-2+ et les cancers du sein de phénotype basal (Tableau VII, p.44; Figure 17, p.47).

Dans notre étude, l'absence des récepteurs de progestérone est une caractéristique des carcinomes mammaires de phénotype basal.

I.3 La protéine HER-2

La protéine HER-2 n'est pas surexprimée dans le sein normal (Figure 9A, p.36). Les carcinomes mammaires qui surexpriment HER-2 montrent un marquage membranaire intense (3+) et circonférentiel dans au moins 30% des cellules tumorales (Figure 12, p.39).

D'après nos critères de sélection, les carcinomes de phénotype basal, tout comme les carcinomes médullaires typiques et luminal A, ne surexpriment pas HER-2 (100% des carcinomes) (Tableaux VIII et VI p.45 et 43; Figures 18 et 16, p.47 et 46). Les cancers de bas grade n'expriment pas ce récepteur (100% des carcinomes) (Tableaux V, p.42; Figures 15, p.46). La protéine HER-2 n'est surexprimée que dans le sous-type HER-2+ (100% des carcinomes). À nouveau, il y a une différence statistiquement significative entre les sous-types HER-2 et phénotype basal (Tableau VII, p.44; Figure 17, p.47).

I.4 Les cytokératines 5 et 6 (CK5/6)

Le marquage pour les protéines cytokératines 5 et 6 se retrouve à la fois dans le cytoplasme et dans la membrane plasmique. Le sein normal exprime ces cytokératines de masse moléculaire élevée uniquement dans l'assise basale (Figure 9B, p.36).

Le marquage des cellules tumorales se range en 3 catégories : négatif (moins de 10% de cellules tumorales positives), modéré (de 10% à moins de 70% de cellules tumorales positives) et fort (70% ou plus de cellules tumorales positives) (Figure 13, p.40). Les critères généralement admis des tumeurs de phénotype basal comprennent l'expression des CK5/6 et/ou d'EGFR. Notre étude indique une expression variable de ces cytokératines dans les carcinomes mammaires de phénotype basal : négatif dans 16% des cas, modéré dans 56% des cas et fort pour 28% des cas. Les cancers médullaires typiques montrent un marquage variable, mais le plus souvent négatif : négatif pour 64% des cas, modéré pour 27% des cas et fort pour 9% des cas. Cette différence d'expression est statistiquement significative entre ces deux cancers du sein (Tableau VIII, p.45; Figure 18, p.47). Les autres types de carcinomes mammaires n'expriment pas les cytokératines de type basal CK5/6. Seulement 7% des carcinomes de bas grade affichent un marquage modéré pour ces

protéines, tandis que 93% de ces cancers ne l'exprime pas du tout (Tableaux V, p.42; Figures 15, p.46). Tous les carcinomes luminal A montrent un défaut d'expression des CK5/6 (100% des carcinomes) (Tableaux VI, p.43; Figures 16, p.46). De plus, 91% des carcinomes HER-2 positifs n'expriment pas les cytokératines basale et seulement 9% d'entre-elles l'expriment. (Tableau VII, p.44; Figure 17, p.47).

Nos travaux confirment que les marqueurs CK5/6 sont étroitement liés au sous-type phénotype basal.

I.5 La cytokératine 14 (CK14)

La cytokératine 14 est également exprimée à la membrane et dans le cytoplasme des cellules. Elle se retrouve essentiellement dans les cellules épithéliales basales de la glande mammaire (Figure 9C, p.36).

Les 3 catégories du marquage des cellules tumorales (négatif, modéré et fort) sont les mêmes que pour les CK5/6 (Figure 14, p.41). L'expression de la CK14 est variable dans les cellules tumorales de phénotype basal : négative dans 56% des cas, modérée dans 30% des cas et forte dans 14% des cas. Par contre, pour tous les autres types de cancers du sein, cette protéine fait complètement défaut. Les cancers médullaires typiques n'expriment que modérément la CK14 dans 10% des cas et demeurent négatifs dans tous les autres cas (Tableau VIII, p.45; Figure 18, p.47). Seulement 8% des carcinomes mammaires de bas grade montrent un marquage modéré, tous les autres (92%) sont négatifs pour la CK14 (Tableaux V, p.42; Figures 15, p.46). Pour ce qui est du cancer du sein luminal A, aucune des tumeurs n'exprime ce marqueur (100% des carcinomes) (Tableaux VI, p.43; Figures 16, p.46). 97% des cancers du sein comportant une surexpression de HER-2 ont un marquage négatif pour la CK14 et un seul cas sur 33 l'exprime de façon modéré (Tableau VII, p.44;

Figure 17, p.47). Pris dans leur ensemble, la plupart des cancers du sein sont négatifs pour l'expression de la CK14, sauf les carcinomes mammaires de phénotype basal.

En somme, tout comme les protéines CK5/6, la CK14 est associée au cancer du sein de phénotype basal.

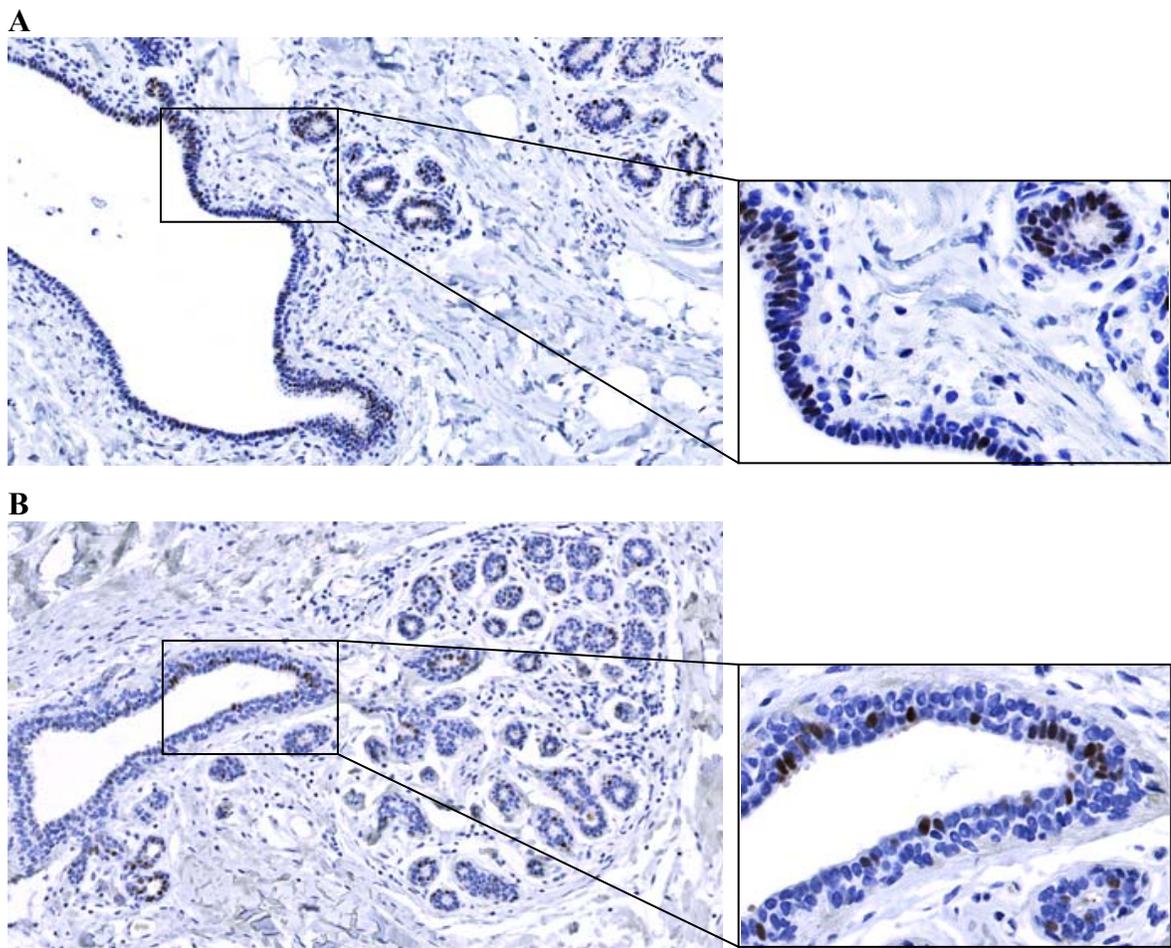


Figure 8. Expression des marqueurs du cancer du sein dans le sein normal : (A) récepteurs oestrogéniques (ER); (B) récepteurs de progestérone (PR). (grossissement original x 100 (gauche) suivi d'un grossissement original x 400 (droite)).

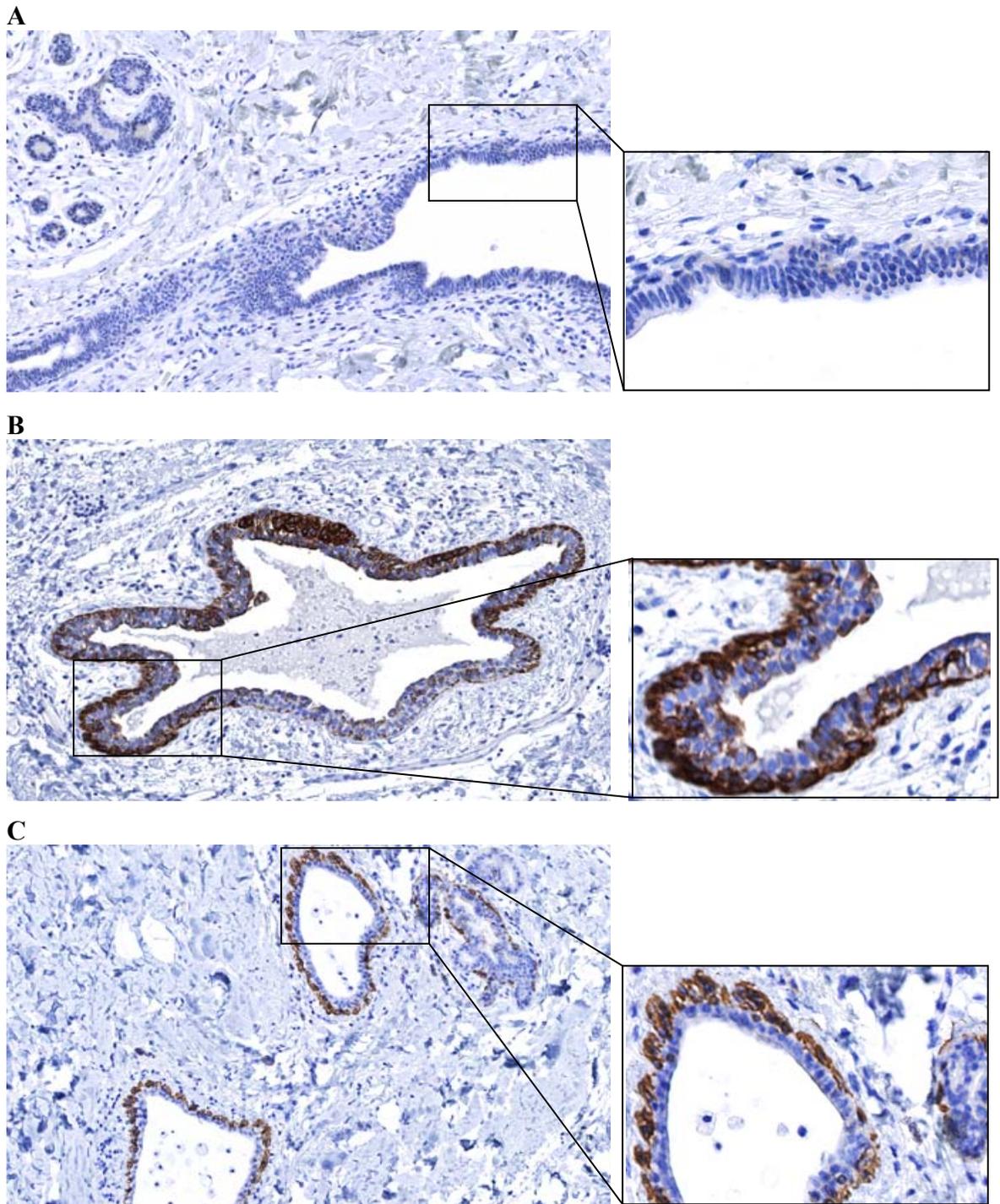


Figure 9. Expression des marqueurs du cancer du sein dans le sein normal : (A) absence de la protéine HER-2; (B) cytokératines 5 et 6 (CK5/6); (C) cytokératine 14 (CK14). (grossissement original x 100 (gauche) suivi d'un grossissement original x 400 (droite)).

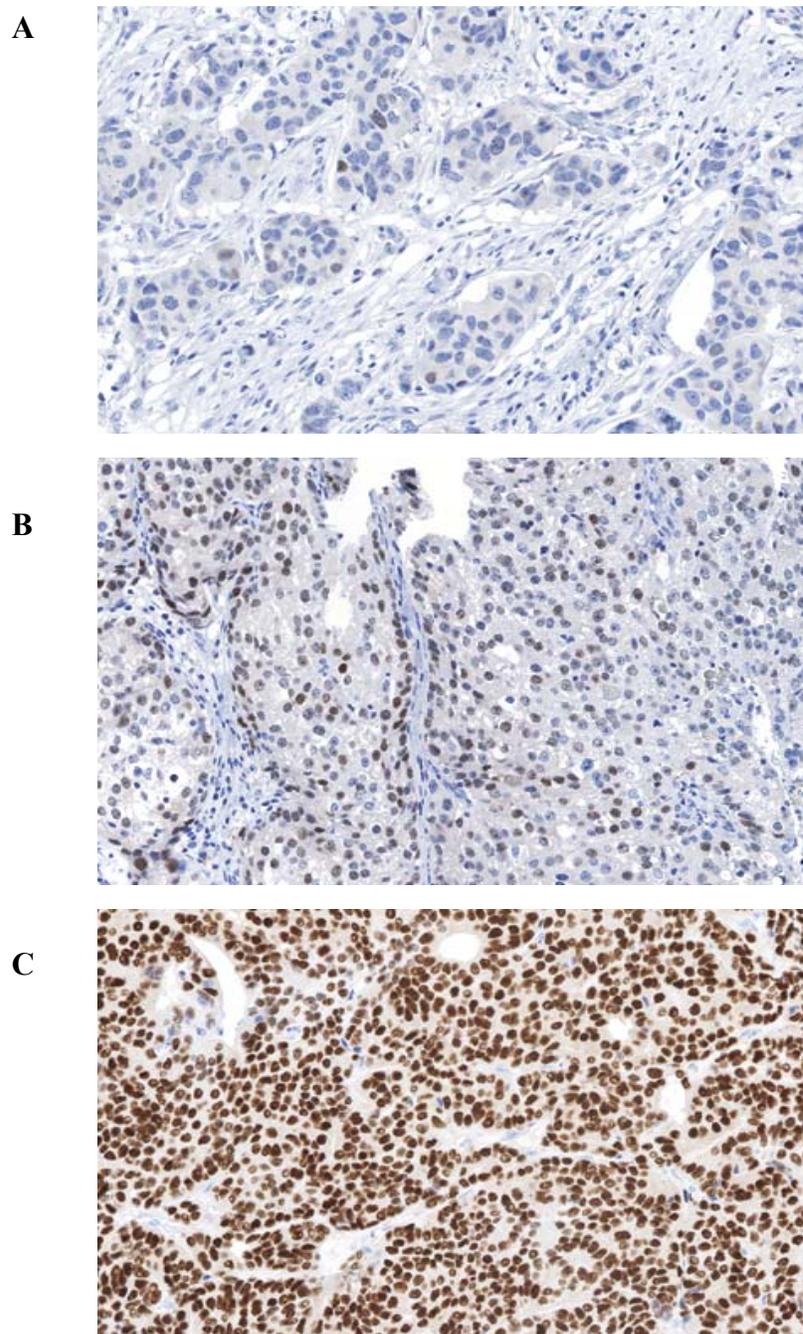


Figure 10. Marquage nucléaire des récepteurs oestrogéniques (ER) à différents niveaux dans le carcinome mammaire de haut grade : (A) négatif : moins de 10% de cellules positives; (B) modéré : de 10% à 70% de cellules positives; (C) fort : plus de 70% de cellules positives. (grossissement original x 200).

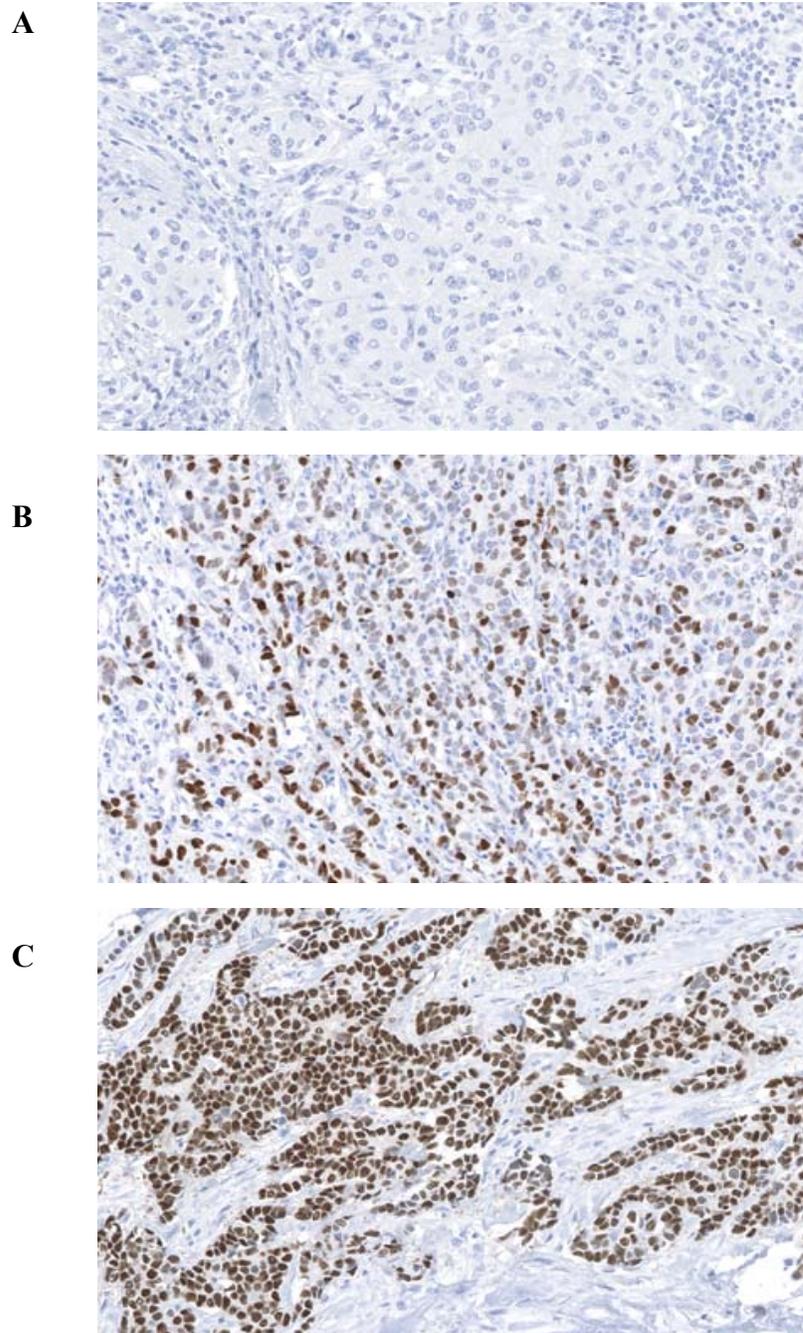


Figure 11. Marquage nucléaire des récepteurs de progestérone (PR) à différents niveaux dans le carcinome mammaire de haut grade : (A) négatif : moins de 10% de cellules positives; (B) modéré : de 10% à 70% de cellules positives; (C) fort : plus de 70% de cellules positives. (grossissement original x 200).

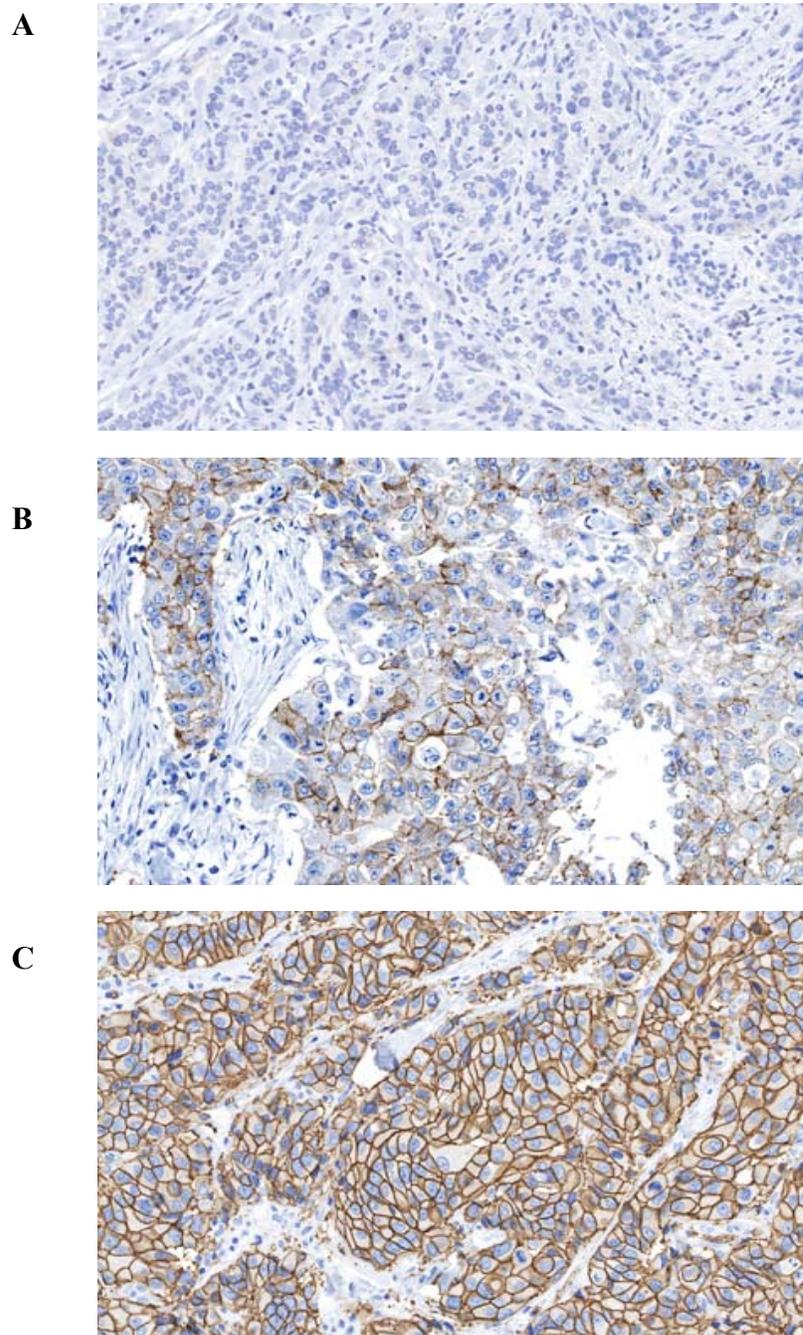


Figure 12. Marquage membranaire de HER-2 à différents niveaux dans le carcinome mammaire de haut grade : (A) négatif : moins de 10% de cellules positives; (B) modéré : de 10% à 70% de cellules positives; (C) fort : plus de 70% de cellules positives. (grossissement original x 200).

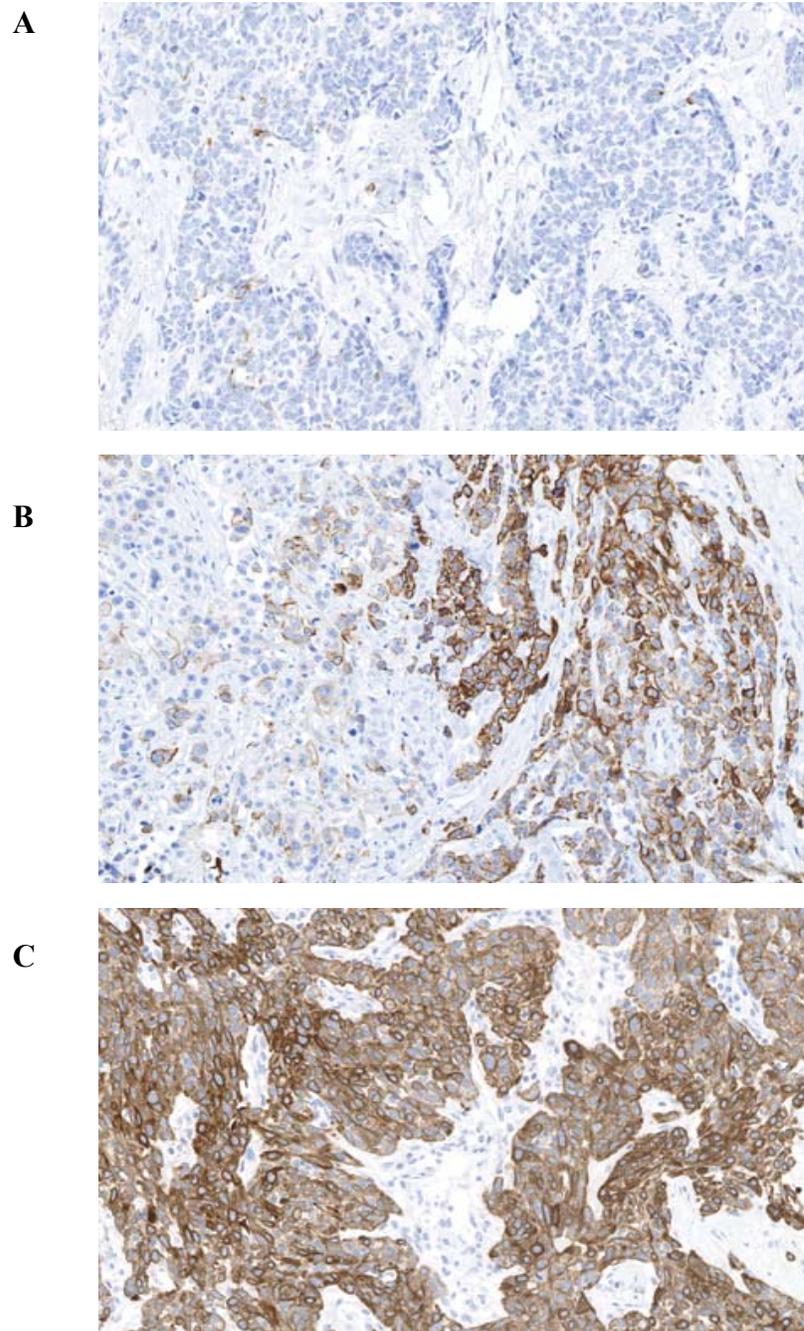


Figure 13. Marquage membranaire et cytoplasmique de CK5/6 à différents niveaux dans le carcinome mammaire de haut grade : (A) négatif : moins de 10% de cellules positives; (B) modéré : de 10% à 70% de cellules positives; (C) fort : plus de 70% de cellules positives. (grossissement original x 200).

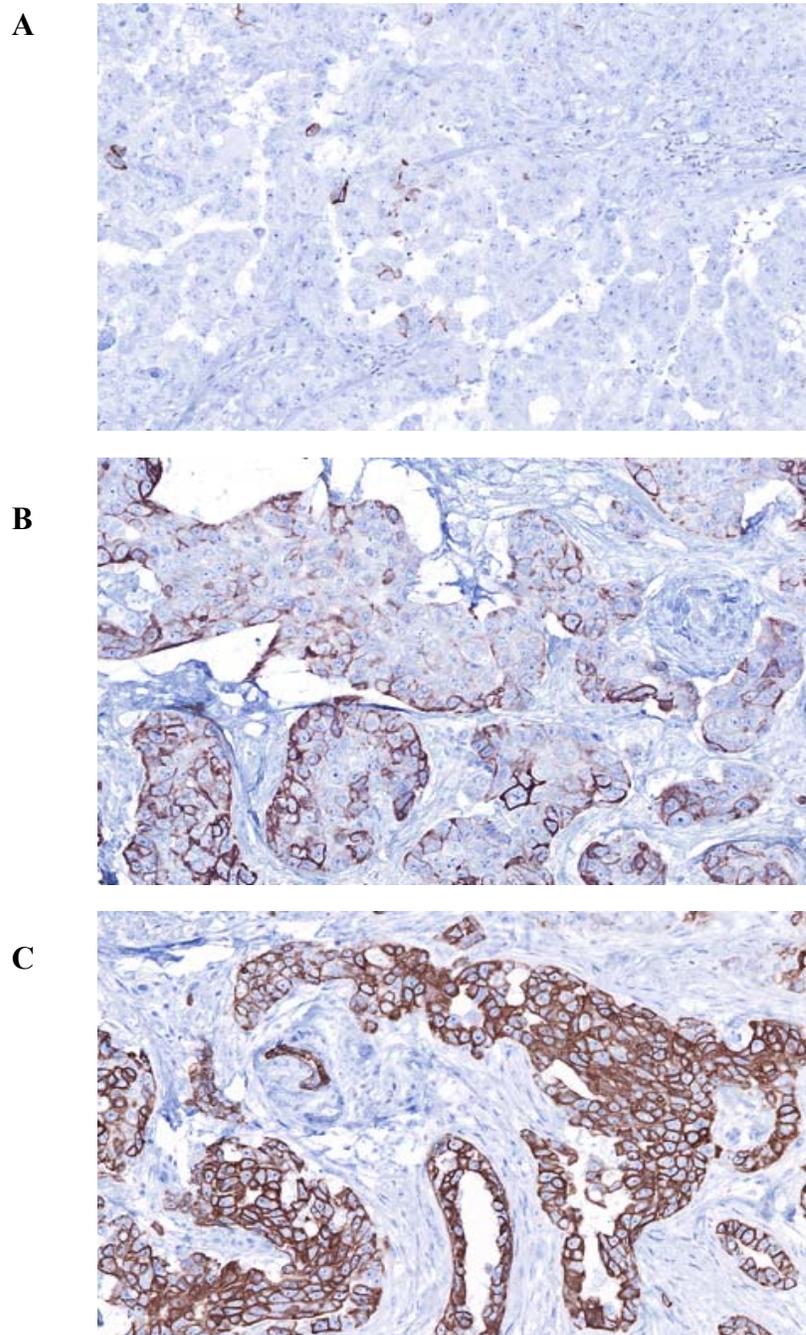


Figure 14. Marquage membranaire et cytoplasmique de CK14 à différents niveaux dans le carcinome mammaire de haut grade : (A) négatif : moins de 10% de cellules positives; (B) modéré : de 10% à 70% de cellules positives; (C) fort : plus de 70% de cellules positives. (grossissement original x 200).

Tableau V Comparaison des carcinomes mammaires de haut grade de phénotype basal et de bas grade pour le pourcentage de cellules tumorales positives pour les différents marqueurs du cancer du sein

| Marqueurs | Pourcentage de cellules positives | n | Phénotype basal n (%) | n | Bas grade n (%) | valeur <i>p</i> |
|-----------|-----------------------------------|----|-----------------------|----|-----------------|-----------------|
| ER | <10 | 43 | 43 (100) | 30 | 0 (0) | < 0,001 |
| | 10-70 | | 0 (0) | | 3 (10) | |
| | >70 | | 0 (0) | | 27 (90) | |
| PR | <10 | 43 | 43 (100) | 25 | 8 (32) | < 0,001 |
| | 10-70 | | 0 (0) | | 7 (28) | |
| | >70 | | 0 (0) | | 10 (40) | |
| HER-2 | <10 | 43 | 43 (100) | 27 | 27 (100) | 1 |
| | 10-70 | | 0 (0) | | 0 (0) | |
| | >70 | | 0 (0) | | 0 (0) | |
| CK5/6 | <10 | 43 | 7 (16) | 27 | 25 (93) | < 0,001 |
| | 10-70 | | 24 (56) | | 2 (7) | |
| | >70 | | 12 (28) | | 0 (0) | |
| CK14 | <10 | 43 | 24 (56) | 25 | 23 (92) | < 0,001 |
| | 10-70 | | 13 (30) | | 2 (8) | |
| | >70 | | 6 (14) | | 0 (0) | |

p < 0.05 est statistiquement significatif

Tableau VI Comparaison des carcinomes mammaires de phénotype basal et luminal A pour le pourcentage de cellules tumorales positives pour les différents marqueurs du cancer du sein

| Marqueurs | Pourcentage de cellules positives | n | Phénotype basal n (%) | n | Luminal A n (%) | valeur <i>p</i> |
|-----------|-----------------------------------|----|-----------------------|----|-----------------|-----------------|
| ER | <10 | 43 | 43 (100) | 34 | 0 (0) | < 0,001 |
| | 10-70 | | 0 (0) | | 1 (3) | |
| | >70 | | 0 (0) | | 33 (97) | |
| PR | <10 | 43 | 43 (100) | 34 | 13 (38) | < 0,001 |
| | 10-70 | | 0 (0) | | 14 (41) | |
| | >70 | | 0 (0) | | 7 (21) | |
| HER-2 | <10 | 43 | 43 (100) | 34 | 34 (100) | 1,000 |
| | 10-70 | | 0 (0) | | 0 (0) | |
| | >70 | | 0 (0) | | 0 (0) | |
| CK5/6 | <10 | 43 | 7 (16) | 34 | 34 (100) | < 0,001 |
| | 10-70 | | 24 (56) | | 0 (0) | |
| | >70 | | 12 (28) | | 0 (0) | |
| CK14 | <10 | 43 | 24 (56) | 34 | 34 (100) | < 0,001 |
| | 10-70 | | 13 (30) | | 0 (0) | |
| | >70 | | 6 (14) | | 0 (0) | |

p < 0.05 est statistiquement significatif

Tableau VII Comparaison des carcinomes mammaires de phénotype basal et surexprimant HER-2 pour le pourcentage de cellules tumorales positives pour les différents marqueurs du cancer du sein

| Marqueurs | Pourcentage de cellules positives | n | Phénotype basal n (%) | n | HER-2 n (%) | valeur <i>p</i> |
|-----------|-----------------------------------|----|-----------------------|----|-------------|-----------------|
| ER | <10 | 43 | 43 (100) | 33 | 26 (79) | < 0,001 |
| | 10-70 | | 0 (0) | | 5 (15) | |
| | >70 | | 0 (0) | | 2 (6) | |
| PR | <10 | 43 | 43 (100) | 33 | 30 (91) | 0,004 |
| | 10-70 | | 0 (0) | | 3 (9) | |
| | >70 | | 0 (0) | | 0 (0) | |
| HER-2 | <10 | 43 | 43 (100) | 33 | 0 (0) | < 0,001 |
| | 10-70 | | 0 (0) | | 0 (0) | |
| | >70 | | 0 (0) | | 33 (100) | |
| CK5/6 | <10 | 43 | 7 (16) | 33 | 30 (91) | < 0,001 |
| | 10-70 | | 24 (56) | | 3 (9) | |
| | >70 | | 12 (28) | | 0 (0) | |
| CK14 | <10 | 43 | 24 (56) | 33 | 32 (97) | < 0,001 |
| | 10-70 | | 13 (30) | | 1 (3) | |
| | >70 | | 6 (14) | | 0 (0) | |

p < 0.05 est statistiquement significatif

Tableau VIII Comparaison des carcinomes mammaires canauxiaux de phénotype basal et médullaires typiques pour le pourcentage de cellules tumorales positives pour les différents marqueurs du cancer du sein

| Marqueurs | Pourcentage de cellules positives | n | Phénotype basal n (%) | n | Médullaire typique n (%) | valeur <i>p</i> |
|-----------|-----------------------------------|----|-----------------------|----|--------------------------|-----------------|
| ER | <10 | 43 | 43 (100) | 11 | 11 (100) | 0,613 |
| | 10-70 | | 0 (0) | | 0 (0) | |
| | >70 | | 0 (0) | | 0 (0) | |
| PR | <10 | 43 | 43 (100) | 11 | 11 (100) | 1,000 |
| | 10-70 | | 0 (0) | | 0 (0) | |
| | >70 | | 0 (0) | | 0 (0) | |
| HER-2 | <10 | 43 | 43 (100) | 11 | 11 (100) | 0,983 |
| | 10-70 | | 0 (0) | | 0 (0) | |
| | >70 | | 0 (0) | | 0 (0) | |
| CK5/6 | <10 | 43 | 7 (16) | 11 | 7 (64) | 0,001 |
| | 10-70 | | 24 (56) | | 3 (27) | |
| | >70 | | 12 (28) | | 1 (9) | |
| CK14 | <10 | 43 | 24 (56) | 10 | 9 (90) | 0,040 |
| | 10-70 | | 13 (30) | | 1 (10) | |
| | >70 | | 6 (14) | | 0 (0) | |

$p < 0.05$ est statistiquement significatif

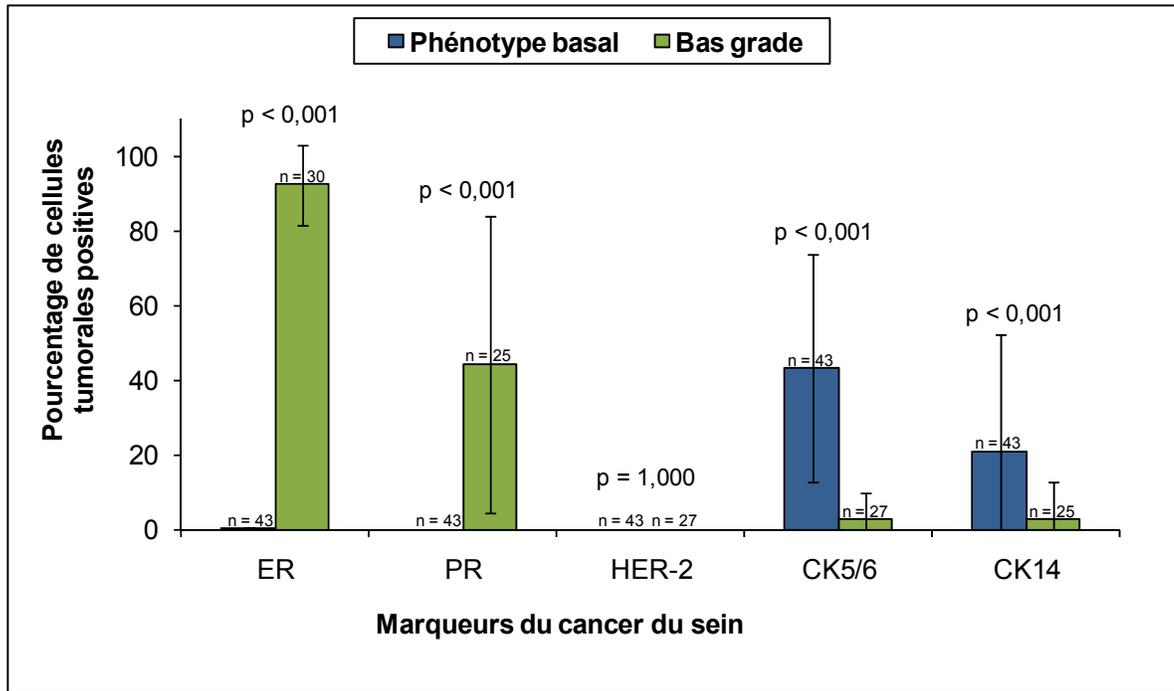


Figure 15. Moyenne du pourcentage de cellules tumorales positives pour les différents marqueurs du cancer du sein pour les carcinomes mammaires de haut grade de phénotype basal et de bas grade. Valeur \pm l'erreur standard de la moyenne.

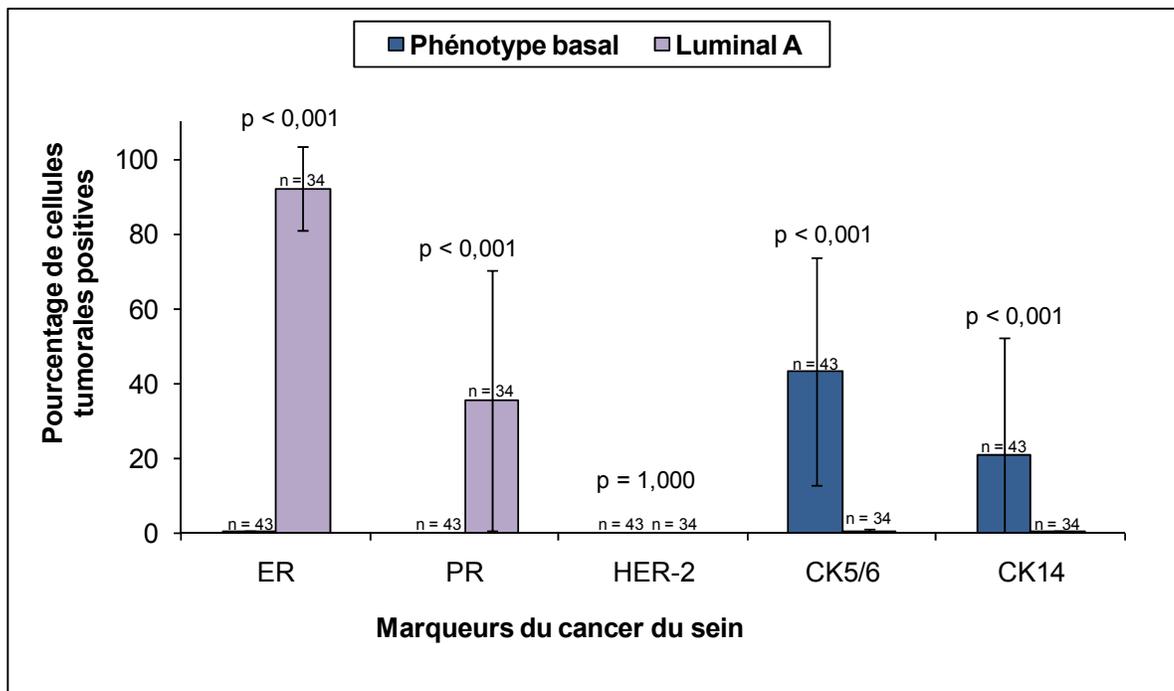


Figure 16. Moyenne du pourcentage de cellules tumorales positives pour les différents marqueurs du cancer du sein pour les carcinomes mammaires de phénotype basal et luminal A. Valeur \pm l'erreur standard de la moyenne.

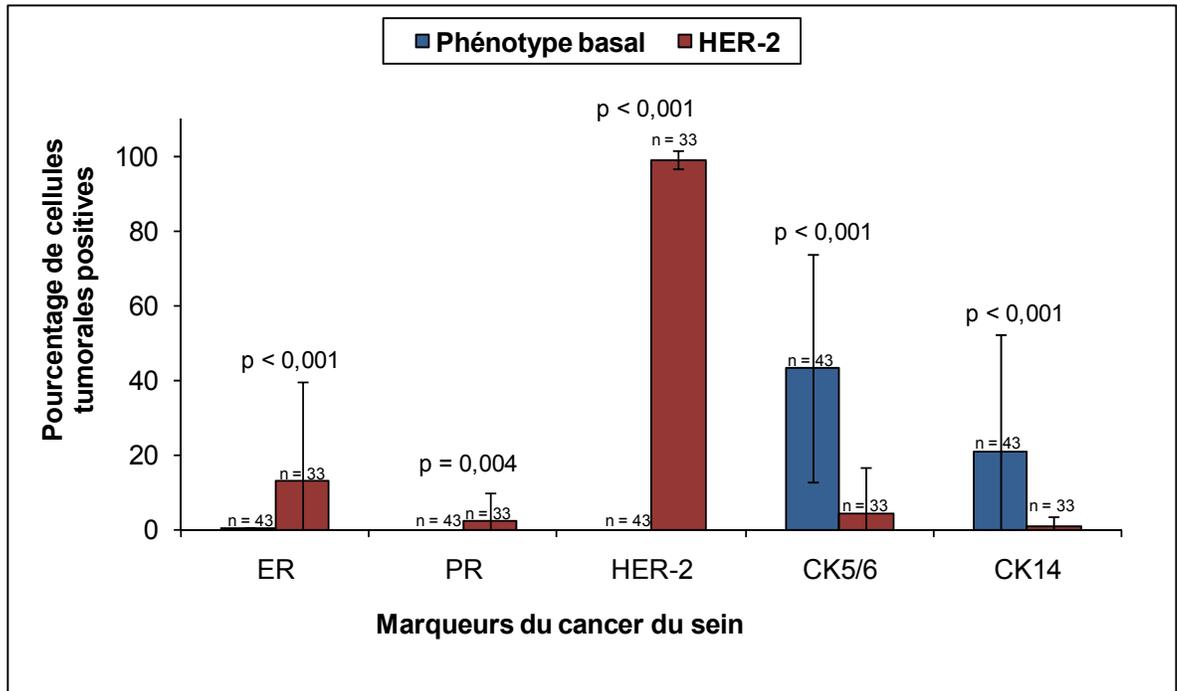


Figure 17. Moyenne du pourcentage de cellules tumorales positives pour les différents marqueurs du cancer du sein pour les carcinomes mammaires de phénotype basal et surexprimant HER-2. Valeur \pm l'erreur standard de la moyenne.

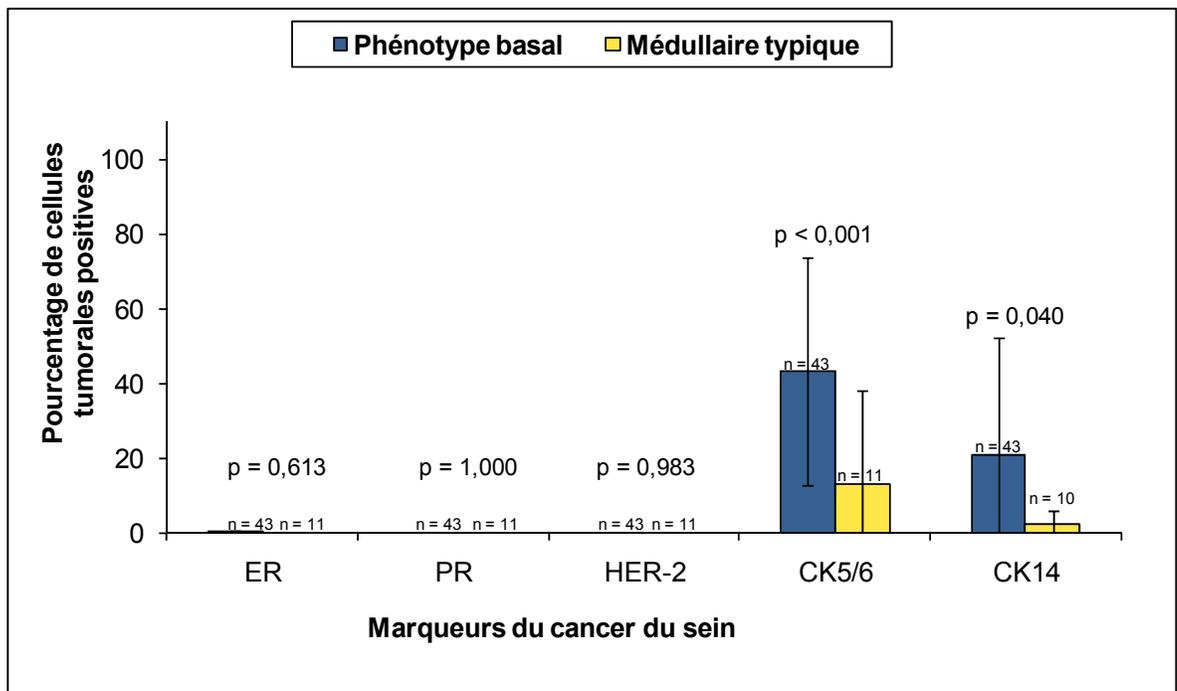


Figure 18. Moyenne du pourcentage de cellules tumorales positives pour les différents marqueurs du cancer du sein pour les carcinomes mammaires canaux de phénotype basal et médullaires typiques. Valeur \pm l'erreur standard de la moyenne.

II. Les marqueurs du potentiel métastatique

Les étapes de la cascade métastatique peuvent être caractérisées à l'aide de marqueurs. Ce projet de recherche vise à caractériser le potentiel métastatique du cancer du sein de phénotype basal à l'aide de ces marqueurs. Pour ce faire, ce sous-type d'expression génique distinct a été comparé aux carcinomes canaux de bas grade, de haut grade luminal A, HER-2 positifs et médullaires typiques, en fonction de l'expression différentielle des marqueurs Ki-67, p53, CD276, galectine-7, GATA-3, EGFR et MMP-3. Tout comme pour les marqueurs du cancer du sein, six micromatrices tissulaires, comprenant 213 tumeurs, ont été confectionnées. L'expression des marqueurs a été vérifiée sur chacune des micromatrices tissulaires grâce à une réaction immunohistochimique. Une évaluation semi-quantitative du marquage a permis de calculer le pourcentage de cellules tumorales positives pour un antigène donné. Un marquage inférieur à 10% des cellules est considéré négatif. Lorsque 10% à 70% des cellules expriment la protéine, le marquage est considéré modéré. Enfin, si 70% des cellules ou plus sont marquées, l'expression de ce marqueur est dite forte.

II.1 Ki-67

La protéine Ki-67 s'exprime lors de la prolifération cellulaire et se retrouve sélectivement dans le noyau. Elle est très peu exprimée dans les cellules épithéliales du sein normal (Figure 19A, p.56).

Le marquage des cellules tumorales se divise en 3 catégories : négatif (moins de 10% de cellules tumorales positives), modéré (de 10% à moins de 70% de cellules tumorales positives) et fort (70% ou plus de cellules tumorales positives) (Figure 22, p.59). La protéine Ki-67 est exprimée modérément dans 65% et fortement dans 35% des carcinomes

mammaires de phénotype basal. Dans les cancers de bas grade, 31% des carcinomes sont négatifs pour ce marqueur et 69% l'exprime de façon modérée. La différence de marquage entre les carcinomes de base grade et les cancers du sein de phénotype basal est statistiquement significative (Tableau IX, p.66; Figure 29, p.70). L'expression de Ki-67, dans le sous-type luminal A, est le plus souvent modérée : négatif pour 9% des cas, modéré pour 82% des cas et fort pour 9% des cas. Il y a aussi une différence statistiquement significative entre le cancer luminal A et les cancers de phénotype basal pour ce marquage (Tableau XI, p.67; Figure 31, p.71). L'expression de cette protéine dans le sous-type HER-2 est plus fréquemment modérée : modérée pour 81% des cas et forte pour 19% des cas. Comparé aux carcinomes mammaires de phénotype basal, cette différence des niveaux d'expression est statistiquement significative (Tableau XIII, p.68; Figure 33, p.72). Pour les cancers médullaires typiques, le marqueur Ki-67 est exprimé modérément dans 45% et fortement dans 55% des tumeurs. La différence d'expression par rapport au phénotype basal est aussi statistiquement significative (Tableau XV, p.69; Figure 35, p.73).

Ainsi, nos travaux indiquent que la protéine Ki-67 est associée aux carcinomes mammaires de phénotype basal, mais plus spécifiquement au type histologique médullaire typique.

II.2 p53

L'accumulation de la protéine p53, dans le noyau de la cellule, s'observe lors d'une mutation inactivatrice. La glande mammaire n'exprime pas constitutivement cette protéine mutée (Figure 19B, p.56).

Les 3 catégories du marquage des cellules tumorales (négatif, modéré et fort) sont les mêmes que pour Ki-67 (Figure 23, p.60). Au sein du sous-type phénotype basal, le marquage de p53 est soit négatif (51% des cas) ou fortement positif (47% des cas),

seulement 2% des carcinomes (1 cas sur 43) exprime ce marqueur modérément. Les cancers de bas grade montrent principalement une absence de p53 : négatif pour 79% des cas, modéré pour 17% des cas et fort pour 4% des cas (1 cas sur 29). Le marqueur p53 est donc plus souvent exprimé dans les cancers de phénotype basal que dans les cancers de bas grade. Cette différence est statistiquement significative (Tableau IX, p.66; Figure 29, p.70). L'expression de ce marqueur est également presque exclusivement négative dans les carcinomes mammaires luminal A : négatif pour 88% des cas, modéré pour 6% des cas et fort pour 6% des cas. Par contre, la différence de marquage avec les carcinomes de phénotype basal n'est pas statistiquement significative (Tableau XI, p.67; Figure 31, p.71). Le sous-type HER-2 démontre un marquage variable : négatif pour 61% des cas, modéré pour 15% des cas et fort pour 24% des cas. L'expression de p53 n'est pas statistiquement significative lorsque comparée au sous-type phénotype basal (Tableau XIII, p.68; Figure 33, p.72). Le cancer médullaire typique est semblable au phénotype basal quant à l'expression de p53. Cette protéine est soit absente (36% des cas) ou fortement exprimée (55%), seulement 9% des carcinomes (1 cas sur 11) a un marquage modéré (Tableau XV, p.69; Figure 35, p.73).

Le marqueur p53, dans la présente étude, n'est donc pas un marqueur spécifique ou caractéristique du cancer du sein de phénotype basal.

II.3 CD276

La localisation cellulaire de CD276 est cytoplasmique et membranaire. Par contre, dans cette étude, seulement la protéine membranaire, avec une intensité de 2 ou 3, a été quantifiée. Cette méthode peut être comparée à celle qui a permis de quantifier HER-2

(Figure 6, p.8). Les cellules épithéliales du sein normal ne possèdent que peu de cette protéine membranaire (Figure 19C, p.56).

Le marquage des cellules tumorales est toujours divisé en 3 catégories, c'est-à-dire négatif, modéré et fort (Figure 24, p.61). L'expression de CD276 est très variable au sein du sous-type phénotype basal : négatif pour 28% des cas, modéré pour 41% des cas et fort pour 31% des cas. En comparaison avec le cancer de bas grade, la différence est statistiquement significative puisque la protéine CD276 est principalement absente dans ces carcinomes (85% des cas) et seulement 15% des cas ont une expression modérée (Tableau IX, p.66; Figure 29, p.70). Le cancer du sein luminal A possède une expression variable de CD276, mais le plus souvent négative : négatif pour 66% des cas, modéré pour 22% des cas et fort pour 12% des cas. Cette différence distingue ce sous-type du cancer de phénotype basal (Tableau XI, p.67; Figure 31, p.71). Les carcinomes mammaires HER-2 positifs sont similaires au phénotype basal : négatif pour 29% des cas, modéré pour 48% des cas et fort pour 23% des cas (Tableau XIII, p.68; Figure 33, p.72). Par contre, le cancer médullaire typique exprime CD276 soit négativement (45%) ou modérément (45%), mais très peu de carcinomes montrent un fort marquage (10% ou 1 cas sur 11). En comparaison avec le cancer de phénotype basal, cette différence d'expression n'est pas statistiquement significative (Tableau XV, p.69; Figure 35, p.73).

La protéine membranaire CD276 est associée aux carcinomes mammaires de phénotype basal, mais également au sous-type HER-2.

II.4 Galectine-7

La galectine-7 est observée dans le noyau et le cytoplasme des cellules. Au sein de la glande mammaire, elle est exclusivement exprimée par les cellules épithéliales basales (Figure 20A, p.57).

Le marquage des cellules tumorales se divise en 3 catégories : négatif (moins de 10% de cellules tumorales positives), modéré (de 10% à moins de 70% de cellules tumorales positives) et fort (70% ou plus de cellules tumorales positives) (Figure 25, p.62). La galectine-7 est exprimée à différents niveaux dans le cancer du sein de phénotype basal : 51% des cas sont négatifs, l'expression est modérée pour 34% des cas et forte pour 15% des cas. Les carcinomes mammaires de bas grade, ainsi que de haut grade luminal A, ne possèdent pas de marquage pour cette protéine (100% des carcinomes) (Tableaux IX et XI, p.66 et 67; Figures 29 et 31, p.70 et 71). Les cancers du sein HER-2 positifs ont une expression principalement négative de la galectine-7 (83% des carcinomes), tandis que 13% des carcinomes l'expriment modérément et qu'un seul cas possède un fort marquage. Le marquage de la galectine-7 diffère entre le sous-type HER-2 et le sous-type phénotype basal et cette différence est statistiquement significative (Tableau XIII, p.68; Figure 33, p.72). De plus, le cancer médullaire typique n'a aucun marquage de cette protéine (91% des carcinomes) si ce n'est qu'un seul cas sur 11 l'exprime de façon modérée, ce qui tranche avec les carcinomes de phénotype basal (Tableau XV, p.69; Figure 35, p.73).

L'association de la galectine-7 au cancer du sein de phénotype basal est démontrée dans notre étude.

II.5 GATA-3

Le facteur de transcription GATA-3 possède une localisation nucléaire dans la cellule. La couche luminale du sein normal exprime cette protéine (Figure 20B, p.57).

Les 3 catégories du marquage des cellules tumorales (négatif, modéré et fort) sont les mêmes que pour la galectine-7 (Figure 26, p.63). Les carcinomes mammaires de phénotype basal n'expriment pas la protéine GATA-3 (98%), si ce n'est que d'un seul cas. En contraste, les cancers du sein de bas grade montrent un marquage pour GATA-3 soit modéré (43% des carcinomes) ou fort (54% des carcinomes) (Tableau IX, p.66; Figure 29, p.70). Le sous-type luminal A exprime similairement ce marqueur : l'expression est négative pour 15% des cas, modérée pour 59% des cas et forte pour 26% des cas. Ceci inclut une différence statistiquement significative pour l'expression de GATA-3 entre les sous-types luminal A et de phénotype basal (Tableau XI, p.67; Figure 31, p.71). Le marquage des carcinomes mammaires HER-2 positifs est départagé entre l'absence de la protéine (64% des carcinomes) et une expression modérée (33% des carcinomes), tandis qu'un seul cas possède un fort marquage de GATA-3. Cette différence d'expression distingue ce sous-type du cancer de phénotype basal (Tableau XIII, p.68; Figure 33, p.72). Les carcinomes mammaires médullaire typique ne possède pas de marquage pour GATA-3 (100% des carcinomes), ce qui est similaire au sous-type phénotype basal (Tableau XV, p.69; Figure 35, p.73).

Selon cette étude, il y a une association entre l'absence du facteur de transcription GATA-3 et les carcinomes mammaires de phénotype basal, tout comme le type histologique médullaire typique.

II.6 EGFR

Le récepteur tyrosine kinase EGFR se retrouve dans le cytoplasme et à la membrane cellulaire. Cette protéine est exprimée dans l'assise basale de la glande mammaire (Figure 20C, p.57).

Le marquage des cellules tumorales est toujours divisé en 3 catégories, c'est-à-dire négatif, modéré et fort (Figure 27, p.64). Selon nos critères de sélection, le cancer de phénotype basal comprend l'expression des CK5/6 et/ou d'EGFR. Dans la présente étude, le sous-type phénotype basal possède un marquage variable de ce récepteur : négatif pour 19% des cas, modéré pour 53% des cas et fort pour 28% des cas. Par comparaison, les carcinomes mammaires de bas grade et de haut grade luminal A montrent un défaut d'expression de cette protéine (100% des carcinomes) (Tableaux IX et XI, p.66 et 67; Figures 29 et 31, p.70 et 71). Le marquage est le plus souvent négatif pour le sous-type HER-2 (66% des carcinomes), bien que 12% des carcinomes ont un marquage modéré et que 22% des carcinomes l'expriment fortement. En comparant ce sous-type au phénotype basal, cette différence d'expression est statistiquement significative (Tableau XIII, p.68; Figure 33, p.72). Tout comme le cancer de phénotype basal, le cancer médullaire typique possède une expression variable d'EGFR : négative pour 36% des cas, modérée pour 46% des cas et forte pour 18% des cas (Tableau XV, p.69; Figure 35, p.73).

Nos travaux confirment que le marqueur EGFR est étroitement lié au sous-type phénotype basal et qu'il peut également être associé aux carcinomes médullaires typiques.

II.7 Métalloprotéase de la matrice 3 (MMP-3)

La protéine responsable de la dégradation de la matrice extracellulaire, MMP-3, est présente dans le cytoplasme de la cellule. Dans le sein normal, cette protéine se retrouve dans les cellules épithéliales, sans distinction (Figure 21, p.58).

Cette métalloprotéase étant exprimée par toutes les cellules tumorales, la quantification a été basée sur l'intensité du marquage de cette protéine : faible (0 à 1), modérée (plus de 1 à 2) et forte (plus de 2 à 3) (Figure 28, p.65). Dans le cancer de phénotype basal, l'expression de cette protéine est le plus souvent d'intensité modérée (64% des carcinomes) et forte (29% des carcinomes), tandis que seulement 7% des carcinomes ont un marquage d'une faible intensité. C'est également le cas pour les carcinomes de bas grade : intensité faible dans 12% des cas, modérée dans 53% des cas et forte dans 35% des cas (Tableau X, p.66; Figure 30, p.70). Les cancers du sein luminal A possèdent une plus grande variabilité pour l'intensité de ce marqueur : faible dans 27% des cas, modérée dans 46% des cas et forte dans 27% des cas (Tableau XII, p.67; Figure 32, p.71). L'expression de la MMP-3 pour le sous-type HER-2 est principalement d'intensité modérée (79% des carcinomes), bien qu'elle est faible dans 14% des carcinomes et qu'un seul cas possède une forte intensité. Ces différences d'intensité de marquage n'est pas statistiquement significative lorsque comparées au sous-type phénotype basal (Tableau XIV, p.68; Figure 34, p.72). Pour ce qui est du type histologique médullaire typique, 27% des carcinomes ont une intensité modérée et 73% des carcinomes ont une forte intensité pour MMP-3, ce qui tranche avec le cancer de phénotype basal (Tableau XVI, p.69; Figure 36, p.73).

L'intensité du marquage de la MMP-3 n'est pas associée aux carcinomes mammaires de phénotype basal, selon cette étude.

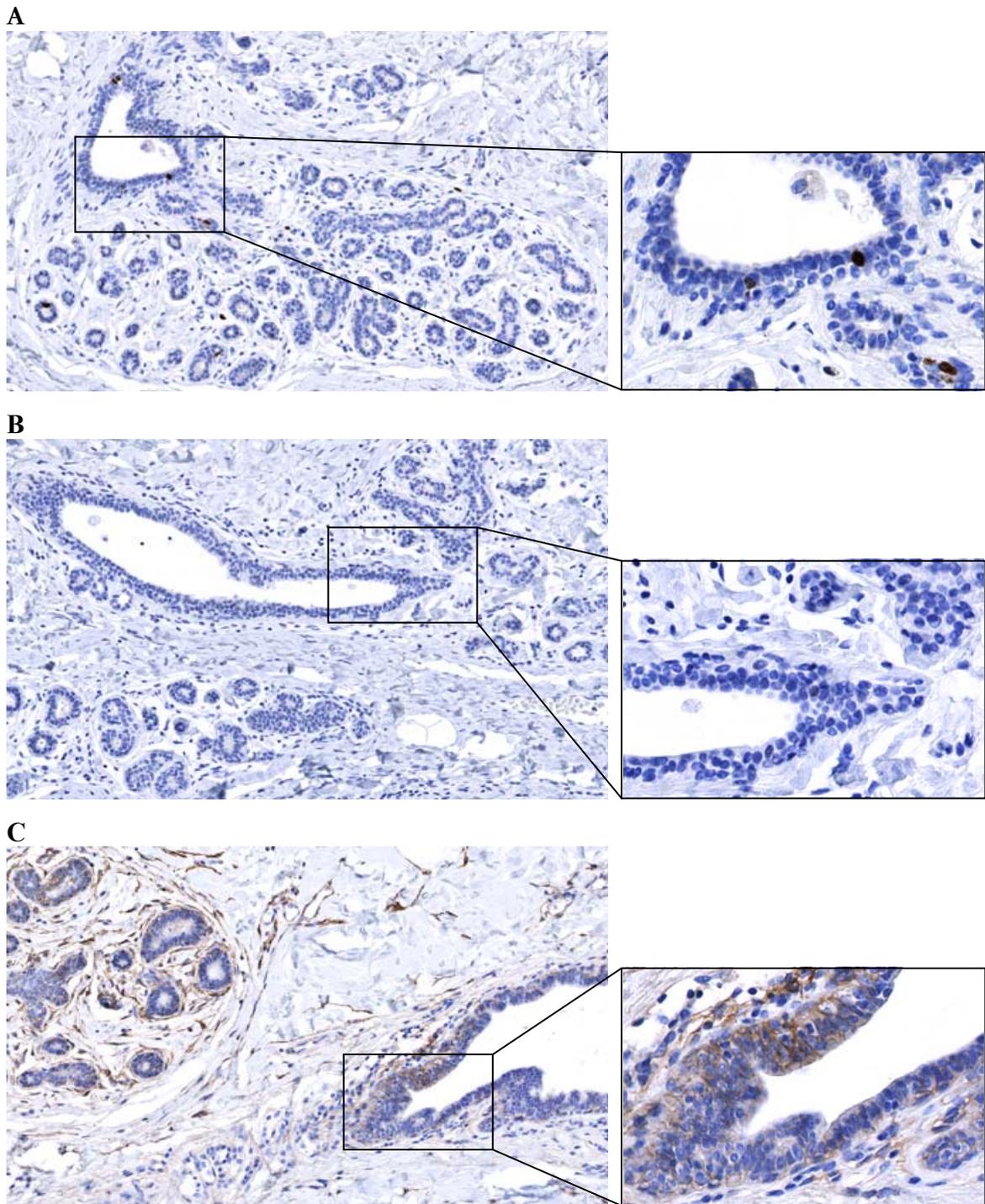


Figure 19. Expression des marqueurs du potentiel métastatique dans le sein normal : (A) Ki-67; (B) absence de p53 muté; (C) CD276. (grossissement original x 100 (gauche) suivi d'un grossissement original x 400 (droite)).

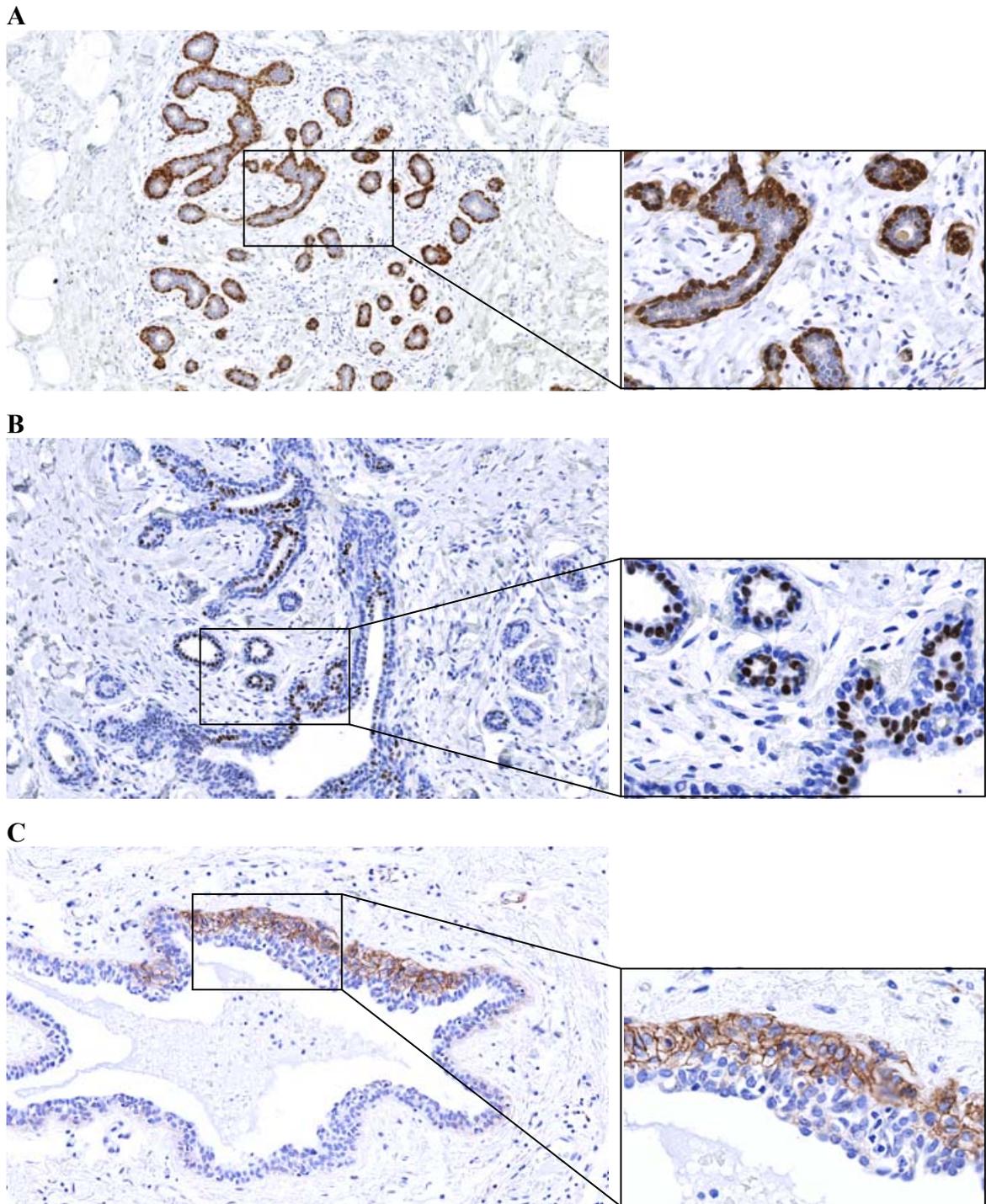


Figure 20. Expression des marqueurs du potentiel métastatique dans le sein normal : (A) Galectine-7; (B) GATA-3; (C) EGFR. (grossissement original x 100 (gauche) suivi d'un grossissement original x 400 (droite)).

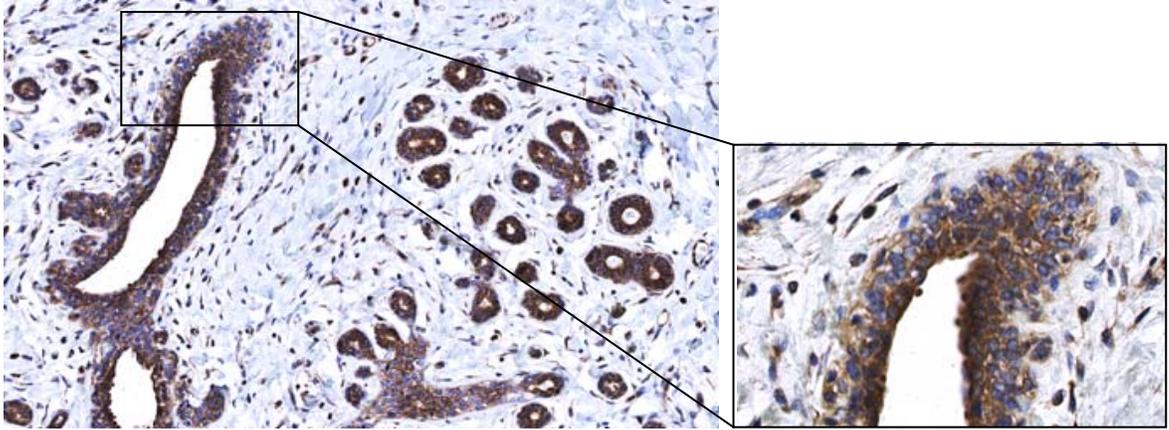


Figure 21. Expression des marqueurs du potentiel métastatique dans le sein normal : Métalloprotéase 3 (MMP-3). (grossissement original x 100 (gauche) suivi d'un grossissement original x 400 (droite)).

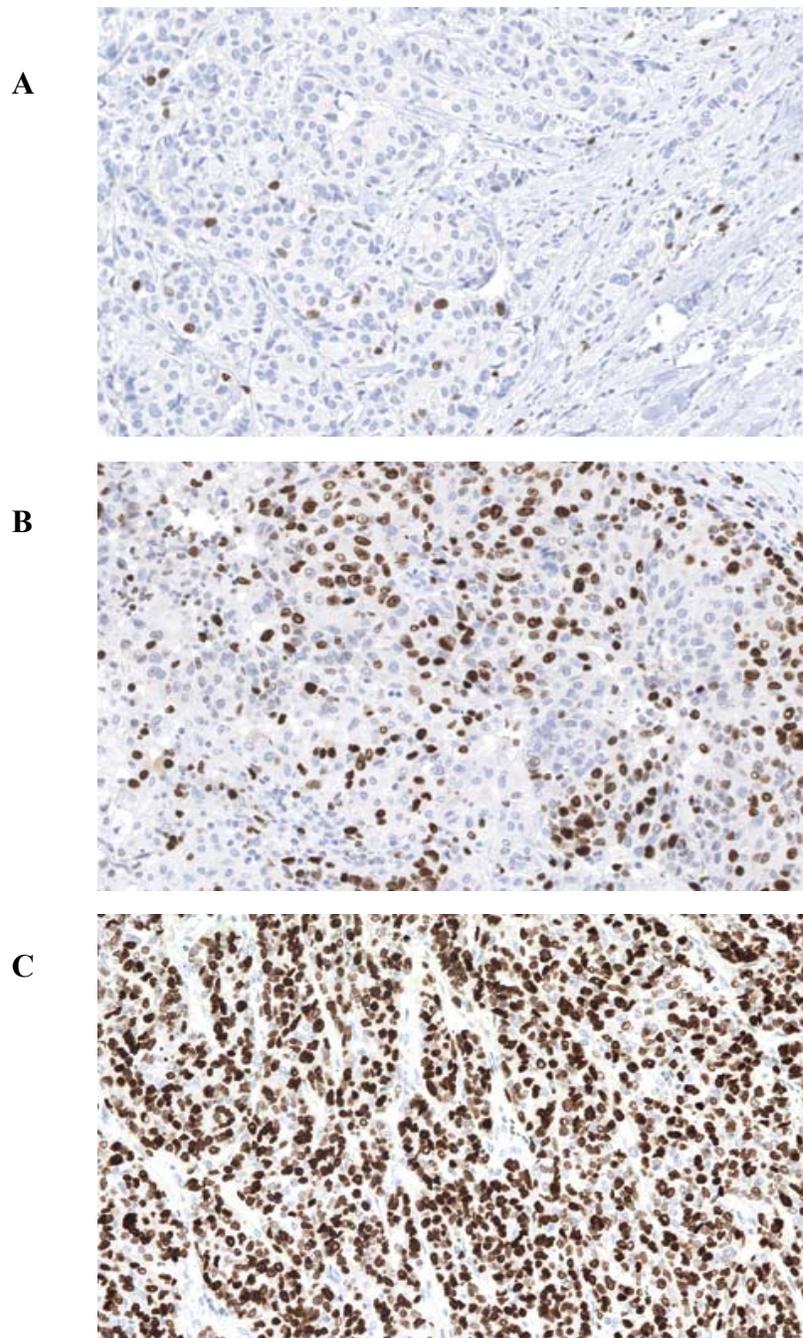


Figure 22. Marquage nucléaire de Ki-67 à différents niveaux dans le carcinome mammaire de haut grade : (A) négatif : moins de 10% de cellules positives; (B) modéré : de 10% à 70% de cellules positives; (C) fort : plus de 70% de cellules positives. (grossissement original x 200).

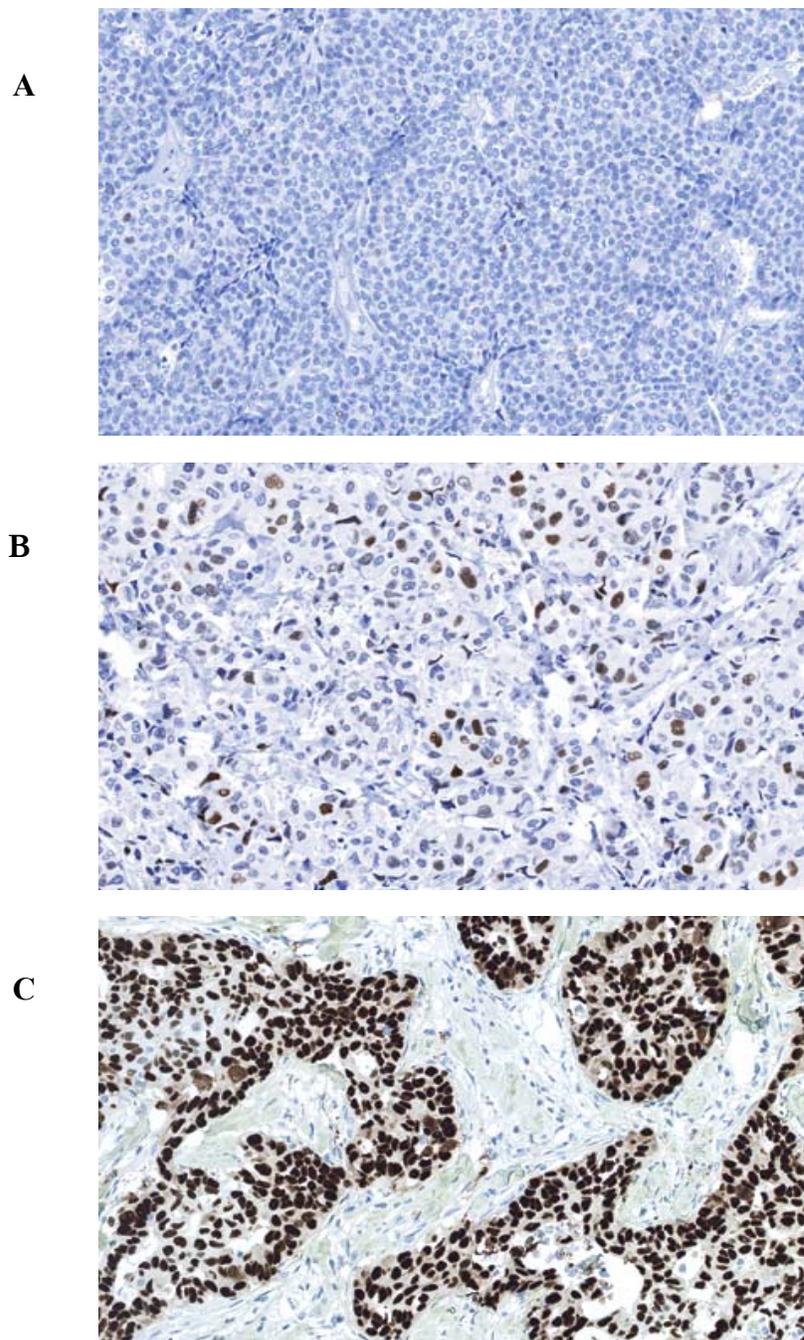


Figure 23. Marquage nucléaire de p53 à différents niveaux dans le carcinome mammaire de haut grade : (A) négatif : moins de 10% de cellules positives; (B) modéré : de 10% à 70% de cellules positives; (C) fort : plus de 70% de cellules positives. (grossissement original x 200).

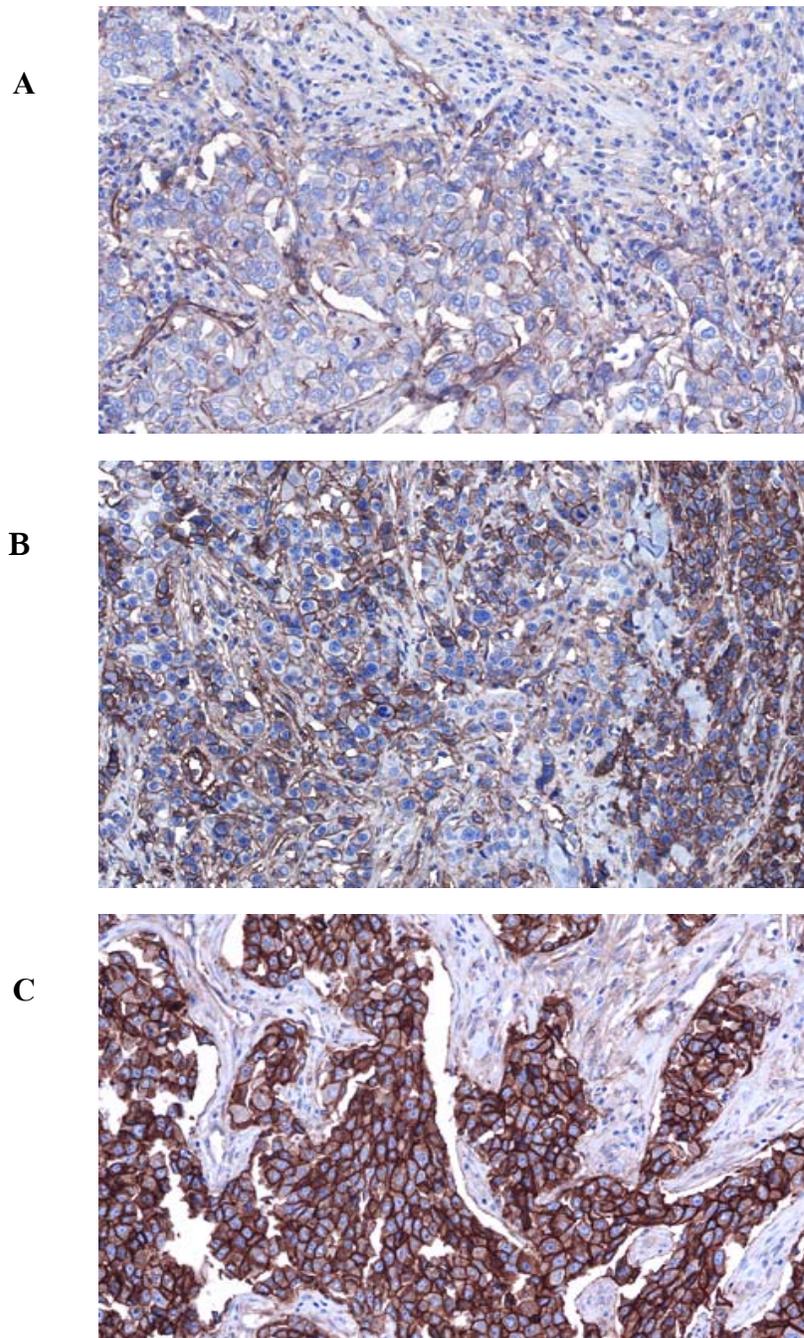


Figure 24. Marquage membranaire de CD276 à différents niveaux dans le carcinome mammaire de haut grade : (A) négatif : moins de 10% de cellules positives; (B) modéré : de 10% à 70% de cellules positives; (C) fort : plus de 70% de cellules positives. (grossissement original x 200).

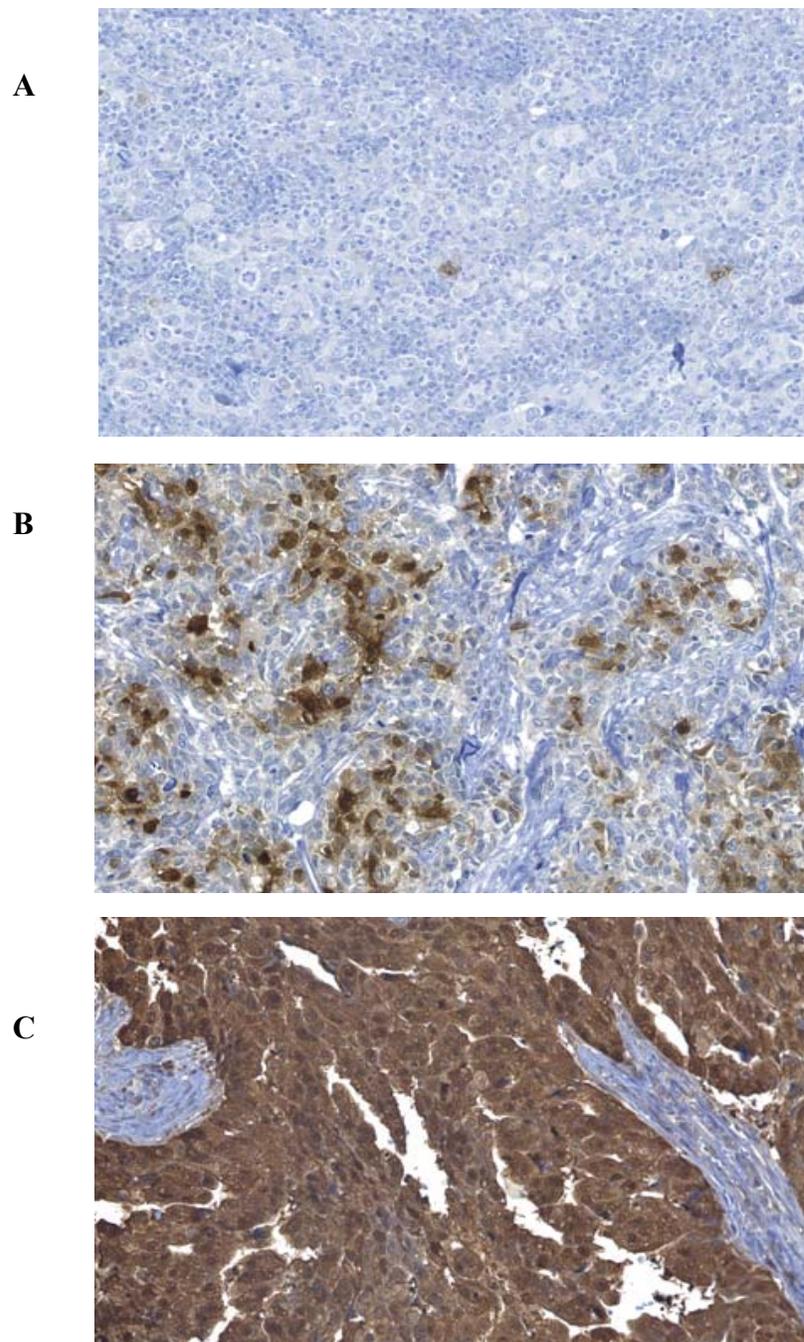


Figure 25. Marquage cytoplasmique et nucléaire de la galectine-7 à différents niveaux dans le carcinome mammaire de haut grade : (A) négatif : moins de 10% de cellules positives; (B) modéré : de 10% à 70% de cellules positives; (C) fort : plus de 70% de cellules positives. (grossissement original x 200).

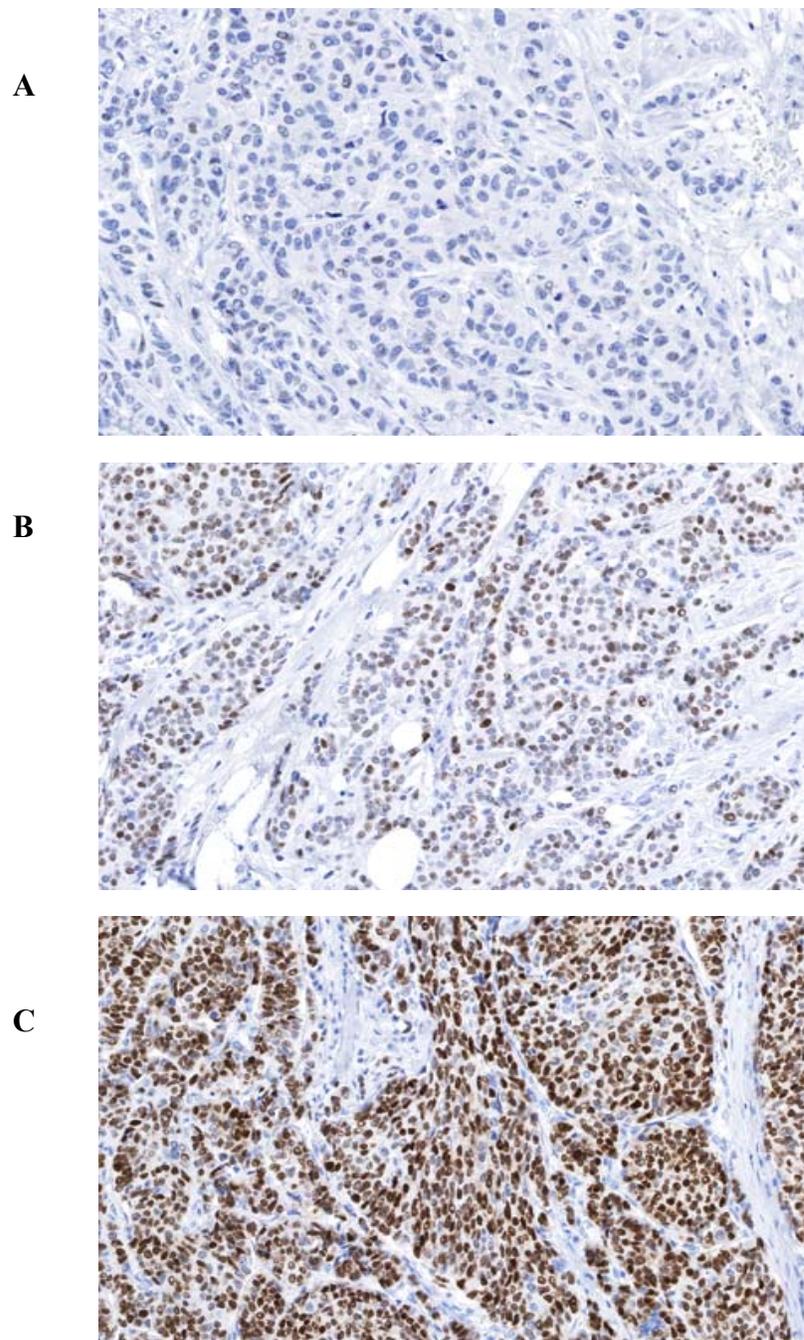


Figure 26. Marquage nucléaire de GATA-3 à différents niveaux dans le carcinome mammaire de haut grade : (A) négatif : moins de 10% de cellules positives; (B) modéré : de 10% à 70% de cellules positives; (C) fort : plus de 70% de cellules positives. (grossissement original x 200).

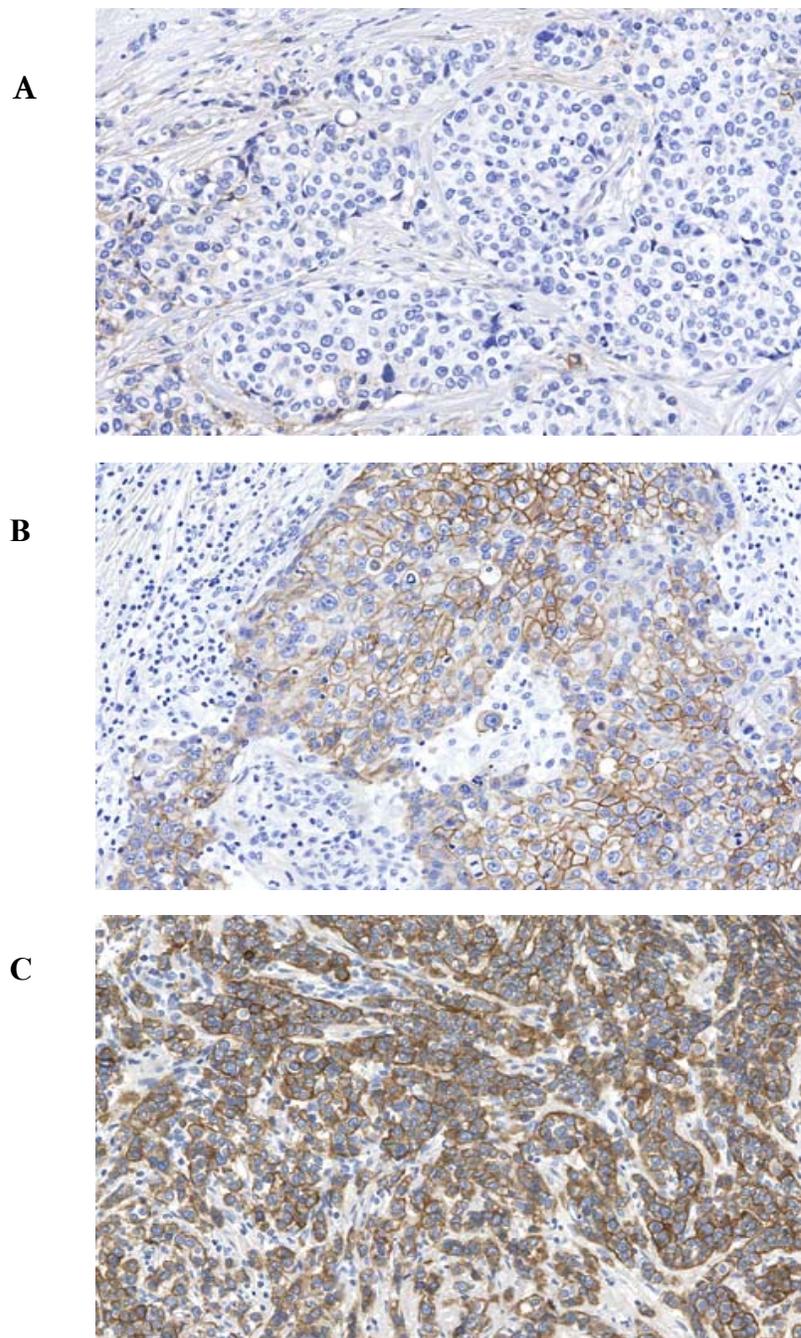


Figure 27. Marquage membranaire et cytoplasmique d'EGFR à différents niveaux dans le carcinome mammaire de haut grade : (A) négatif : moins de 10% de cellules positives; (B) modéré : de 10% à 70% de cellules positives; (C) fort : plus de 70% de cellules positives. (grossissement original x 200).

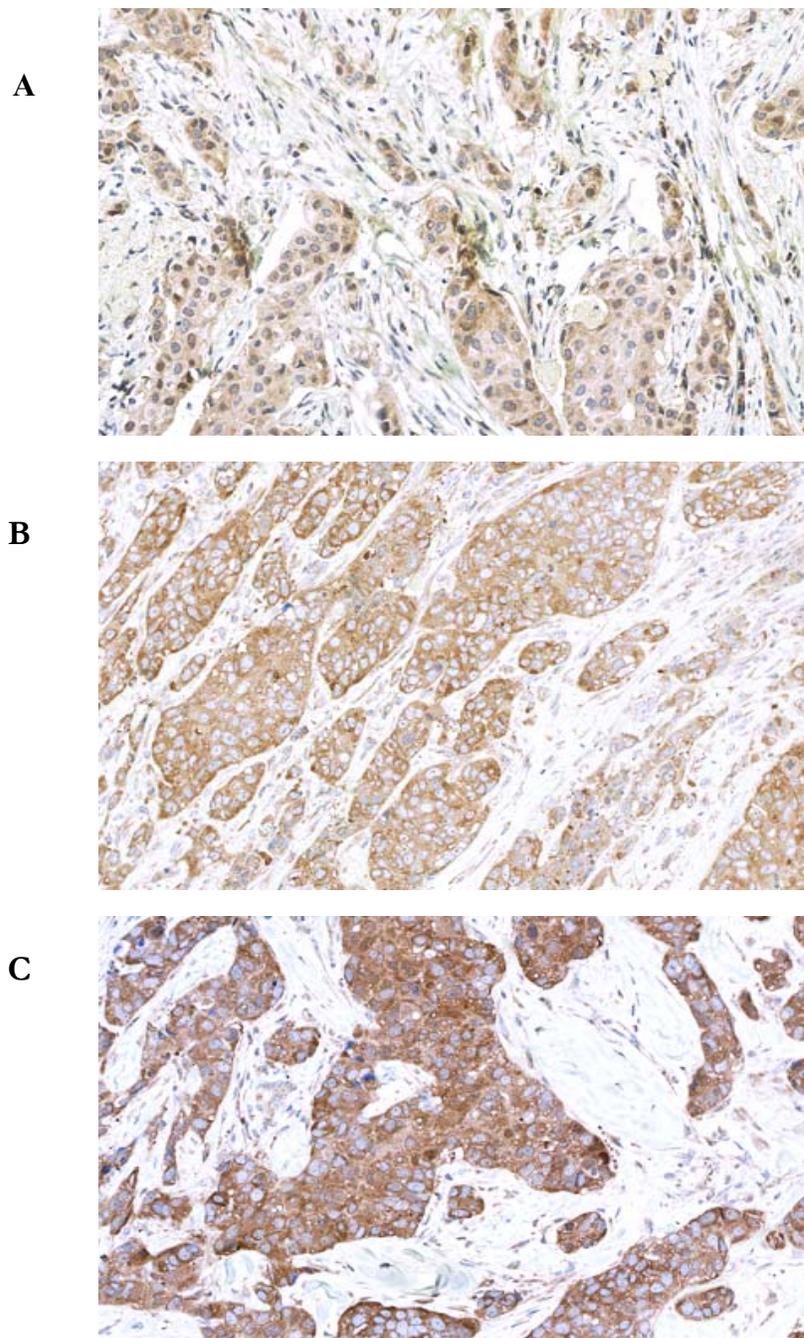


Figure 28. Marquage cytoplasmique de MMP-3 à différents niveaux dans le carcinome mammaire de haut grade : (A) faible : intensité de 0 à 1; (B) modéré : intensité de 1 à 2; (C) fort : intensité de 2 à 3. (grossissement original x 200).

Tableau IX Comparaison des carcinomes mammaires de haut grade de phénotype basal et de bas grade pour le pourcentage de cellules tumorales positives pour les différents marqueurs du potentiel métastatique

| Marqueurs | Pourcentage de cellules positives | n | Phénotype basal n (%) | n | Bas grade n (%) | valeur p |
|-------------|-----------------------------------|----|-----------------------|----|-----------------|----------|
| Ki-67 | <10 | 43 | 0 (0) | 29 | 9 (31) | < 0,001 |
| | 10-70 | | 28 (65) | | 20 (69) | |
| | >70 | | 15 (35) | | 0 (0) | |
| p53 | <10 | 43 | 22 (51) | 29 | 23 (79) | 0,041 |
| | 10-70 | | 1 (2) | | 5 (17) | |
| | >70 | | 20 (47) | | 1 (4) | |
| CD276 | <10 | 39 | 11 (28) | 27 | 23 (85) | < 0,001 |
| | 10-70 | | 16 (41) | | 4 (15) | |
| | >70 | | 12 (31) | | 0 (0) | |
| Galectine-7 | <10 | 41 | 21 (51) | 34 | 34 (100) | < 0,001 |
| | 10-70 | | 14 (34) | | 0 (0) | |
| | >70 | | 6 (15) | | 0 (0) | |
| GATA-3 | <10 | 41 | 40 (98) | 28 | 1 (3) | < 0,001 |
| | 10-70 | | 1 (2) | | 12 (43) | |
| | >70 | | 0 (0) | | 15 (54) | |
| EGFR | <10 | 43 | 8 (19) | 27 | 27 (100) | < 0,001 |
| | 10-70 | | 23 (53) | | 0 (0) | |
| | >70 | | 12 (28) | | 0 (0) | |

$p < 0.05$ est statistiquement significatif

Tableau X Comparaison des carcinomes mammaires de haut grade de phénotype basal et de bas grade pour l'intensité des cellules tumorales positives pour le marqueur du potentiel métastatique MMP-3

| Marqueur | Intensité des cellules positives | n | Phénotype basal n (%) | n | Bas grade n (%) | valeur p |
|----------|----------------------------------|----|-----------------------|----|-----------------|----------|
| MMP-3 | | 41 | | 17 | | 0,552 |
| | 0-1 | | 3 (7) | | 2 (12) | |
| | 1-2 | | 26 (64) | | 9 (53) | |
| | 2-3 | | 12 (29) | | 6 (35) | |

$p < 0.05$ est statistiquement significatif

Tableau XI Comparaison des carcinomes mammaires de phénotype basal et luminal A pour le pourcentage de cellules tumorales positives pour les différents marqueurs du potentiel métastatique

| Marqueurs | Pourcentage de cellules positives | n | Phénotype basal n (%) | n | Luminal A n (%) | valeur <i>p</i> |
|-------------|-----------------------------------|----|-----------------------|----|-----------------|-----------------|
| Ki-67 | <10 | 43 | 0 (0) | 34 | 3 (9) | < 0,001 |
| | 10-70 | | 28 (65) | | 28 (82) | |
| | >70 | | 15 (35) | | 3 (9) | |
| p53 | <10 | 43 | 22 (51) | 34 | 30 (88) | 0,105 |
| | 10-70 | | 1 (2) | | 2 (6) | |
| | >70 | | 20 (47) | | 2 (6) | |
| CD276 | <10 | 39 | 11 (28) | 32 | 21 (66) | 0,003 |
| | 10-70 | | 16 (41) | | 7 (22) | |
| | >70 | | 12 (31) | | 4 (12) | |
| Galectine-7 | <10 | 41 | 21 (51) | 34 | 34 (100) | < 0,001 |
| | 10-70 | | 14 (34) | | 0 (0) | |
| | >70 | | 6 (15) | | 0 (0) | |
| GATA-3 | <10 | 41 | 40 (98) | 34 | 5 (15) | < 0,001 |
| | 10-70 | | 1 (2) | | 20 (59) | |
| | >70 | | 0 (0) | | 9 (26) | |
| EGFR | <10 | 43 | 8 (19) | 34 | 34 (100) | < 0,001 |
| | 10-70 | | 23 (53) | | 0 (0) | |
| | >70 | | 12 (28) | | 0 (0) | |

p < 0.05 est statistiquement significatif

Tableau XII Comparaison des carcinomes mammaires de phénotype basal et luminal A pour l'intensité des cellules tumorales positives pour le marqueur du potentiel métastatique MMP-3

| Marqueur | Intensité des cellules positives | n | Phénotype basal n (%) | n | Luminal A n (%) | valeur <i>p</i> |
|----------|----------------------------------|----|-----------------------|----|-----------------|-----------------|
| MMP-3 | 0-1 | 41 | 3 (7) | 15 | 4 (27) | 0,103 |
| | 1-2 | | 26 (64) | | 7 (46) | |
| | 2-3 | | 12 (29) | | 4 (27) | |
| | | | | | | |

p < 0.05 est statistiquement significatif

Tableau XIII Comparaison des carcinomes mammaires de phénotype basal et surexprimant HER-2 pour le pourcentage de cellules tumorales positives pour les différents marqueurs du potentiel métastatique

| Marqueurs | Pourcentage de cellules positives | n | Phénotype basal n (%) | n | HER-2 n (%) | valeur <i>p</i> |
|-------------|-----------------------------------|----|-----------------------|----|-------------|-----------------|
| Ki-67 | <10 | 43 | 0 (0) | 32 | 0 (0) | 0,052 |
| | 10-70 | | 28 (65) | | 26 (81) | |
| | >70 | | 15 (35) | | 6 (19) | |
| p53 | <10 | 43 | 22 (51) | 33 | 20 (61) | 0,446 |
| | 10-70 | | 1 (2) | | 5 (15) | |
| | >70 | | 20 (47) | | 8 (24) | |
| CD276 | <10 | 39 | 11 (28) | 31 | 9 (29) | 0,762 |
| | 10-70 | | 16 (41) | | 15 (48) | |
| | >70 | | 12 (31) | | 7 (23) | |
| Galectine-7 | <10 | 41 | 21 (51) | 30 | 25 (83) | 0,003 |
| | 10-70 | | 14 (34) | | 4 (13) | |
| | >70 | | 6 (15) | | 1 (3) | |
| GATA-3 | <10 | 41 | 40 (98) | 33 | 21 (64) | < 0,001 |
| | 10-70 | | 1 (2) | | 11 (33) | |
| | >70 | | 0 (0) | | 1 (3) | |
| EGFR | <10 | 43 | 8 (19) | 32 | 21 (66) | < 0,001 |
| | 10-70 | | 23 (53) | | 4 (12) | |
| | >70 | | 12 (28) | | 7 (22) | |

$p < 0.05$ est statistiquement significatif

Tableau XIV Comparaison des carcinomes mammaires de phénotype basal et surexprimant HER-2 pour l'intensité des cellules tumorales positives pour le marqueur du potentiel métastatique MMP-3

| Marqueur | Intensité des cellules positives | n | Phénotype basal n (%) | n | HER-2 n (%) | valeur <i>p</i> |
|----------|----------------------------------|----|-----------------------|----|-------------|-----------------|
| MMP-3 | 0-1 | 41 | 3 (7) | 14 | 2 (14) | 0,235 |
| | 1-2 | | 26 (64) | | 11 (79) | |
| | 2-3 | | 12 (29) | | 1 (7) | |
| | | | | | | |

$p < 0.05$ est statistiquement significatif

Tableau XV Comparaison des carcinomes mammaires canauxaux de phénotype basal et médullaires typiques pour le pourcentage de cellules tumorales positives pour les différents marqueurs du potentiel métastatique

| Marqueurs | Pourcentage de cellules positives | n | Phénotype basal n (%) | n | Médullaire typique n (%) | valeur p |
|-------------|-----------------------------------|----|-----------------------|----|--------------------------|----------|
| Ki-67 | <10 | 43 | 0 (0) | 11 | 0 (0) | 0,087 |
| | 10-70 | | 28 (65) | | 5 (45) | |
| | >70 | | 15 (35) | | 6 (55) | |
| p53 | <10 | 43 | 22 (51) | 11 | 4 (36) | 0,473 |
| | 10-70 | | 1 (2) | | 1 (9) | |
| | >70 | | 20 (47) | | 6 (55) | |
| CD276 | <10 | 39 | 11 (28) | 11 | 5 (45) | 0,227 |
| | 10-70 | | 16 (41) | | 5 (45) | |
| | >70 | | 12 (31) | | 1 (10) | |
| Galectine-7 | <10 | 41 | 21 (51) | 11 | 10 (91) | 0,036 |
| | 10-70 | | 14 (34) | | 1 (9) | |
| | >70 | | 6 (15) | | 0 (0) | |
| GATA-3 | <10 | 41 | 40 (98) | 11 | 11 (100) | 0,460 |
| | 10-70 | | 1 (2) | | 0 (0) | |
| | >70 | | 0 (0) | | 0 (0) | |
| EGFR | <10 | 43 | 8 (19) | 11 | 4 (36) | 0,255 |
| | 10-70 | | 23 (53) | | 5 (46) | |
| | >70 | | 12 (28) | | 2 (18) | |

$p < 0.05$ est statistiquement significatif

Tableau XVI Comparaison des carcinomes mammaires canauxaux de phénotype basal et médullaires typiques pour l'intensité des cellules tumorales positives pour le marqueur du potentiel métastatique MMP-3

| Marqueur | Intensité des cellules positives | n | Phénotype basal n (%) | n | Médullaire typique n (%) | valeur p |
|----------|----------------------------------|----|-----------------------|----|--------------------------|----------|
| MMP-3 | 0-1 | 41 | 3 (7) | 11 | 0 (0) | 0,006 |
| | 1-2 | | 26 (64) | | 3 (27) | |
| | 2-3 | | 12 (29) | | 8 (73) | |
| | | | | | | |

$p < 0.05$ est statistiquement significatif

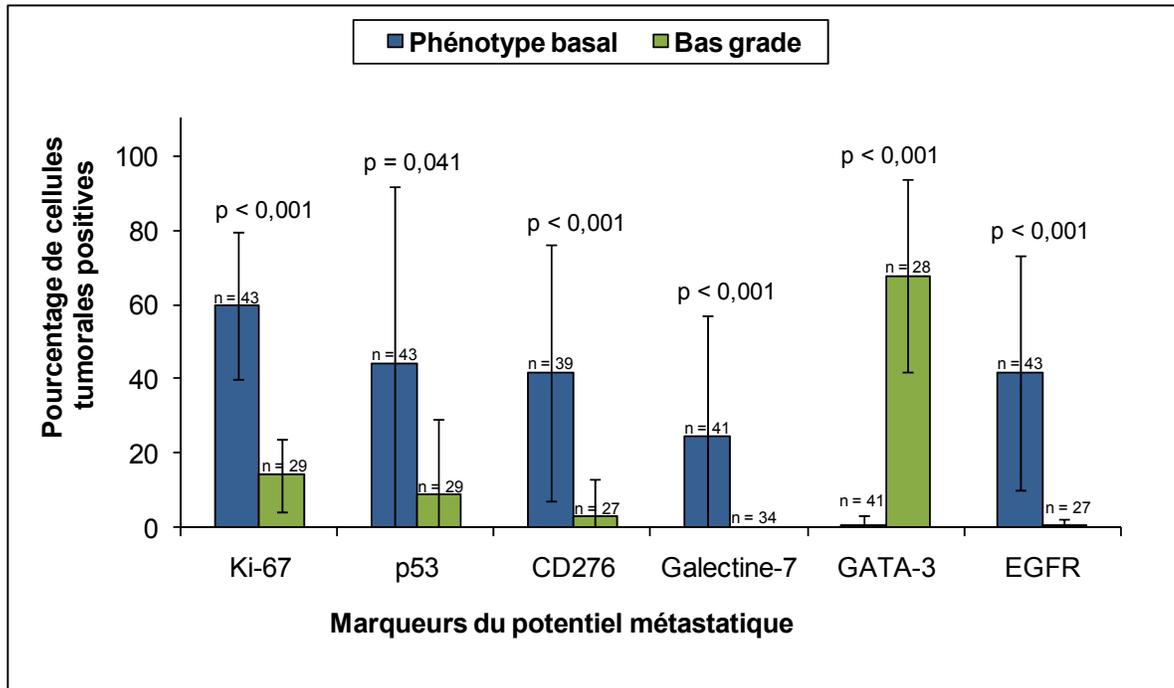


Figure 29. Moyenne du pourcentage de cellules tumorales positives pour les différents marqueurs du potentiel métastatique pour les carcinomes mammaires de haut grade de phénotype basal et de bas grade. Valeur \pm l'erreur standard de la moyenne.

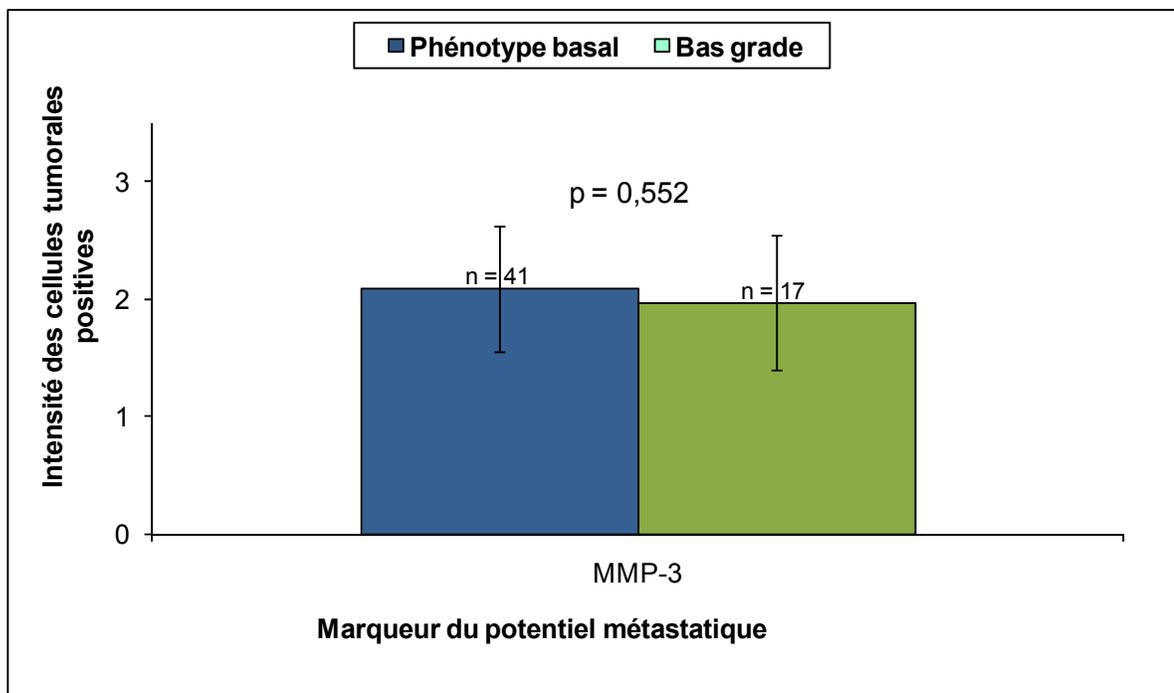


Figure 30. Moyenne de l'intensité des cellules tumorales positives pour le marqueur du potentiel métastatique MMP-3 pour les carcinomes mammaires de haut grade de phénotype basal et de bas grade. Valeur \pm l'erreur standard de la moyenne.

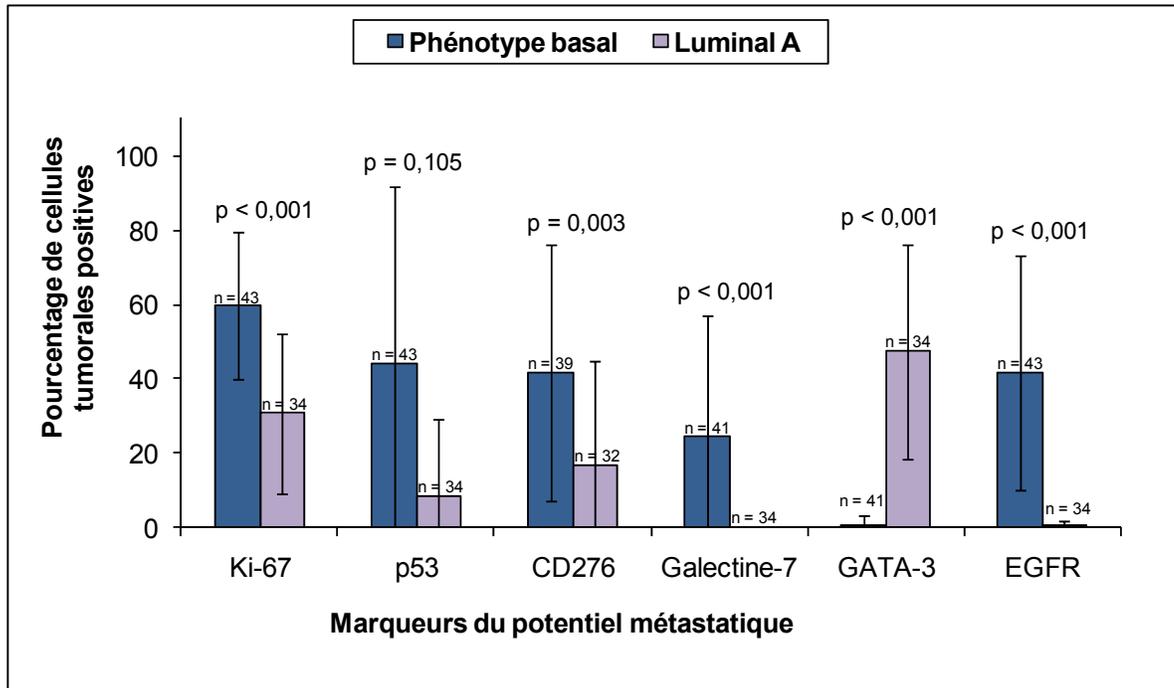


Figure 31. Moyenne du pourcentage de cellules tumorales positives pour les différents marqueurs du potentiel métastatique pour les carcinomes mammaires de phénotype basal et luminal A. Valeur \pm l'erreur standard de la moyenne.

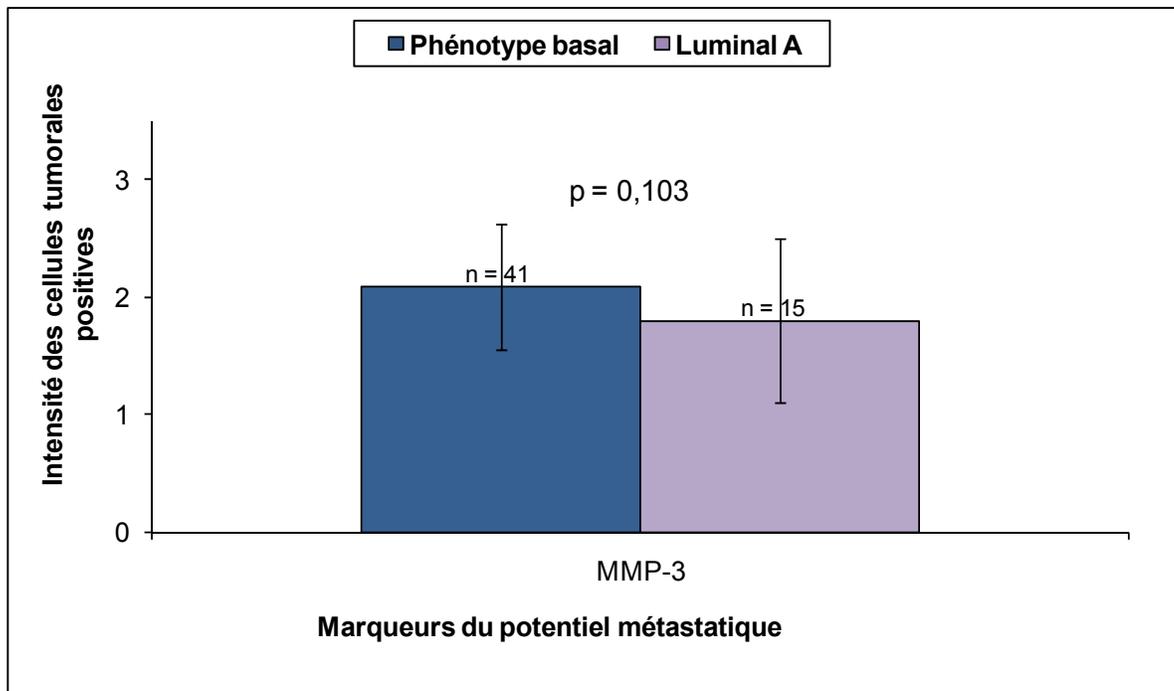


Figure 32. Moyenne de l'intensité des cellules tumorales positives pour le marqueur du potentiel métastatique MMP-3 pour les carcinomes mammaires de phénotype basal et luminal A. Valeur \pm l'erreur standard de la moyenne.

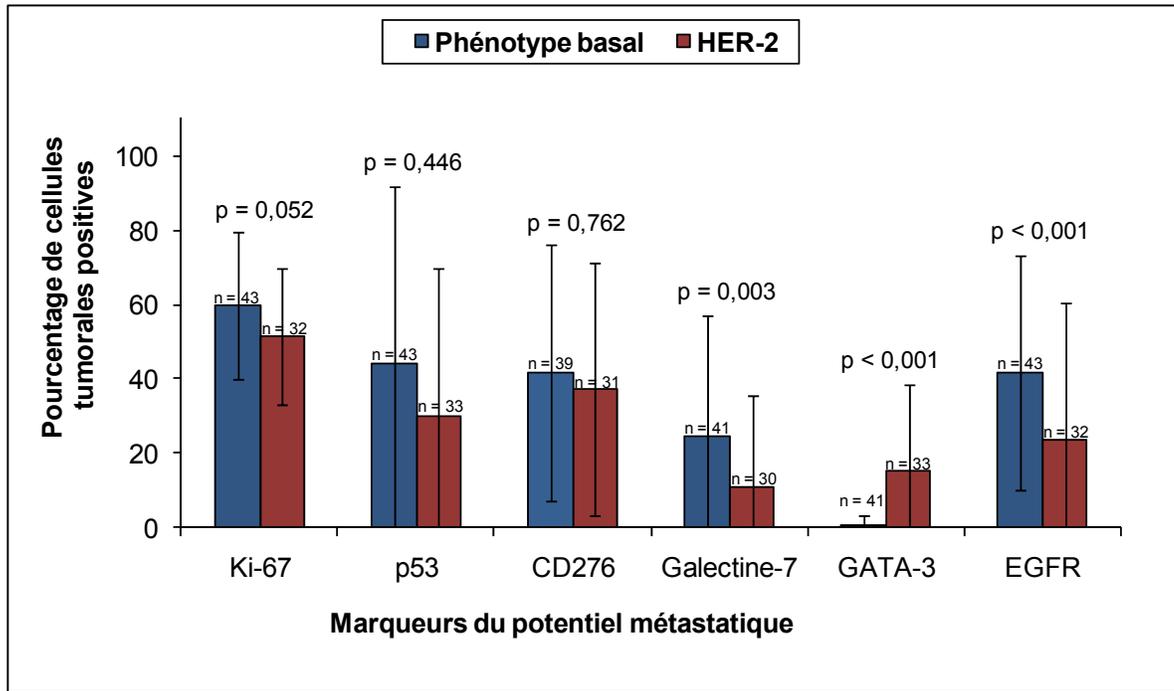


Figure 33. Moyenne du pourcentage de cellules tumorales positives pour les différents marqueurs du potentiel métastatique pour les carcinomes mammaires de phénotype basal et surexprimant HER-2. Valeur \pm l'erreur standard de la moyenne.

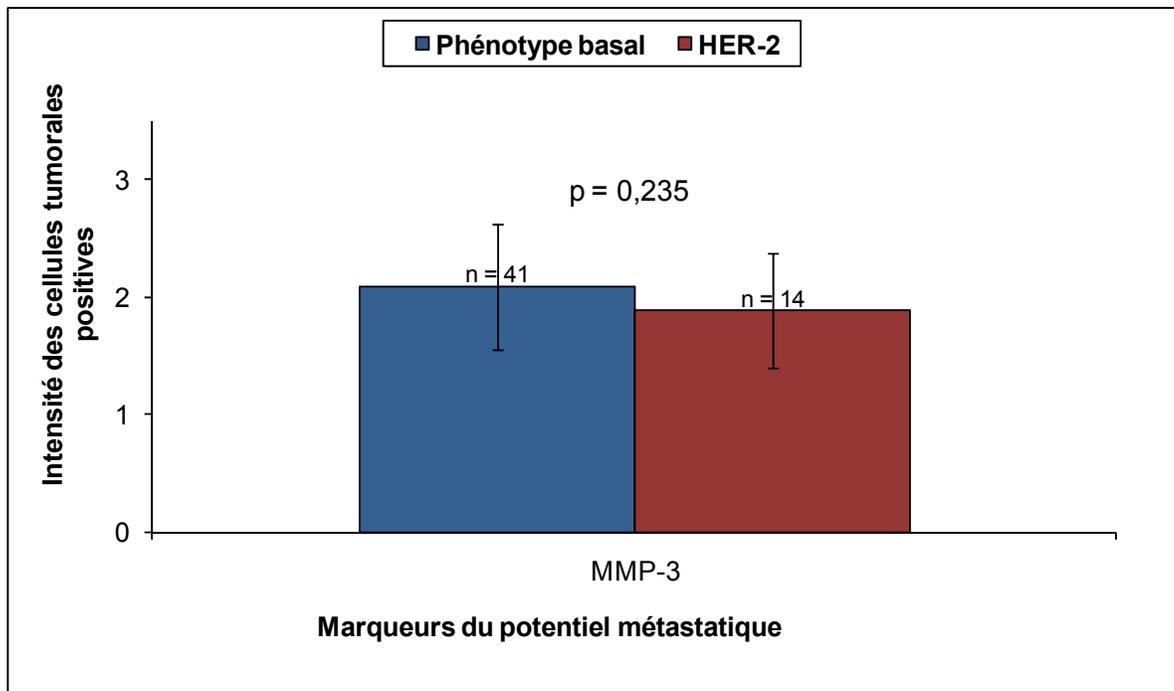


Figure 34. Moyenne de l'intensité des cellules tumorales positives pour le marqueur du potentiel métastatique MMP-3 pour les carcinomes mammaires de phénotype basal et surexprimant HER-2. Valeur \pm l'erreur standard de la moyenne.

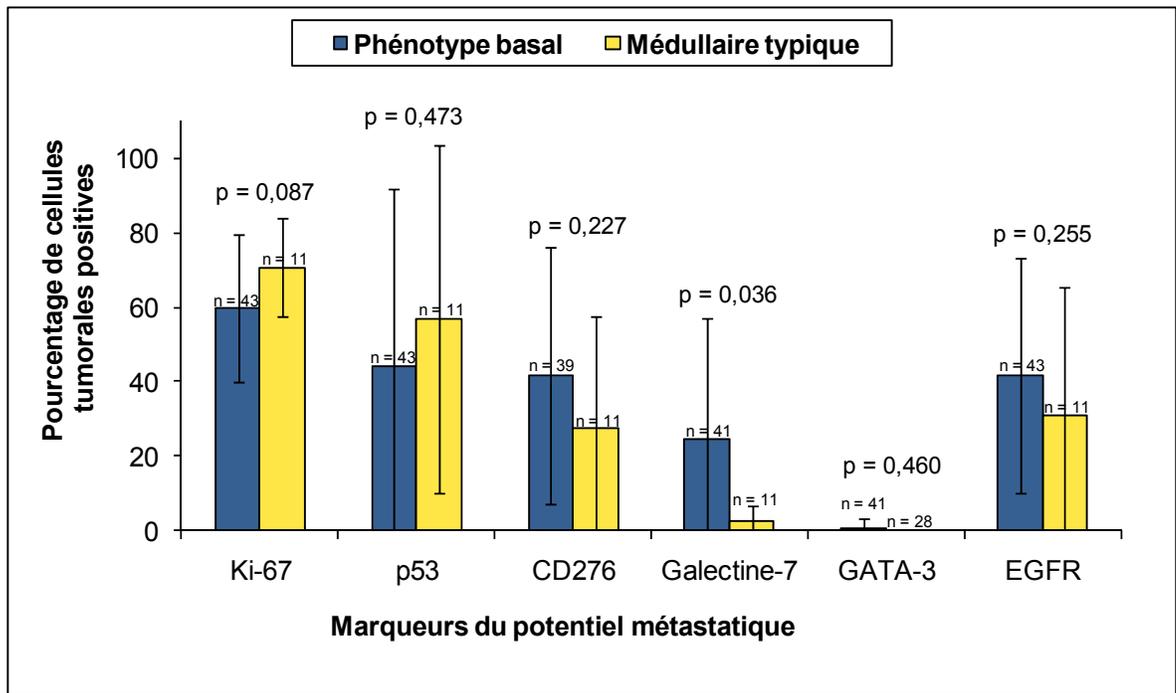


Figure 35. Moyenne du pourcentage de cellules tumorales positives pour les différents marqueurs du potentiel métastatique pour les carcinomes mammaires canaux de phénotype basal et médullaires typiques. Valeur \pm l'erreur standard de la moyenne.

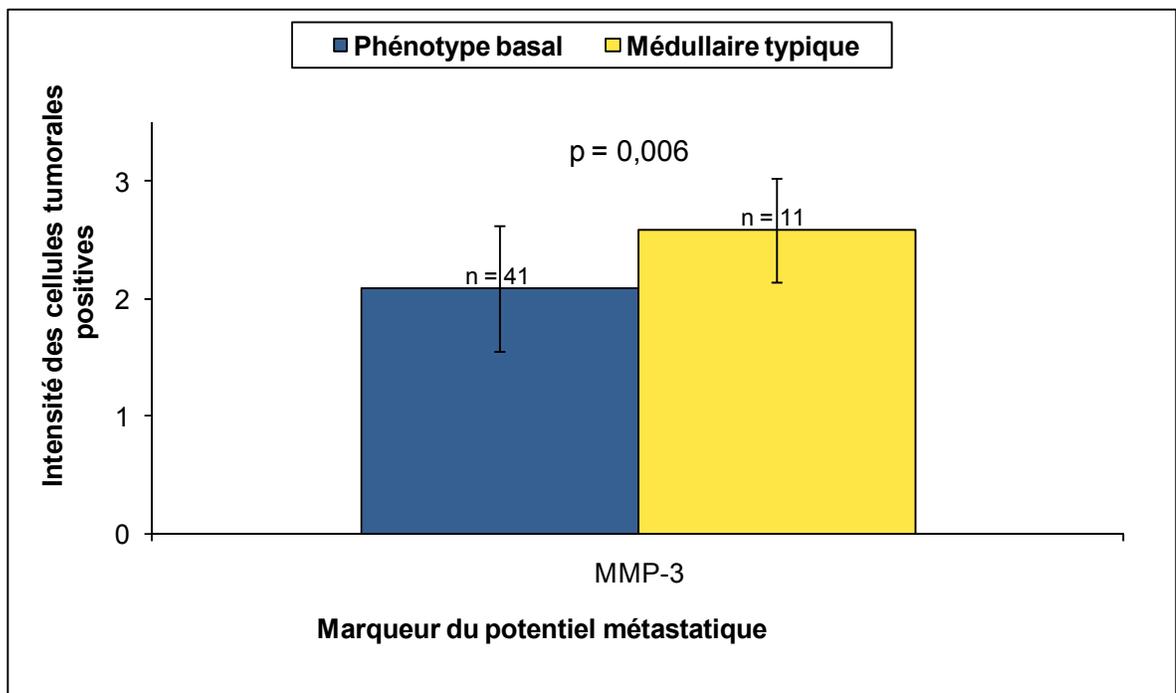


Figure 36. Moyenne de l'intensité des cellules tumorales positives pour le marqueur du potentiel métastatique MMP-3 pour les carcinomes mammaires canaux de phénotype basal et médullaires typiques. Valeur \pm l'erreur standard de la moyenne.

DISCUSSION

La classification des cancers du sein par profil d'expression génique permet d'identifier, parmi le groupe hétérogène que constitue les carcinomes infiltrants du sein, quelques sous-groupes ayant chacun une physionomie particulière : luminal A, luminal B, phénotype normal, HER-2 et phénotype basal. Ce dernier se distingue des autres sous-groupes par l'expression coordonnée de gènes normalement retrouvés dans les cellules épithéliales basales de la glande mammaire (Perou *et al*, 2000). Les carcinomes qui expriment un phénotype basal comportent le plus souvent un mauvais pronostic (Sorlie *et al*, 2001). Les métastases viscérales, cérébrales et pulmonaires, assombrissent le pronostic et demeurent la cause principale de mortalité chez les personnes atteintes par ce type de cancer (Luck *et al*, 2008) (Patanaphan *et al*, 1988). Cette étude vise à mieux caractériser les carcinomes mammaires de phénotype basal par la mesure de l'expression de marqueurs normalement associés au processus métastatique. Les marqueurs associés à la métastase sont légion et pour des raisons pratiques, nous avons dû nous limiter aux marqueurs les plus robustes ou, à tout le moins, ceux qui semblaient les plus prometteurs : Ki-67, p53, CD276, galectine-7, GATA-3, EGFR et MMP-3. À terme, l'identification des voies métaboliques impliquées dans le développement des carcinomes de phénotype basal aura un impact déterminant pour proposer de nouvelles cibles thérapeutiques, lesquelles font cruellement défaut pour l'instant.

I. Les carcinomes mammaires de phénotype basal

La sélection des tumeurs de phénotype basal a été effectuée en fonction des critères immunohistochimiques proposés par Nielsen *et al* (2004). En bref, la définition

opérationnelle du carcinome basal repose sur des critères négatifs et positifs: absence d'expression des récepteurs oestrogéniques (ER) et de la protéine HER-2, mais présence des cytokératines de type basal CK5/6 et/ou du récepteur membranaire tyrosine-kinase EGFR. Une fois les cas sélectionnés, en fonction de ces critères essentiels, nous avons souhaité ajouter deux autres marqueurs du cancer du sein, les récepteurs de progestérone (PR) et la CK14.

De fait, les récepteurs de progestérone font complètement défaut dans les carcinomes mammaires de phénotype basal. Pour cette raison, Cheang *et al* (2008) suggèrent aussi de l'ajouter à la liste de Nielsen *et al* (2004). Par ailleurs, comme les cytokératines de masse moléculaire élevée sont aussi associées au phénotype basal, nous avons voulu inclure la CK14, un marqueur des cellules épithéliales basales de la glande mammaire de plus en plus utilisé en clinique (Perou *et al*, 2000) (Sorlie *et al*, 2001). L'absence de consensus international crée une certaine confusion quant au meilleur marqueur des kératines basales, c'est-à-dire CK5/6 ou CK14, pour définir le plus exactement possible ce type de cancer; c'est pourquoi nous avons souhaité les inclure tous deux. Nos résultats indiquent que les CK5/6 sont plus souvent exprimées que la CK14, suggérant que ce dernier est moins sensible que le marqueur CK5/6.

Tous les carcinomes mammaires de phénotype basal expriment le marqueur de prolifération cellulaire Ki-67. Dans les faits, 65% des tumeurs montrent une expression modérée de Ki-67 et les autres (35%) affichent un marquage nucléaire intense. Nos résultats s'accordent donc avec ceux de Spitale *et al* (2009). Une hausse du niveau d'expression du marqueur Ki-67 semble bien indiquer une activation des molécules impliquées dans l'entrée et le maintien de la cellule dans le cycle cellulaire. Cette observation est corroborée par d'autres

études qui établissent clairement qu'un index mitotique très élevé est présent dans les carcinomes de type basal (Da Silva *et al*, 2007). Bien que le rôle exact de cette molécule ne soit pas encore complètement élucidé, on l'utilise souvent en clinique comme facteur de mauvais pronostic associé à un haut taux de récurrences et à une réduction de la survie (Urruticoechea *et al*, 2005) (de Azambuja *et al*, 2007). Nos résultats montrent donc une association non-équivoque entre le marqueur Ki-67 et les cancers mammaires de phénotype basal. Il est probable qu'une prolifération cellulaire soutenue puisse causer une augmentation du taux d'erreurs dans la réplication de l'ADN et ainsi, favoriser l'émergence de nouvelles mutations et la sélection de clones plus agressifs.

L'étude de Sorlie *et al* est la première étude à avoir démontré une fréquence élevée de mutations de p53 dans les carcinomes de phénotype basal (Sorlie *et al*, 2001). Des études ultérieures ont confirmé cette association (Bergamaschi *et al*, 2006) (Langerod *et al*, 2007) (Manié *et al*, 2009). Nos propres résultats indiquent qu'environ la moitié des tumeurs de phénotype basal accumulent la protéine dans le noyau de la cellule, ce qui traduit une inactivation de la protéine, quelle qu'en soit la cause (mutation ou autre mécanisme d'inactivation). Fait digne de mention, lorsque la protéine p53 s'accumule dans le noyau de la cellule, l'ensemble des cellules tumorales semblent touchées. La technique d'immunohistochimie évalue l'accumulation de p53 mutée dans les noyaux des cellules tumorales. Une fréquence plus élevée de mutations, inactivatrices du gène *TP53* a déjà été rapportée. Notre outil de mesure se limite à vérifier dans le noyau l'accumulation de p53. Les cancers du sein de phénotype basal qui contiennent une forme mutée de p53, soit environ la moitié de ces tumeurs, pourraient acquérir un avantage prolifératif, et accumuler de nouvelles mutations (Borresen-Dale, 2003).

L'étude du marqueur CD276 dans les sous-types du cancer du sein apporte des données nouvelles. La fonction de cette protéine, dans une lignée de cellules tumorales mammaires, a fait l'objet d'une étude de Chen *et al.* Lors de la cascade métastatique, CD276 joue un rôle dans l'adhésion cellulaire tumorale, la migration et l'invasion, sans affecter pour autant la prolifération cellulaire (Chen *et al.*, 2008). Nos résultats indiquent que la protéine membranaire CD276 est fréquemment exprimée dans les cancers du sein de phénotype basal (72%). Ce marqueur suscite un intérêt évident puisque son association au carcinome de type basal s'accorde avec son rôle pro-métastatique.

L'étude de Jones *et al.* (2004) a permis d'identifier le gène de la *galectine-7* comme marqueur spécifique des cellules épithéliales basales de la glande mammaire. Nos travaux confirment son expression exclusive dans l'assise basale des canaux et lobules mammaires. Jusqu'à ce jour, cette description n'avait jamais été rapportée dans la littérature. Lors de l'évaluation de l'expression génique des carcinomes mammaires par Perou *et al.* (2000), une association entre le gène de la *galectine-7* et le sous-type phénotype basal a été observée. Nos résultats confirment cette association en montrant que la protéine *galectine-7* est présente dans 49% des carcinomes mammaires de phénotype basal. Récemment, nous avons démontré que la *galectine-7* pouvait contrôler la dissémination des cellules tumorales mammaires aux poumons et aux os (résultats non publiés, voir annexe). L'activation de la MMP-9, retrouvée dans les lymphomes (Demers *et al.*, 2005), n'a pu être démontrée, cependant, par notre équipe de recherche (données non montrées). La fonction de la *galectine-7* dans le processus métastatique du cancer du sein fait toujours l'objet d'investigations.

GATA-3 est un marqueur des cellules épithéliales luminales de la glande mammaire. Dans les faits, un défaut d'expression de la protéine GATA-3 s'observe dans les cellules tumorales de phénotype basal. Nos résultats corroborent ainsi les résultats de l'étude de Sorlie *et al* (2001) qui indique une association entre l'expression de cette protéine et celle des récepteurs oestrogéniques. De plus, Mehra *et al* (2005) ont démontré une corrélation entre la baisse des niveaux de GATA-3 et un défaut d'expression des récepteurs hormonaux, ce qui caractérise, en partie, le sous-type phénotype basal. Les propriétés antimétastatiques de ce marqueur luminal ont été décrites par Kouros-Mehr *et al* (2008) : en bref, il y a diminution de GATA-3 dans les cellules tumorales essaimées à distance et l'absence de métastases lors de la restauration de cette protéine dans un carcinome avancé. L'absence de ce facteur transcriptionnel dans les cellules tumorales de phénotype basal s'accorde avec la perte de l'effet antimétastatique conféré par cette protéine. Dans ce contexte, l'activation de GATA-3 dans le cancer du sein pourrait théoriquement exercer un effet bénéfique.

Notre étude montre une expression d'EGFR dans une grande majorité des carcinomes mammaires de phénotype basal (81%). Cette association s'accorde avec les données de la littérature. Ce sont Nielsen et collaborateurs qui ont identifié EGFR comme marqueur spécifique pour ce sous-type (Nielsen *et al*, 2004). Des études ultérieures ont confirmé cette association (Livasy *et al*, 2006) (Hoadley *et al*, 2007) (Nalwoga *et al*, 2008). Ce récepteur joue un rôle majeur dans l'ensemble du processus métastatique. Son expression dans le cancer du sein concerne principalement la prolifération et la survie cellulaire. Dans l'étude de Xue *et al* (2006), d'autres fonctions lui sont attribuées : intravasation, motilité cellulaire et chimiotaxisme par EGF. La fréquence élevée de l'expression d'EGFR dans les carcinomes mammaires de phénotype basal suggère qu'il facilite la dissémination tumorale.

De plus, cet antigène est une cible de choix pour les traitements anticancéreux. L'anticorps monoclonal cetuximab (Erbix; ImClone Systems Incorporated et Bristol-Myers Squibb Company, New-York, NY) et l'inhibiteur de tyrosine kinase gefitinib (Iressa; AstraZeneca Pharmaceuticals, LP, Wilmington, DE) se retrouvent parmi les thérapies les plus intéressantes (Herbst, 2004). Bien mieux, la sensibilité des lignées de cellules du cancer du sein de phénotype basal à ces deux types de traitements a été démontrée par Hoadley *et al* (2007).

L'intensité de la MMP-3 au sein des cellules tumorales de phénotype basal est le plus souvent modérée (64% des carcinomes), bien que 29% de ces carcinomes l'expriment à de hauts niveaux. Cette étude suggère une corrélation entre le phénotype basal et l'intensité du marquage immunohistochimique de la MMP-3. La littérature ne cite aucune étude évaluant l'expression de cette métalloprotéase dans les différents sous-types du cancer du sein. Cependant, un rôle dans l'invasion et dans la dissémination des cellules tumorales mammaires au cerveau a été rapporté (Lochter *et al*, 1997) (Mendes *et al*, 2005). Il est à noter que le cerveau est un site métastatique privilégié pour les carcinomes de type basal, ce qui pourrait impliquer la MMP-3 (Luck *et al*, 2008).

I.1 Comparaison par rapport aux carcinomes mammaires de bas grade

Les tumeurs de bas grade sont bien différenciées, connaissent une évolution lente et ne forment que rarement des métastases (Elston et Ellis, 1991). Notre étude évaluait aussi les tumeurs de bas grade quant à l'expression des différents marqueurs de la métastase. Le faible potentiel métastatique de ces cancers devrait se refléter par une diminution de l'expression de ces marqueurs.

Les caractéristiques du cancer du sein de bas grade chevauchent celles du sous-type luminal A (Badve et Nakshatri, 2009). Nos résultats le confirment, car tous les carcinomes expriment les récepteurs oestrogéniques. De plus, 68% de ceux-ci expriment également les récepteurs de progestérone, tandis qu'aucune de ces tumeurs ne surexprime la protéine HER-2. En ce qui a trait aux cytokératines de masse moléculaire élevée (CK5/6 et CK14), elles sont généralement absentes des cancers du sein de bas grade, contrairement aux carcinomes de haut grade de phénotype basal.

Les données récentes indiquent une corrélation positive entre l'expression du marqueur Ki-67 et le grade histologique des cancers mammaires (Urruticoechea *et al*, 2005). Il est à noter que l'index mitotique fait partie intégrante du grade SBR-EE. Nos résultats abondent dans le même sens puisque 31% de ces carcinomes n'expriment pas Ki-67, tandis que 69% de ceux-ci l'expriment. La différence d'expression de cette protéine est statistiquement significative entre les carcinomes mammaires de bas grade et de haut grade de phénotype basal. Cette faible expression de Ki-67 au sein des tumeurs de bas grade suggère que cette protéine exerce un rôle dans la cascade métastatique.

L'accumulation de la protéine p53, inactivée ou mutée, dans les tumeurs de bas grade est le plus souvent absente (79%), ce qui les distingue du sous-type phénotype basal. Nos résultats concordent avec l'étude de Done *et al* (2001) qui identifie l'absence de mutations de cette protéine dans tous les cancers du sein de bas grade, comparativement aux différents niveaux d'expression observés dans les cancers de haut grade. Fait à noter, ces résultats diffèrent légèrement des nôtres de par l'inclusion de carcinomes canauxaires *in situ*. Notre étude suggère que p53 mutée favorise la formation des métastases.

Le marqueur CD276 est également absent dans la plupart des cancers du sein de bas grade (85%), ce qui tranche avec la fréquence élevée d'expression de cette protéine dans les carcinomes mammaires de phénotype basal (72%). Suite à ces observations, CD276 pourrait être impliqué dans le potentiel métastatique décrit par Chen *et al* (2008).

L'expression de la galectine-7 fait complètement défaut dans les cancers du sein de bas grade. Dans les faits, notre étude suggère que cette protéine est un marqueur de l'agressivité et, possiblement, du potentiel métastatique. L'expression de la galectine-7 est donc corrélée avec le sous-type phénotype basal lorsque comparée aux carcinomes mammaires de bas grade.

Nos résultats démontrent l'expression du facteur de transcription GATA-3 dans la majorité des tumeurs de bas grade (97%). Ces observations s'accordent avec celles de la littérature soulignant la coexpression des récepteurs oestrogéniques et de GATA-3 (Sorlie *et al*, 2001). Ainsi, l'effet antimétastatique de GATA-3, décrit par Kouros-Mehr *et al* (2008), pourrait être présent dans le cancer du sein de bas grade.

Aucun carcinome de bas grade n'exprime le récepteur membranaire tyrosine kinase EGFR. Des résultats identiques ont été rapportés par Nalwoga *et al* (2008). Nos travaux montrent que cette protéine n'est pas associée aux carcinomes peu agressifs, ce qui corrobore l'étude démontrant l'association de ce récepteur à l'ensemble du processus métastatique (Xue *et al*, 2006). L'association d'EGFR et du sous-type phénotype basal est précisée par nos résultats.

L'intensité du marquage immunohistochimique de MMP-3, dans les cellules tumorales de bas grade, comporte une similarité avec le phénotype basal. Une intensité modérée se

retrouve dans 53% des carcinomes, bien que 35% des carcinomes l'expriment fortement. Comparativement à tous les autres marqueurs de la métastase de cette étude, MMP-3 n'est pas sous-exprimée dans les cancers du sein de bas grade par rapport au sous-type phénotype basal. Suite à ces observations, MMP-3 ne semble pas être un marqueur robuste de la métastase en dépit des travaux de Lochter *et al* (1997) et de Mendes *et al* (2005).

I.2 Comparaison par rapport aux carcinomes mammaires luminal A

Ce sous-type d'expression génique du cancer du sein est associé à un meilleur pronostic et à la réponse à l'hormonothérapie (Badve et Nakshatri, 2009). La présente étude vise à comparer l'expression des différents marqueurs du potentiel métastatique pour ce sous-type par rapport au cancer du sein de phénotype basal.

Les cancers du sein de haut grade luminal A se caractérisent par la présence des marqueurs des cellules épithéliales luminales de la glande mammaire (Perou *et al*, 2000). Nos critères de sélection, pour ce sous-type, consistent en une forte expression des récepteurs oestrogéniques et en l'absence de la surexpression de la protéine HER-2. La quantification des récepteurs de progestérone démontre que 62% de ces tumeurs les expriment. De plus, aucun des carcinomes mammaires luminal A n'exprime les cytokératines de masse moléculaire élevée, CK5/6 et CK14.

Nos résultats montrent une expression principalement modérée de Ki-67 au sein des tumeurs luminal A (82%), ce qui s'accorde avec les données de la littérature (Badve et Nakshatri, 2009). L'étude de Bhargava *et al* (2009) met en évidence une faible expression de Ki-67 dans ce cancer du sein (environ 16%). Dans les faits, cette étude inclut aussi des

carcinomes mammaires de bas grade, ce qui diminue considérablement le pourcentage de noyaux marqués (30%), selon nos travaux. Notre étude souligne la différence d'expression de Ki-67 entre le sous-type luminal A et phénotype basal, ce qui suggère un plus grand potentiel prolifératif pour ce dernier.

La mutation de p53 est pratiquement absente dans le cancer du sein luminal A puisque seulement 12% des cas présentent une accumulation de la protéine. Bien qu'il y ait une différence d'expression entre les carcinomes mammaires luminal A et de phénotype basal, où l'on retrouve une forte expression de cette protéine dans 47% des cas, elle n'est pas statistiquement significative. L'étude de Sorlie *et al* (2001) montre des résultats similaires en ce qui a trait au sous-type luminal A. Par contre, l'observation de ces mutations dans les carcinomes mammaires de phénotype basal est beaucoup plus élevée (82%). L'utilisation de la méthode de séquençage du gène *TP53* est beaucoup plus spécifique pour évaluer les mutations. Cette technique permettrait probablement d'observer davantage de mutations dans le sous-type phénotype basal, dans notre étude. La réaction immunohistochimique utilisée dans le cancer du sein ne montre pas une telle association.

La protéine membranaire CD276 n'est exprimée que dans 34% des cancers luminal A, ce qui tranche avec la fréquence élevée dans les cancers de phénotype basal (72%). Ces résultats suggèrent donc un plus grand potentiel pour certaines étapes de la cascade métastatique (adhésion, migration, invasion) (Chen *et al*, 2008) dans le sous-type phénotype basal.

Tout comme les carcinomes mammaires de bas grade, le cancer du sein de haut grade luminal A ne possède pas la galectine-7. Fait à noter, la galectine-7 est présente

exclusivement dans les cellules épithéliales basales de la glande mammaire, tandis que le sous-type luminal A n'exprime que les gènes des cellules épithéliales luminales. Ce marqueur se retrouve exclusivement dans le sous-type basal, ce qui pourrait indiquer un plus grand potentiel métastatique pour ces cancers.

Nos résultats appuient la littérature en ce qui a trait à l'association de la protéine GATA-3 et du sous-type luminal A puisque 85% des cas l'expriment. Selon l'étude de Sorlie *et al* (2001), cette protéine fait partie intégrante de ce sous-type d'expression génique.

EGFR fait complètement défaut dans les cellules tumorales luminal A. Ce résultat s'accorde avec l'étude de Livasy *et al* (2006). L'association entre ce marqueur et le sous-type phénotype basal est ainsi confirmée. En ce qui a trait à la métastase, plusieurs étapes de cette cascade (prolifération, survie, intravasation, motilité et chimioattraction) (Xue *et al*, 2006) semblent dépendre de l'expression d'EGFR.

L'intensité du marquage de la MMP-3, dans les cellules tumorales luminal A, correspond au sous-type phénotype basal : 46% des cas montrent une intensité modérée du marquage, tandis que 27% des cas possèdent une forte intensité. Selon cette étude, l'expression de la MMP-3 ne peut être associée exclusivement au sous-type phénotype basal.

I.3 Comparaison par rapport aux carcinomes mammaires surexprimant HER-2

Le cancer du sein HER-2 positif possède, tout comme les carcinomes mammaires de phénotype basal, un mauvais pronostic (Slamon *et al*, 1987). Par contre, ce pronostic peut s'améliorer par l'utilisation de la thérapie anti-HER-2, nommée trastuzumab (Herceptin;

Genentech, San Francisco, CA) (Slamon *et al*, 2001). Dans cette étude, nous avons voulu évaluer si le sous-type phénotype basal possède un plus grand potentiel métastatique que le sous-type HER-2 de par l'expression des marqueurs de la métastase.

La sélection du sous-type HER-2 consiste en la présence d'un marquage membranaire intense (3+) et circonférentiel de la protéine dans au moins 70% des cellules tumorales. Certaines tumeurs expriment les récepteurs oestrogéniques (21%) et les récepteurs de progestérone (9%). Les récepteurs hormonaux y sont exprimés modérément. Un défaut d'expression des CK5/6 et CK14 se retrouve dans ce sous-type. Cette observation permet de confirmer une association distincte entre ces cytokératines et le cancer du sein de phénotype basal.

Un marquage modéré de Ki-67 s'observe dans la majorité des cancers du sein HER-2 positif (81%), tandis que les autres carcinomes expriment fortement ce marqueur (19%). Selon les résultats de Rudolph *et al* (1999), une moyenne des cellules tumorales positives pour le marqueur Ki-67 d'environ 33% est associée au sous-type HER-2. De plus, une étude récente, comparable à la nôtre, montre que 63% de ces cancers du sein possèdent un index prolifératif élevé, c'est-à-dire que plus de 20% des cellules expriment Ki-67 (Spitale *et al*, 2009). Nos résultats suggèrent une association plus forte entre la prolifération cellulaire et les carcinomes mammaires HER-2 positifs avec une moyenne des cellules tumorales possédant Ki-67 d'environ 50%. Bien que nous démontrons cette association, la différence d'expression de ce marqueur est statistiquement significative lorsque les sous-types HER-2 et phénotype basal sont comparés. Ce dernier possède donc un taux prolifératif plus élevé qui pourrait être propice à la dissémination métastatique.

L'expression de la protéine p53 mutée dans le cancer du sein HER-2 positif est plutôt variable puisque 61% des cas sont négatifs, 15% des cas ont une expression modérée et 24% expriment fortement cette protéine. Nos résultats ne présentent pas le même taux de mutations de p53 au sein des carcinomes surexprimant HER-2 que dans l'étude de Sorlie *et al* (2001) qui indique une fréquence plus élevée des mutations de la protéine dans ces cancers (71%). Les mêmes observations ont été décrites par Langerod *et al* (2007). En accord avec la littérature, notre étude montre que les mutations de p53 peuvent être associées aux sous-types HER-2 et phénotype basal, ce qui ne les distingue pas quant à l'avantage prolifératif que peut conférer l'inactivation de la protéine.

La protéine CD276 peut également être associée aux carcinomes mammaires qui surexpriment HER-2 puisque la majorité des tumeurs (71%) possèdent cet antigène. Cette expression est semblable à celle retrouvée dans les cellules tumorales de phénotype basal. Ce marqueur d'intérêt du processus métastatique, récemment découvert (Chen *et al*, 2008), implique une forte association avec les deux sous-types du cancer du sein les plus agressifs : HER-2 et phénotype basal.

Dans le cancer du sein HER-2 positif, la galectine-7 est principalement absente (83%), ce qui le distingue du cancer de type basal. Suite à ces résultats, la galectine-7 s'avère presque exclusivement exprimée par les carcinomes mammaires de phénotype basal. La dissémination métastatique pourrait être facilitée par la présence de cette protéine dans ce sous-type d'expression génique.

L'expression de GATA-3 est observée dans le sous-type HER-2 (36%), ce qui ne concorde pas avec l'étude de Mehra *et al* (2005) qui montre une diminution de ce marqueur luminal

lors d'une surexpression de la protéine HER-2. Nos résultats diffèrent puisque nos critères de sélection ne consistent pas en l'absence des récepteurs oestrogéniques, associés à GATA-3 (Sorlie *et al*, 2001), contrairement aux critères utilisés dans les autres études. Ces observations impliquent donc une différence d'expression de cette protéine entre le cancer du sein HER-2 positif et de phénotype basal. La diminution de la dissémination des cellules tumorales par ce facteur de transcription, décrite par Kouros-Mehr *et al* (2008), pourrait être présente dans le sous-type HER-2, mais non dans le carcinome de phénotype basal.

Le marqueur EGFR est absent dans 66% des tumeurs mammaires surexprimant HER-2. Ces tumeurs ont une expression modérée de cette protéine dans 12% des cas et forte dans 22% des cas. Ces résultats sont semblables à ceux obtenus par Livasy *et al* (2006), c'est-à-dire que 42% des carcinomes HER-2 positifs expriment EGFR. Dans notre étude, puisque plus de la moitié des carcinomes HER-2 positifs sont négatifs pour ce marqueur, il y a une différence statistiquement significative avec la présence de cette protéine au sein du cancer de phénotype basal. De ce fait, le sous-type d'expression génique basale est unique par sa fréquence élevée pour l'expression d'EGFR. Ce résultat suggère un plus grand potentiel métastatique pour ce cancer du sein de par la présence de ce marqueur qui est au cœur de la métastase (Xue *et al*, 2006).

L'intensité du marquage de MMP-3 dans les carcinomes HER-2 positifs est semblable aux deux autres sous-types de cancer du sein, c'est-à-dire principalement modérée (79%). Le marqueur MMP-3 est donc exprimé dans toutes les cellules tumorales avec une intensité généralement modérée, sans être associée au grade ou à un sous-type de cancer du sein en particulier.

I.4 Comparaison aux carcinomes mammaires médullaires typiques

Le cancer du sein médullaire typique possède un phénotype agressif selon l'expression ou non de certaines protéines. De façon surprenante, cette maladie confère un bon pronostic chez les patientes atteintes. Les métastases sont également rares pour ce type histologique (Robbins et Cotran, 2005). Cette étude vise à comparer l'expression des différents marqueurs de la cascade métastatique entre les carcinomes mammaires de phénotype basal et médullaire typique. Pour ce dernier, une plus faible expression d'un marqueur pourrait suggérer un rôle plus important dans le processus de la métastase.

Suite au diagnostic posé par le pathologiste, nous avons seulement sélectionné les carcinomes triples négatifs, c'est-à-dire qui n'exprimaient pas ER, PR et HER-2 (Eichhorn, 2004). En ce qui a trait aux CK5/6, un défaut d'expression est le plus souvent retrouvé dans les cancers médullaires typiques (64%), ce qui tranche avec les carcinomes mammaires de phénotype basal. Cette observation confirme l'association exclusive entre les CK5/6 et le sous-type phénotype basal. De plus, la majeure partie des cancers médullaires typiques n'expriment la CK14 (90%), ce qui indique également une association spécifique de cette cytokératine au cancer de phénotype basal.

La protéine Ki-67 est exprimée de façon modérée dans 45% des carcinomes mammaires médullaires typiques et fortement dans 55% des cas. Lors de la comparaison de l'expression de ce marqueur de prolifération cellulaire entre le sous-type phénotype basal et le cancer médullaire typique, une différence statistiquement significative a été observée. Les tumeurs médullaires typiques montrent une plus forte association à la protéine Ki-67.

Nos résultats concordent avec l'étude de Jacquemier *et al* (2005). La prolifération cellulaire serait donc plus importante dans le cancer médullaire typique.

L'accumulation de p53 mutée dans les cellules tumorales médullaires typiques montre une similarité avec le cancer de phénotype basal : l'expression y est négative dans 36% des cas et forte dans 55% des cas. Selon l'étude de Cremoux *et al* (1999), la mutation de p53 est présente dans toutes les tumeurs médullaires typiques (100%). Tout comme pour les carcinomes mammaires de phénotype basal, une diminution du nombre de tumeurs quantifiées s'explique par l'absence d'accumulation de la protéine lorsque des mutations surviennent. Pour le type histologique médullaire, 36% des cas pourraient posséder cette protéine mutée sans avoir d'accumulation visible. Le séquençage du gène *TP53* est nécessaire pour donner suite à l'association de ce marqueur au sous-type phénotype basal et au cancer médullaire typique.

Le marqueur CD276 est exprimé dans 55% des cancers du sein médullaires typiques, ce qui ne le distingue pas des cancers de phénotype basal. Ce type histologique est donc de nouveau associé à un marqueur d'agressivité, tout comme le sous-type d'expression génique basale.

La galectine-7 y est particulièrement intéressante puisque 91% des carcinomes mammaires médullaires typiques n'expriment pas cette protéine. Un seul cas présente un taux de 12% de cellules tumorales positives pour ce marqueur. Cette étude montre que la galectine-7 est un marqueur exclusif pour les carcinomes mammaires canaux de phénotype basal. De plus, elle suggère un rôle primordial pour cette protéine dans la cascade métastatique puisque qu'elle ne se retrouve pas dans le type histologique médullaire typique, ce dernier

possédant un bon pronostic, tout en exprimant les marqueurs de l'agressivité du cancer du sein.

Aucune des tumeurs médullaires typiques ne possède le facteur de transcription GATA-3. Ce résultat est pratiquement identique à celui retrouvé dans le cancer du sein de phénotype basal. L'étude de Mehra *et al* (2005) démontre une corrélation positive entre l'absence des récepteurs oestrogéniques et la diminution de GATA-3 au sein des tumeurs. Considérant que, selon nos critères de sélection, les récepteurs oestrogéniques sont absents du type histologique médullaire typique et du sous-type phénotype basal, nos résultats concordent avec cette étude. De plus, cette corrélation ne se limite non seulement à la diminution de GATA-3, mais aussi à sa totale absence au sein de ces tumeurs. Suite à ces observations, l'effet antimétastatique conféré par ce facteur de transcription (Kouros-Mehr *et al*, 2008) serait absent dans les cancers du sein médullaires typiques et de phénotype basal.

L'expression d'EGFR dans le type histologique médullaire typique (64% des cas) est également similaire au sous-type phénotype basal. L'étude de Jacquemier *et al* (2005) a permis d'observer l'expression d'EGFR au sein des cancers médullaires typiques dans une proportion de 71% des cas, ce qui s'accorde avec nos résultats. L'association entre ce récepteur membranaire tyrosine kinase et le sous-type phénotype basal est également identifiée pour le cancer du sein médullaire typique.

Aucun des cancers médullaires typiques possèdent une faible expression de MMP-3. La majorité de ces tumeurs expriment fortement cette métalloprotéase (73%). Lors de la comparaison de ces cancers aux tumeurs de phénotype basal, la différence d'expression de MMP-3 s'est avérée statistiquement significative. De fait, une plus forte intensité de cette

protéine est davantage associée au type histologique médullaire typique. Dans la présente étude, l'association entre MMP-3 et l'agressivité tumorale n'a pu être confirmée. L'intensité de cette métalloprotéase est donc seulement corrélée au cancer médullaire typique.

CONCLUSIONS

En conclusion, nous avons étudié cinq marqueurs du potentiel métastatique et vérifié leur expression dans les carcinomes mammaires de phénotype basal.

La prolifération cellulaire quantifiée à l'aide du marqueur Ki-67 est plus fréquente dans le cancer du sein de phénotype basal que dans les autres sous-types de carcinomes.

L'expression d'EGFR, est aussi fréquemment observée dans les carcinomes canauxaires de phénotype basal. L'absence de ce marqueur de la métastase dans les cancers du sein de bas grade et dans les cancers de haut grade luminal A, ainsi que son expression plus faible pour le sous-type HER-2, confirme la spécificité de cette protéine pour le sous-type basal. Le potentiel métastatique y serait donc plus élevé puisque EGFR est un acteur majeur dans les différentes étapes de la cascade métastatique. Suite à cette association, les différents traitements anticancéreux visant cette protéine sont à considérer pour ce cancer du sein.

Nos travaux indiquent aussi une absence d'expression de GATA-3 exclusive au cancer du sein de phénotype basal. Fait à noter, il n'y aurait donc aucun effet antimétastatique conféré par GATA-3, comparativement au sous-type luminal A et HER-2. Il serait intéressant de vérifier l'effet d'une surexpression du facteur GATA-3 dans les cellules du cancer du sein de phénotype basal sur l'apparition des métastases.

Le marqueur membranaire CD276, dans notre étude, s'est révélé particulièrement intéressant dans la mesure où l'on a observé l'expression de cette protéine dans deux des

sous-types tumoraux les plus agressifs : HER-2 et phénotype basal. Les différentes fonctions de CD276 dans le cancer du sein devront être élucidées avant d'espérer pouvoir l'utiliser dans le traitement du cancer du sein.

Enfin, le marqueur qui a suscité le plus d'intérêt, dans la présente étude, est sans contredit la galectine-7. Cette molécule est non seulement associée au sous-type phénotype basal, mais elle est complètement absente des carcinomes mammaires de bas grade et de haut grade luminal A. De plus, on ne la retrouve que très peu dans le sous-type HER-2 et dans les cancers de type histologique médullaire typique. Bien mieux, dans le sein normal, la protéine ne se retrouve que dans le compartiment des cellules épithéliales basales. Les résultats obtenus suggèrent un rôle important pour la galectine-7, non seulement dans les cancers de sous-type phénotype basal, mais aussi dans les cellules de la couche basale. Son rôle dans le contrôle de la dissémination métastatique doit certainement faire l'objet d'autres études avant d'envisager une utilisation en clinique.

Nos travaux confirment donc le potentiel métastatique plus élevé des carcinomes de type basal et proposent des pistes intéressantes pour l'expliquer.

Comme notre étude ne concerne qu'un petit nombre d'échantillons tumoraux, il y a un intérêt évident à poursuivre nos travaux en élargissant la cohorte de patientes atteintes du cancer du sein.

BIBLIOGRAPHIE

- Badve S & Nakshatri H (2009) Oestrogen-receptor-positive breast cancer: towards bridging histopathological and molecular classifications. *J Clin Pathol*, **62**: 6-12.
- Banerjee S, Reis-Filho JS, Ashley S, Steele D, Ashworth A, Lakhani SR & Smith IE (2006) Basal-like breast carcinomas: clinical outcome and response to chemotherapy. *J Clin Pathol*, **59**: 729-735.
- Barondes SH, Castronovo V, Cooper DNW, Cummings RD, Drickamer K, Felzi T, Gitt M A, Hirabayashi J, Hughes C, Kasai Ki, Leffler H, Liu FT, Lotan R, Mercurio AM, Monsigny M, Pillai S, Poirer F, Raz A, Rigby PWJ, Rini JM & Wang JL (1994) Galectins: A family of animal beta-galactoside-binding lectins. *Cell*, **76**: 597-598.
- Bergamaschi A, Kim YH, Wang P, Sorlie T, Hernandez-Boussard T, Lonning PE, Tibshirani R, Børresen-Dale AL & Pollack JR (2006) Distinct patterns of DNA copy number alteration are associated with different clinicopathological features and gene-expression subtypes of breast cancer. *Genes, Chromosomes and Cancer*, **45**: 1033-1040.
- Bhargava R, Striebel J, Beriwal S, Flickinger JC, Onisko A, Ahrendt G, Dabbs DJ (2009) Prevalence, morphologic features and proliferation indices of breast carcinoma molecular classes using immunohistochemical surrogate markers. *Int J Clin Exp Pathol*, **2**: 444-455.
- Borresen-Dale AL (2003) TP53 and breast cancer. *Human Mutation*, **21**: 292-300.
- Brenton JD, Carey LA, Ahmed AA & Caldas C (2005) Molecular Classification and Molecular Forecasting of Breast Cancer: Ready for Clinical Application? *J Clin Oncol*, **23**: 7350-7360.

- Carey LA, Perou CM, Livasy CA, Dressler LG, Cowan D, Conway K, Karaca G, Troester MA, Tse CK, Edmiston S, Deming SL, Geradts J, Cheang MCU, Nielsen TO, Moorman PG, Earp HS & Millikan RC (2006) Race, Breast Cancer Subtypes, and Survival in the Carolina Breast Cancer Study. *JAMA*, **295**: 2492-2502.
- Castriconi R, Dondero A, Augugliaro R, Cantoni C, Carnemolla B, Sementa AR, Negri F, Conte R, Corrias MV, Moretta L, Moretta A & Bottino C (2004) Identification of 4Ig-B7-H3 as a neuroblastoma-associated molecule that exerts a protective role from an NK cell-mediated lysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **101**: 12640-12645.
- Chapoval AI, Ni J, Lau JS, Wilcox RA, Flies DB, Liu D, Dong H, Sica GL, Zhu G, Tamada K & Chen L (2001) B7-H3: A costimulatory molecule for T cell activation and IFN- γ production. *Nat Immunol*, **2**: 269-274.
- Cheang MCU, Voduc D, Bajdik C, Leung S, McKinney S, Chia SK, Perou CM & Nielsen TO (2008) Basal-Like Breast Cancer Defined by Five Biomarkers Has Superior Prognostic Value than Triple-Negative Phenotype. *Clin Cancer Res*, **14**: 1368-1376.
- Chen YW, Tekle C, Fodstad O (2008) The immunoregulatory protein human B7H3 is a tumor-associated antigen that regulates tumor cell migration and invasion. *Curr Cancer Drug Targets*, **8**: 404-413.
- Collett K, Stefansson IM, Eide J, Braaten A, Wang H, Eide GE, Thoresen SO, Foulkes WD & Akslen LA (2005) A Basal Epithelial Phenotype Is More Frequent in Interval Breast Cancers Compared with Screen Detected Tumors. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **14**: 1108-1112.
- Da Silva L, Clarke C & Lakhani SR (2007) Demystifying basal-like breast carcinomas. *J Clin Pathol*, **60**: 1328-1332.
- Davis RJ (2000) Signal Transduction by the JNK Group of MAP Kinases. *Cell*, **103**: 239-252.

- de Azambuja E, Cardoso F, de Castro G, Jr, Colozza M, Mano MS, Durbecq V, Sotiriou C, Larsimont D, Piccart-Gebhart MJ & Paesmans M (2007) Ki-67 as prognostic marker in early breast cancer: a meta-analysis of published studies involving 12,155 patients. *Br J Cancer*, **96**: 1504-1513.
- de Cremoux P, Salomon AV, Liva S, Dendale R, Bouchind'homme B, Martin E, Sastre-Garau X, Magdelenat H, Fourquet A & Soussi T (1999) p53 Mutation as a Genetic Trait of Typical Medullary Breast Carcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.*, **91**: 641-643.
- Demers M, Magnaldo T & St-Pierre Y (2005) A Novel Function for Galectin-7: Promoting Tumorigenesis by Up-regulating MMP-9 Gene Expression. *Cancer Res*, **65**: 5205-5210.
- Demers M, Biron-Pain K, Hebert J, Lamarre A, Magnaldo T & St-Pierre Y (2007) Galectin-7 in Lymphoma: Elevated Expression in Human Lymphoid Malignancies and Decreased Lymphoma Dissemination by Antisense Strategies in Experimental Model. *Cancer Res*, **67**: 2824-2829.
- Done SJ, Eskandarian S, Bull S, Redston M & Andrulis IL (2001) p53 Missense Mutations in Microdissected High-Grade Ductal Carcinoma In Situ of the Breast. *J. Natl. Cancer Inst.*, **93**: 700-704.
- Duffy MJ, Maguire TM, Hill A, McDermott E & O'Higgins N (2000) Metalloproteinases: role in breast carcinogenesis, invasion and metastasis. *Breast Cancer Res*, **2**: 252 - 257.
- Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (1998) Tamoxifen for early breast cancer: an overview of the randomised trials. *The Lancet*, **351**: 1451-1467.
- Eichhorn JH (2004) Medullary carcinoma, provocative now as then. *Semin Diagn Pathol*, **21**: 65-73.

- Elston CW & Ellis IO (1991) Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology*, **19**: 403-410.
- Faratian D, Munro A, Twelves C & Bartlett JM (2009) Membranous and cytoplasmic staining of Ki67 is associated with HER2 and ER status in invasive breast carcinoma. *Histopathology*, **54**: 254-257.
- Foulkes WD, Stefansson IM, Chappuis PO, Begin LR, Goffin JR, Wong N, Trudel M & Akslen LA (2003) Germline BRCA1 Mutations and a Basal Epithelial Phenotype in Breast Cancer. *J. Natl. Cancer Inst.*, **95**: 1482-1485.
- Fulford LG, Reis-Filho JS, Ryder K, Jones C, Gillett CE, Hanby A, Easton D, Lakhani SR (2007) Basal-like grade III invasive ductal carcinoma of the breast: patterns of metastasis and long-term survival. *Breast Cancer Res*, **9**: R4
- Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker H, Schwab U & Stein H (1984) Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol*, **133**: 1710-1715.
- Herbst RS (2004) Review of epidermal growth factor receptor biology. *International Journal of Radiation Oncology*Biology*Physics*, **59**: S21-S26.
- Ho IC, Pai SY (2007) GATA-3 - not just for Th2 cells anymore. *Cell Mol Immunol*, **4**: 15-29.
- Hoadley K, Weigman V, Fan C, Sawyer L, He X, Troester M, Sartor C, Rieger-House T, Bernard P, Carey L & Perou C (2007) EGFR associated expression profiles vary with breast tumor subtype. *BMC Genomics*, **8**: 258.

- Jacquemier J, Padovani L, Rabayrol L, Lakhani SR, Penault-Llorca F, Denoux Y, Fiche M, Figueiro P, Maisongrosse V, Ledoussal V, Penuela JM, Udvarhely N, Makdissi GE, Ginestier C, Geneix J, Charafe-Jauffret E, Xerri L, Eisinger F, Sobol DBH, The European Working Group for Breast Screening Pathology, the Breast Cancer Linkage Consortium & Sobol H (2005) Typical medullary breast carcinomas have a basal/myoepithelial phenotype. *The Journal of Pathology*, **207**: 260-268.
- Jones C, Mackay A, Grigoriadis A, Cossu A, Reis-Filho JS, Fulford L, Dexter T, Davies S, Bulmer K, Ford E, Parry S, Budroni M, Palmieri G, Neville AM, O'Hare MJ & Lakhani SR (2004) Expression Profiling of Purified Normal Human Luminal and Myoepithelial Breast Cells: Identification of Novel Prognostic Markers for Breast Cancer. *Cancer Res*, **64**: 3037-3045.
- Kim MJ, Ro JY, Ahn SH, Kim HH, Kim SB & Gong G (2006) Clinicopathologic significance of the basal-like subtype of breast cancer: a comparison with hormone receptor and Her2/neu-overexpressing phenotypes. *Human Pathology*, **37**: 1217-1226.
- Kopitz J, Andre S, von Reitzenstein C, Versluis K, Kaltner H, Pieters RJ, Wasano K, Kuwabara I, Liu FT, Cantz M, Heck AJR & Gabius HJ (2003) Homodimeric galectin-7 (p53-induced gene 1) is a negative growth regulator for human neuroblastoma cells. *Oncogene*, **22**: 6277-6288.
- Kossakowska AE, Hinek A, Edwards DR, Lim MS, Zhang CL, Breitman DR, Prusinkiewicz C, Stabbler AL, Urbanski LS, Urbanski SJ (1998) Proteolytic activity of human non-Hodgkin's lymphomas. *Am J Pathol*, **152**: 565-576.
- Kouros-Mehr H, Slorach EM, Sternlicht MD & Werb Z (2006) GATA-3 Maintains the Differentiation of the Luminal Cell Fate in the Mammary Gland. *Cell*, **127**: 1041-1055.
- Kouros-Mehr H, Bechis SK, Slorach EM, Littlepage LE, Egeblad M, Ewald AJ, Pai SY, Ho IC & Werb Z (2008) GATA-3 Links Tumor Differentiation and Dissemination in a Luminal Breast Cancer Model. *Cancer Cell*, **13**: 141-152.

- Lakhani SR & O'Hare MJ (2001) The mammary myoepithelial cell : Cinderella or ugly sister? *Breast Cancer Research*, **3**: 1-4.
- Lane DP & Fischer PM (2004) Turning the key on p53. *Nature*, **427**: 789-790.
- Langerod A, Zhao H, Borgan O, Nesland J, Bukholm I, Ikdahl T, Karesen R, Borresen-Dale AL & Jeffrey S (2007) TP53 mutation status and gene expression profiles are powerful prognostic markers of breast cancer. *Breast Cancer Research*, **9**: R30.
- Livasy CA, Karaca G, Nanda R, Tretiakova MS, Olopade OI, Moore DT & Perou CM (2006) Phenotypic evaluation of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Mod Pathol*, **19**: 264-271.
- Lochter A, Srebrow A, Sympton CJ, Terracio N, Werb Z & Bissell MJ (1997) Misregulation of Stromelysin-1 Expression in Mouse Mammary Tumor Cells Accompanies Acquisition of Stromelysin-1-dependent Invasive Properties. *J. Biol. Chem.*, **272**: 5007-5015.
- Lord CJ, McDonald S, Swift S, Turner NC & Ashworth A (2008) A high-throughput RNA interference screen for DNA repair determinants of PARP inhibitor sensitivity. *DNA Repair*, **7**: 2010-2019.
- Lu J, Pei H, Kaeck M & Thompson HJ (1997) Gene expression changes associated with chemically induced rat mammary carcinogenesis. *Molecular Carcinogenesis*, **20**: 204-215.
- Luck AA, Evans AJ, Green AR, Rakha EA, Paish C & Ellis IO (2008) The Influence of Basal Phenotype on the Metastatic Pattern of Breast Cancer. *Clinical Oncology*, **20**: 40-45.

- Luo L, Chapoval AI, Flies DB, Zhu G, Hirano F, Wang S, Lau JS, Dong H, Tamada K, Flies AS, Liu Y & Chen L (2004) B7-H3 Enhances Tumor Immunity In Vivo by Costimulating Rapid Clonal Expansion of Antigen-Specific CD8+ Cytolytic T Cells. *J Immunol*, **173**: 5445-5450.
- Lupu CM, Eisenbach C, Kuefner MA, Schmidt J, Lupu AD, Stremmel W & Encke J (2006) An Orthotopic Colon Cancer Model for Studying the B7-H3 Antitumor Effect In Vivo. *Journal of Gastrointestinal Surgery*, **10**: 635-645.
- Madsen P, Rasmussen HH, Flint T, Gromov P, Kruse TA, Honoré B, Vorum H & Celis JE (1995) Cloning, Expression, and Chromosome Mapping of Human Galectin-7. *J. Biol. Chem.*, **270**: 5823-5829.
- Man YG & Sang QX (2004) The significance of focal myoepithelial cell layer disruptions in human breast tumor invasion: a paradigm shift from the 'protease-centered' hypothesis. *Exp Cell Res*, **301**: 103-118.
- Manié E, Vincent-Salomon A, Lehmann-Che J, Pierron G, Turpin E, Warcoin M, Gruel N, Lebigot I, Sastre-Garau X, Lidereau R, Remenieras A, Feunteun J, Delattre O, de The H, Stoppa-Lyonnet D & Stern MH (2009) High Frequency of TP53 Mutation in BRCA1 and Sporadic Basal-like Carcinomas but not in BRCA1 Luminal Breast Tumors. *Cancer Res*, **69**: 663-671.
- Mauri D, Pavlidis N, Polyzos NP & Ioannidis JPA (2006) Survival With Aromatase Inhibitors and Inactivators Versus Standard Hormonal Therapy in Advanced Breast Cancer: Meta-analysis. *J. Natl. Cancer Inst.*, **98**: 1285-1291.
- Mendes O, Kim HT & Stoica G (2005) Expression of MMP2, MMP9 and MMP3 in Breast Cancer Brain Metastasis in a Rat Model. *Clinical and Experimental Metastasis*, **22**: 237-246.

- Mehra R, Varambally S, Ding L, Shen R, Sabel MS, Ghosh D, Chinnaiyan AM & Kleer CG (2005) Identification of GATA3 as a Breast Cancer Prognostic Marker by Global Gene Expression Meta-analysis. *Cancer Res*, **65**: 11259-11264.
- Moyano JV, Evans JR, Chen F, Lu M, Werner ME, Yehiely F, Diaz LK, Turbin D, Karaca G, Wiley E, Nielsen TO, Perou CM & Cryns VL (2006) AlphaB-Crystallin is a novel oncoprotein that predicts poor clinical outcome in breast cancer. *The Journal of Clinical Investigation*, **116**: 261-270.
- Nalwoga H, Arnes JB, Wabinga H, Akslen LA (2008) Expression of EGFR and c-kit is associated with the basal-like phenotype in breast carcinomas of African women. *APMIS*, **116**: 515-525.
- Nicholson S, Richard J, Sainsbury C, Halcrow P, Kelly P, Angus B, Wright C, Henry J, Farndon JR, Harris AL (1991) Epidermal growth factor receptor (EGFr); results of a 6 year follow-up study in operable breast cancer with emphasis on the node negative subgroup. *Br J Cancer*, **63**: 146-150.
- Nielsen TO, Hsu FD, Jensen K, Cheang M, Karaca G, Hu Z, Hernandez-Boussard T, Livasy C, Cowan D, Dressler L, Akslen LA, Ragaz J, Gown AM, Gilks CB, Van De Rijn M & Perou CM (2004) Immunohistochemical and Clinical Characterization of the Basal-Like Subtype of Invasive Breast Carcinoma. *Clin Cancer Res*, **10**: 5367-5374.
- Pakkiri P, Lakhani SR & Smart CE (2009) Current and future approach to the pathologist's assessment for targeted therapy in breast cancer. *Pathology*, **41**: 89 - 99.
- Patanaphan V, Salazar OM & Risco R (1988) Breast Cancer: Metastatic Patterns and Their Prognosis. *Southern Medical Journal*, **81**: 1109-1112.
- Perou CM., Sorlie T, Eisen MB, Van De Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen LA, Fluge O, Pergamenschikov A, Williams C, Zhu SX, Lonning PE, Borresen-Dale AL, Brown PO & Botstein D (2000) Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, **406**: 747-752.

- Rabinovich GA (1999) Galectins: an evolutionarily conserved family of animal lectins with multifunctional properties; a trip from the gene to clinical therapy. *Cell Death Differ*, **8**: 711-721.
- Rakha E & Reis-Filho J (2009) Basal-like Breast Carcinoma: From Expression Profiling to Routine Practice. *Arch Pathol Lab Med*, **133**: 860-868.
- Ridolfi RL, Rosen PP, Port A, Kinne D & Miké V (1977) Medullary carcinoma of the breast. *A clinicopathologic study with 10 year follow-up. Cancer*, **40**: 1365-1385.
- Robbins & Cotran (2005) Pathologic basis of disease, 7^e édition, Elsevier Saunders, Pennsylvanie, 1525 pages.
- Rodriguez-Pinilla SM, Sarrío D, Moreno-Bueno G, Rodriguez-Gil Y, Martínez MA, Hernández L, Hardisson D, Reis-Filho JS & Palacios J (2007) Sox2: a possible driver of the basal-like phenotype in sporadic breast cancer. *Mod Pathol*, **20**: 474-481.
- Ross JS, Fletcher JA, Bloom KJ, Linette GP, Stec J, Symmans WF, Pusztai L & Hortobagyi GN (2004) Targeted Therapy in Breast Cancer: The HER-2/neu Gene and Protein. *Mol Cell Proteomics*, **3**: 379-398.
- Roth TJ, Sheinin Y, Lohse CM, Kuntz SM, Frigola X, Inman BA, Krambeck AE, Mckenney ME, Karnes RJ, Blute ML, Cheville JC, Sebo TJ & Kwon ED (2007) B7-H3 Ligand Expression by Prostate Cancer: A Novel Marker of Prognosis and Potential Target for Therapy. *Cancer Res*, **67**: 7893-7900.
- Rudolph P, Olsson H, Bonatz G, Ratjen V, Bolte H, Baldetorp B, Fernö M, Parwaresch R & Alm P (1999) Correlation between p53, c-erbB-2, and topoisomerase IIalpha expression, DNA ploidy, hormonal receptor status and proliferation in 356 node-negative breast carcinomas: prognostic implications. *The Journal of Pathology*, **187**: 207-216.

- Schlüter C, Duchrow M, Wohlenberg C, Becker M, Key G, Flad H & Gerdes J (1993) The cell proliferation-associated antigen of antibody Ki-67: a very large, ubiquitous nuclear protein with numerous repeated elements, representing a new kind of cell cycle-maintaining proteins. *J. Cell Biol.*, **123**: 513-522.
- Silverstein MJ (2000) Ductal carcinoma in situ of the breast. *Annu Rev Med*, **51**: 17-32.
- Slamon D, Clark G, Wong S, Levin W, Ullrich A & Mcguire W (1987) Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science*, **235**: 177-182.
- Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, Fleming T, Eiermann W, Wolter J, Pegram M, Baselga J & Norton L (2001) Use of Chemotherapy plus a Monoclonal Antibody against HER2 for Metastatic Breast Cancer That Overexpresses HER2. *N Engl J Med*, **344**: 783-792.
- Comité directeur de la Société canadienne du cancer : Statistiques canadiennes sur le cancer 2009. Toronto : Société canadienne du cancer, 2009. www.cancer.ca
- Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, Hastie T, Eisen MB, Van De Rijn M, Jeffrey SS, Thorsen T, Quist H, Matese JC, Brown PO, Botstein D, Lonning PE & Borresen-Dale AL (2001) Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **98**: 10869-10874.
- Spitale A, Mazzola P, Soldini D, Mazzucchelli L & Bordoni A (2009) Breast cancer classification according to immunohistochemical markers: clinicopathologic features and short-term survival analysis in a population-based study from the South of Switzerland. *Ann Oncol*, **20**: 628-635.

- Starborg M, Gell K, Brundell E & Hoog C (1996) The murine Ki-67 cell proliferation antigen accumulates in the nucleolar and heterochromatic regions of interphase cells and at the periphery of the mitotic chromosomes in a process essential for cell cycle progression. *J Cell Sci*, **109**: 143-153.
- Sternlicht MD, Lochter A, Sympton CJ, Huey B, Rougier JP, Gray JW, Pinkel D, Bissell MJ & Werb Z (1999) The Stromal Proteinase MMP3/Stromelysin-1 Promotes Mammary Carcinogenesis. *Cell*, **98**: 137-146.
- Stetler-Stevenson W (1999) Matrix metalloproteinases in angiogenesis: a moving target for therapeutic intervention. *J Clin Invest*, **103**: 1237 - 1241.
- Storci G, Sansone P, Trere D, Tavolari S, Taffurelli M, Ceccarelli C, Guarnieri T, Paterini P, Pariali M, Montanaro L, Santini D, Chieco P & Bonafé M (2008) The basal-like breast carcinoma phenotype is regulated by *SLUG* gene expression. *The Journal of Pathology*, **214**: 25-37.
- Suh WK, Gajewska BU, Okada H, Gronski MA, Bertram EM, Dawicki W, Duncan GS, Buczynski J, Plyte S, Elia A, Wakeham A, Itie A, Chung S, Da Costa J, Arya S, Horan T, Campbell P, Gaida K, Ohashi PS, Watts TH, Yoshinaga SK, Bray MR, Jordana M & Mak TW (2003) The B7 family member B7-H3 preferentially down-regulates T helper type 1-mediated immune responses. *Nat Immunol*, **4**: 899-906.
- Sun X, Vale M, Leung E, Kanwar JR, Gupta R & Krissansen GW (2003) Mouse B7-H3 induces antitumor immunity. *Gene Ther*, **10**: 1728-1734.
- Sun R, Gao P, Chen L, Ma D, Wang J, Oppenheim JJ & Zhang N (2005) Protein Kinase C {zeta} Is Required for Epidermal Growth Factor-Induced Chemotaxis of Human Breast Cancer Cells. *Cancer Res*, **65**: 1433-1441.
- Sun Y, Wang Y, Zhao J, Gu M, Giscombe R, Lefvert AK & Wang X (2006) B7-H3 and B7-H4 expression in non-small-cell lung cancer. *Lung Cancer*, **53**: 143-151.

- Ueda S., Kuwabara I & Liu FT (2004) Suppression of Tumor Growth by Galectin-7 Gene Transfer. *Cancer Res*, **64**: 5672-5676.
- Urruticoechea A, Smith IE & Dowsett M (2005) Proliferation Marker Ki-67 in Early Breast Cancer. *J Clin Oncol*, **23**: 7212-7220.
- Vogelstein B, Lane D & Levine AJ (2000) Surfing the p53 network. *Nature*, **408**: 307-310.
- Wolff AC, Hammond MEH, Schwartz JN, Hagerty KL, Allred DC, Cote RJ, Dowsett M, Fitzgibbons PL, Hanna WM, Langer A, Mcshane LM, Paik S, Pegram MD, Perez EA, Press MF, Rhodes A, Sturgeon C, Taube SE, Tubbs R, Vance GH, Van De Vijver M, Wheeler TM & Hayes DF (2007) American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Guideline Recommendations for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer. *J Clin Oncol*, **25**: 118-145.
- Wu CP, Jiang JT, Tan M, Zhu YB, Ji M, Xu KF, Zhao JM, Zhang GB, Zhang XG (2006) Relationship between co-stimulatory molecule B7-H3 expression and gastric carcinoma histology and prognosis. *World J Gastroenterol*, **12**: 57-459.
- Xue C, Wyckoff J, Liang F, Sidani M, Violini S, Tsai KL, Zhang ZY, Sahai E, Condeelis J & Segall JE (2006) Epidermal Growth Factor Receptor Overexpression Results in Increased Tumor Cell Motility In vivo Coordinately with Enhanced Intravasation and Metastasis. *Cancer Res*, **66**: 192-197.
- Yarden Y & Sliwkowski MX (2001) Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **2**: 127-137.
- Zafrani B, Aubriot MH, Mouret E, de Crémoux P, de Rycke Y, Nicolas A, Boudou E, Vincent-Salomon A, Magdelénat H & Sastre-Garau X (2000) High sensitivity and specificity of immunohistochemistry for the detection of hormone receptors in breast carcinoma: comparison with biochemical determination in a prospective study of 793 cases. *Histopathology*, **37**: 536-545.

Zang X, Thompson RH, Al-Ahmadie HA, Serio AM, Reuter VE, Eastham JA, Scardino PT, Sharma P & Allison JP (2007) B7-H3 and B7x are highly expressed in human prostate cancer and associated with disease spread and poor outcome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **104**: 19458-19463.

ANNEXE : Article en soumission au American Journal of Pathology

Demers et al/ Galectin-7 in breast cancer

**Overexpression of galectin-7, a myoepithelial cell marker,
enhances spontaneous metastasis of breast cancer cells**

Mélanie Demers ^{1,4}, April A. N. Rose ², Andrée-Anne Grosset ³, Louis Gaboury ³, Peter M. Siegel ², and Yves St-Pierre ¹.

1) INRS-Institut Armand-Frappier, Laval, Québec, Canada,

2) Goodman Cancer Centre, McGill University, Montreal, Québec, Canada

3) Institut de Recherche en Immunologie et Cancérologie, Montreal, Quebec, Canada.

Correspondence : Yves St-Pierre

Footnotes:

1 Supported by grants to Y.S-P. from the Canadian Institute for Health Research (Grant No. MOP-89697) and P.M.S from the Canadian Breast Cancer Research Alliance (Grant No. MOP-84386). M.D. and A.A.N.R are supported by studentships from the Fond de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ). P.M.S. is a research scientist of the Canadian Cancer Society.

2 Requests for reprints: Yves St-Pierre, INRS-Institut Armand-Frappier, 531 Boul. Des Prairies, Laval, Québec, Canada, H7V 1B7.

3 Current address: Immune Disease Institute, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts 02115, USA.⁴ Current address: Immune Disease Institute, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts 02115, USA.

Introduction

A better understanding of biological and molecular events that regulate the invasiveness of breast tumour cells is needed to develop new effective strategies that inhibit breast cancer from expanding and metastasizing. Galectins are members of a family of betagalactosides-binding proteins that have recently emerged as novel modulators in different aspects of cancer. The expression of galectins in tumors and/or the tissue surrounding them has been well documented. Since galectin-7 expression has been associated with epithelial tissues and vary significantly in various types of cancer, we have investigated for the first time its role in breast cancer.

Methods

Human tissue samples of low and high grade breast cancer were studied for galectin-7 expression to test if altered expression could serve as a marker for invasive breast cancer. A pre-clinical mouse model was also used to analyze the role of galectin-7 in the invasive behaviour of breast cancer cell lines.

Results

Galectin-7 was specifically found in myoepithelial cells of normal human breast tissue, but not in luminal cells. Its expression was severely altered in breast carcinoma, many samples showing greater than 70% of galectin-7 positive cells. High expression levels of galectin-7 were restricted to high-grade breast carcinomas, including HER2 overexpressing and basal-like groups. None of the low-grade carcinoma samples expressed galectin-7. In HER2 overexpressing cases, galectin-7 expression was associated with lymph node axillary metastasis. Using two pre-clinical mouse models, high levels of galectin-7 expression in breast cancer cells drastically increased their ability to metastasize to lungs and bones. Significant increases in the number of pulmonary metastases and osteolytic lesions were induced by overexpression of galectin-7 compared to control cells.

Conclusions

In the present work, we provide evidence that galectin-7 expression is associated with aggressive subtypes of breast carcinomas and increases the metastatic behavior of breast cancer cells. Galectin-7 may represent a potential target for both specific detection and therapeutic inhibition of metastatic breast cancer.

Introduction

Members of the galectin family share a unique carbohydrate recognition domain (CRD) that confers specificity for β -galactoside derivatives. Based on structural features, the 15 mammalian galectins known to date have been classified as proto, chimera or tandem repeat types. Numbered according to the order of their discovery, galectins 1, 2, 5, 7, 10, 11, 13, 14 and 15 are of the prototype, galectins 4, 6, 8, 9 and 12 are of the tandem repeat type, and galectin 3 is the only galectin of the chimera type (1). Most galectins are nonglycosylated soluble proteins that can be found both intracellularly (cytoplasm and/or nucleus) and extracellularly depending on the cell type, cell cycle stage, and differentiation state. Accordingly, galectins have been implicated in a wide range of cellular functions, including embryonic development, wound healing, apoptosis, intercellular adhesion, cell migration, immune response, and cancer (2).

Galectin-7 was initially described as a marker that reflected the differentiation status of keratinocytes (3,4). Functionally, its intracellular form has been associated with UVB-induced apoptosis in epidermis since sunburn/apoptotic keratinocytes express abnormally high levels of galectin-7 (5). Early studies suggested that galectin-7 might function as an apoptosis regulator when it was identified as one of 14 transcripts induced in colorectal cancer cells undergoing p53-dependent apoptosis (6). Additional studies have since confirmed that galectin-7 can render tumor cells more susceptible to apoptotic stimuli (7, 8); although others have also shown that extracellular binding of galectin-7 to cell surface receptors can trigger signals that reduce neuroblastoma cell growth without the appearance of features characteristic of classical apoptosis (9).

Given its pro-apoptotic role, galectin-7 might be expected to aid in the elimination of tumour cells. However, in sharp contrast to such negative roles played by galectin-7 in tumour development, Lu et al. (10) have previously found that galectin-7 is overexpressed in chemically-induced mammary carcinomas. They reported that galectin-7 expression was restricted to mammary carcinomas and was not detected in any other normal tissues examined in the adult rat, providing the first indication that galectin-7 could be associated with tumor progression. Rorive *et al.* (11) later observed that galectin-7 expression was markedly higher in different forms of papillary carcinomas than in benign thyroid tumors.

Demers et al/ Galectin-7 in breast cancer

Recent work in lymphoma further supported the idea that galectin-7 may promote tumorigenesis. Mice injected with lymphoma cells ectopically expressing galectin-7 constitutively developed large metastatic tumors in the liver and kidneys with massive infiltration of tumor cells in the parenchyma (12). In contrast, only a few scattered foci of tumor cells with limited infiltration were observed in mice injected with control lymphoma cells. Suppression of galectin-7-expression using specific antisense approaches significantly delayed metastasis of lymphoma cells (13). Taken together, these results have uncovered a novel functional role for galectin-7: its ability to promote tumor progression.

To investigate the role of galectin-7 in breast cancer, we have examined its expression in normal and malignant human breast tissues to determine whether galectin-7 was associated with any particular subtype, or biological or clinical feature. Together, our data indicate that galectin-7 is expressed in aggressive phenotype of breast carcinomas and is a critical determinant in spontaneous metastasis of lung and bone-homing breast tumour cells. This suggests that galectin-7 is not only a potentially novel therapeutic target in the treatment of breast cancer metastasis, but may also prove to be a valuable marker to monitor disease progression.

Materials and Methods

Cell lines and reagents. The 4T1 and 66c14 cell lines were maintained in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) [supplemented with 8% (v/v) FCS, 2 mmol/L Lglutamine, 10 mmol/L HEPES buffer]. All cell culture products were purchased from Life Technologies (Burlington, Ontario, Canada). All other reagents were purchased from Sigma chemicals (St. Louis, MO), unless otherwise indicated.

Generation of stable transfectants expressing galectin-7. To obtain stable 4T1 and 66c14 breast carcinoma transfectants expressing galectin-7, the cDNA encoding the murine galectin-7 (12) was cloned in Sr α eukaryotic expression vector (kindly provided by Dr. François Denis) using *SpeI* and *NotI* restriction enzymes. Controls were generated using 4T1 and 66c14 breast carcinoma cells transfected with the empty Sr α vector. Transfection

Demers et al/ Galectin-7 in breast cancer

was carried out using Lipofectamine 2000 according to the manufacturer's instructions (Invitrogen Canada Inc., Burlington, ON). After 48 hours of culture, transfected cells were allowed to grow in complete medium containing 8 µg/ml of puromycin. Individual colonies were expanded, and PCR analysis was carried out on genomic DNA for assessing vector insertion and galectin-7 expression was monitored by Western blot analysis.

Western blot analysis. Cells and frozen tissues were homogenized and resuspended in lysis buffer (10 mM Tris, pH 7.5, 2.5% Triton X-100) containing protease inhibitors (Roche, Laval, QC). Equal amounts of whole-cell (50 µg) extracts were separated on SDS-PAGE gel and transferred onto nitrocellulose membranes (Bio-Rad Laboratories, Mississauga, ON). The membranes were blocked with 10% milk in PBS/0.5% Tween 20 overnight, subsequently blotted for 2 hours with primary antibodies. Membranes were probed with polyclonal rabbit anti-galectin-7 (1:1000) or mouse anti-β-actin antibodies. Secondary antibodies consisted of horseradish peroxidase-conjugated donkey anti-rabbit or anti-mouse IgG. Detection was performed by the enhanced chemiluminescence method (Amersham).

RNA isolation and RT-PCR. Total RNA was isolated from transfected cells using Trizol reagent according to the manufacturer's protocol (Invitrogen). Briefly, total RNA (2 µg) was reverse transcribed using the OmniScript reverse transcriptase (Qiagen, Mississauga, ON) and PCR amplified using the following conditions: 94°C for 1 min, 62°C for 1 min, and 72°C for 1 min followed by a final extension step at 72°C for 10 min. The primers used for PCR amplification were the following: human galectin-7 (*Gal-7h*), 5'-ACCAACCCGGTCCCAG-3' (sense) and 5'-GCGGGCTAACGCTTTATTTGC-3' (antisense); and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*), 5'-CGGAGTCAACGGATTTGGTCGTAT-3' (sense) and 5'-AGCCTTCTCCATGGTGGTGAAGAC-3' (antisense). Thirty or 35 cycles of amplification were carried out in a thermal cycler (model PTC-100 TM, MJ Research, Watertown, MA). Each assay was repeated three times to verify the accuracy of the results. As an internal control, amplification of *GAPDH* mRNA was carried out by reverse

Demers et al/ Galectin-7 in breast cancer

transcription-PCR (RT-PCR) using specific primers. Amplified products were analyzed by electrophoresis on 1% agarose gels using ethidium bromide staining and UV illumination. Loading was equalized to the internal control mRNA.

Metastasis assays. Female BALB/c mice (4-8 weeks) were purchased from Charles River Laboratories. The mice were housed in facilities managed by the INRS Experimental Biology Center or the McGill University Animal Resources Centre. All animal experiments were conducted under an INRS and McGill University–approved Animal Use Protocol in accordance with guidelines established by the Canadian Council on Animal Care. For experimental metastasis assays using the 66cl4 model, 10⁵ vector control or Galectin-7 expressing 66cl4 cells were resuspended in 100 μ L PBS and injected into the left cardiac ventricle of 4- to 5-week-old BALB/c mice as previously described (14). A total of 9 mice were injected with vector control and 13 animals were injected with Galectin-7 expressing 66cl4 breast cancer cells. All mice were sacrificed when the first mouse appeared cachectic, at 13 days post-injection. For the 4T1 model, the procedure was performed as described (15) with minor modifications. Briefly, female BALB/c mice, aged 6 to 8 weeks, were injected with vector control or stable transfectants expressing galectin-7 tumor into the mammary fat pad. The size of the primary tumors was monitored twice a week and the number of metastatic nodules on the lung was evaluated by histological examination at necropsy.

Quantification of Osteolytic Lesions. Immediately before sacrifice, mice were anesthetized and digital X-rays were obtained with a Faxitron Specimen Radiography System (model MX-20 digital). At the termination of these experiments, all digital X-rays were blinded and scored by two independent researchers. Each X-ray was examined for the presence of osteolytic lesions in the following six sites: proximal humerus, distal femur, and proximal tibia (left and right side). The number of mice possessing at least one osteolytic lesion was divided by the total number of animals in each cohort to determine the percentage of mice developing bone metastases. At the time of necropsy, hind limbs from 3

and 4 mice injected with vector control or galectin-7 stable transfectants, respectively were removed and fixed in 4% paraformaldehyde. Fixed tissues were paraffin embedded, sectioned, stained with H&E. Routine histology services were provided by the Centre for Bone and Periodontal Research (McGill University) histology platform. For each cohort, 12 H&E stained bone (femur or tibia) sections were scanned with an Aperio slide scanner at 20X magnification. Total bone area and metastatic lesion area were quantified using Aperio ImageScope software (v9.1.19). Metastatic lesion area was expressed as a percentage of the total tissue area.

Immunohistochemistry. Paraffin-embedded sections were deparaffinized in xylenes and rehydrated through a graded alcohol series. Antigen retrieval was performed for 10 min. in 1mM EDTA (pH 8.0), pre-heated to 95-100°C in a steamer. Tissue sections were blocked in 1% BSA and 5% NHS in 1xPBS and incubated overnight at 4°C with an anti-Galectin-7 (R&D Systems). Tissue sections were subsequently incubated with Biotin-SP conjugated Donkey anti-Goat secondary Ab (R&D Systems), developed with DAB reagent and counterstained with Hematoxylin. For double staining of tissue sections, reactions for galectin-7 and GATA-3 were carried out using the Discovery XT automated immunostainer (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ). Briefly, deparaffinized, sections were incubated in EDTA buffer (pH 8) for antigen retrieval. Next, an anti-human galectin-7 antibody (R&D Systems) and an anti-GATA-3 HG3-31 antibody (Santa Cruz Biotechnology) were used at 1:50 and 1:250 dilutions, respectively, for 60 min. To reveal the reaction, the DABmap (brown) and REDmap (red) kits were used (Ventana Medical System). The slides were counterstained with hematoxylin. Each section was scanned at a high resolution (Nanozoomer, Hamamatsu Photonics K.K.).

Patients and tumor materials. A cohort of 213 patients diagnosed with primary breast cancer between 2003 and 2008 at the Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM) was used for the study. Tumors were selected on the basis of the histological diagnosis according to the classification of Nottingham modified by Elston and Ellis (16).

Demers et al/ Galectin-7 in breast cancer

The cohort consisted of both low-grade and high-grade ductal carcinomas and of medullary carcinomas (typical and atypical). Estrogen receptor (ER) α status was positive in all low-grade carcinomas. The study was approved by the research ethics committee of the research centre at the CHUM.

Tissue microarrays and Immunohistochemistry. Formalin-fixed paraffin-embedded material from each primary tumor sample was used to construct tissue microarrays with an automated arrayer design to construct high-density tissue micro-array blocks (ATA-27 Beecher Instruments, Sun Prairie, WI). To that end, triplicate 1 mm cores from each tumor and control tissues were punched out and arrayed into six recipient blocks. For immunohistochemical analysis, three-micrometer thick sections were prepared from each TMA. Immunostaining reactions for galectin-7 were carried out using the Discovery XT automated immunostainer (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ). Briefly, deparaffinized, sections were incubated in cell conditioning 1 (pH 8.0) for antigen retrieval. Next, an anti-human galectin-7 antibody (R&D Systems) was used at 1:150 dilution for 60 min. The slides were counterstained with hematoxylin and bicarbonate. Each section was scanned at a high resolution using the Nanozoomer Digital Pathology (Hamamatsu, Bridgewater, NJ).

Results

Galectin-7 expression in human breast tissues.

To date there have been no published descriptions of galectin-7 protein expression and localization in normal breast tissue and breast cancer. Specimens from normal regions of human mammary glands were stained by immunohistochemistry (IHC) with anti-galectin-7 antibody. Initial staining with control skin sections showed extensive staining of stratified epithelium, consistent with previous studies reporting that galectin-7 is considered a marker of stratified epithelia (3-4). IHC staining of normal breast tissues showed that cytoplasm and nuclei of human myoepithelial cells but not luminal epithelial cells were positive for galectin-7 (**Fig. 1**).

To examine the expression of galectin-7 in human mammary tumors, paraffin-embedded tissue sections were selected from breast cancer patients to construct tissue microarrays (TMA) and immunostained with a galectin-7-specific. We found that galectin-7 expression was severely altered in breast carcinoma tissues (**Fig. 2**). The range of percentage positive cells varied greatly among samples. Elevated expression of galectin-7 was restricted to high-grade breast carcinomas ($p < 0.001$) (**Table I**). None of the low-grade carcinoma samples expressed galectin-7. Galectin-7-positive cases were mostly associated with a basal-like phenotype ($p < 0.0001$). On all galectin-7-positives cases found, all were ER and PR negative. Six cases were HER2 positives. This association with basal-like tumours was further demonstrated by positive correlations between galectin-7 and “basal” keratins, such as CK-5/6 ($p < 0.0001$). All cases were negative for GATA-3 ($p < 0.0001$), a defining marker of the luminal subtype (**17**). Interestingly, all HER2/galectin-7-positive were also positive for lymph node metastasis ($p = 0.0066$) (**Table II**), supporting the hypothesis that galectin-7 may have a role in metastatic breast cancer.

Galectin-7 overexpression increases lung and bone metastasis.

To examine the role of galectin-7 in breast cancer metastasis, the 4T1 orthotopic breast cancer model was used. The 4T1 line metastasizes to the lungs following inoculation into the mammary gland while its 66cl4 variant spontaneously metastasize to the lung, but not to bone (**18**). All these lines were derived from the same spontaneous mammary carcinoma in a Balb/c/C3H mouse (**19**). A series of stable transfectants overexpressing galectin-7 was first generated in 4T1 cells along with control transfectants derived from 4T1 cells transfected with an empty vector (**Fig. 3A**). The cells were then assessed for their ability to spontaneously metastasize following injection in the mammary fat pad in syngeneic Balb/c mice. No significant difference in the growth rate or the final tumor weight at the completion of the experiment was found between control transfectants or those expressing galectin-7 (*Data not shown*). Similarly, there was no difference between the proliferation rates of Sr α control cells and 4T1 cells expressing galectin-7 cells *in vitro*, although galectin-7 expression was stable in transfectants for the duration of the experiments (*Data not shown*), suggesting that galectin-7 did not alter tumor growth at the primary site. We

found, however, that galectin-7 accelerated the development of metastases to lung, as the mean survival time of the mice injected with galectin-7 transfectants was significantly shorter than that of mice injected with controls (25.7 ± 6.5 days vs. 37 ± 8.5 days respectively; $p = 0.007$) (**Fig. 3B**). Detailed histopathological analysis showed that 4T1 cells expressing galectin-7 developed significantly more metastatic foci in the lungs (**Fig. 3C**). In contrast only few scattered foci of tumor cells were observed in mice injected with control cells.

Since osteolytic lesions contribute to breast cancer associated morbidity (20), the relationship between galectin-7 expression and bone metastasis was studied using the 66c14 variant. A series of transfectants expressing high levels of galectin-7 (66c14Gal7) and control cells (66c14S α) were thus generated as in the case of 4T1 cells following transfection and selection by puromycin resistance and tested by Western blot analysis (**Fig. 4A**). As in the case of 4T1 cells, no significant difference in the growth rate or the final tumor weight at the completion of the experiment was found between control transfectants or those expressing galectin-7 (*Data not shown*), confirming that galectin-7 did not alter tumor growth at the primary site. Examinations of macroscopic lesions in mice injected with 66c14S α showed that galectin-7 expression in 66c14 significantly enhanced their capacity to metastasize to the bone ($p < 0.01$) (**Fig. 4B and Table III**). Histological examination of sections of tibia and femoral bones of mice showed a significant increase in the frequency of bone lesions induced by 66c14Gal7 cells as compared to control 66c14S α cells (**Table III**). Moreover, the osteolytic lesions were significantly ($p < 0.001$) larger with 66c14Gal7 cells than those induced by 66c14S α cells, further emphasizing the pro-tumorigenic potential of galectin-7 (**Fig 5A and Table III**). IHC staining confirmed the expression of galectin-7 in metastatic lesions derived from 66c14Gal7 stable transfectants and a lack thereof in control cells (**Fig. 5B**).

Discussion

Galectin-7 is primarily found in stratified epithelia, especially in epidermis. It was identified as a stratified epithelial marker following searches for epidermal genes responsive to retinoic acid and for genes that were down regulated in actively dividing

keratinocytes. Its expression in human breast cancer tissues and its possible role in breast cancer metastasis have never been investigated to date. In the present work, we provide evidence that it plays a pivotal role in controlling the metastatic behavior of breast cancer cells while its expression is associated with aggressive subtypes of breast carcinomas.

Using anti-galectin-7 specific Abs on TMA's constructed from samples obtained from normal breast tissues and breast carcinomas, we found that galectin-7 is specifically expressed at the protein level in mammary myoepithelial cells in tissues of normal individuals, consistent with microarray studies from normal breast luminal and myoepithelial cells identifying *galectin-7* as the first gene on the list among the 42 most predictive genes that distinguish luminal epithelial cells from myoepithelial cells (21-22). Galectin-7 expression is thus very distinct from that of galectin-3, another member of the galectin family associated in breast cancer expressed in normal luminal epithelial but not myoepithelial cells. Moreover, in contrast to galectin-7, acquisition of an invasive phenotype via galectin-3 is associated with a decreased expression of this galactoside-binding lectin rather than an increased expression as we observed in the case of galectin-7 (23).

Apart from the results of Lu et al. (8), who showed that galectin-7 was expressed in rat mammary tissues following chemically-induced mammary tumorigenesis, the first indication that galectin-7 might be expressed in human breast cancer was reported in the genomic profiling data from Perou *et al.*, (24) who provided a molecular portrait of 65 surgical specimens obtained from 42 individuals. Their microarray data revealed that while galectin-7 transcripts were expressed at very low levels in normal breast tissues, they were highly expressed in cell lines with a basal-like phenotype. Here, we extended these results by showing that galectin-7 was expressed at the protein level and was highly-expressed in basal-like breast cancer cells with an ER/PR negative status and expressing basal keratins 5/6 and EGFR. The association between galectin-7 and progression of breast cancer is further supported by the correlation between galectin-7 and high tumor grade and the fact that all Her-2-positive tumors are also positive for lymph node metastasis. Finally, we found an inverse relationship between overexpression of galectin-7 and absence of GATA-3, a transcription factor known to suppress tumor dissemination of breast cancer (25).

Whether the emergence of a GATA-3-negative/galectin-7-positive population is distinctively aggressive during tumor progression is a likely possibility. Indeed, constitutive galectin-7 expression by gene transfer approaches in cell lines that express low or undetectable level of galectin-7 resulted in an increased metastatic behavior to the lung and bone and larger osteolytic lesions. Although the exact function of galectin-7 on different cell types remains the dissemination of tumor cells in specific types of cancer. Our preliminary attempts to determine the exact mechanism(s) used by galectin-7 to increase the invasive behaviour using in vitro migration assays have not permitted to determine whether it can modify the invasive behavior via the increased motility via secretion of *mmp* genes, such as *mmp-9*, a gene which we found is induced by galectin-7 in lymphoma cells and breast carcinoma cells (12, and data not shown). A likely possibility is that galectin-7 expression in these cells confers resistance to apoptosis, as previously shown in the case of galectin-3 for specific cell types. Endogenous galectin-3 has been shown to confer resistance to apoptosis through an intracellular mechanism (26-27). Like galectin-3, galectin-7 contains a highly conserved XWGR motif corresponding to the BH1 domain of Bcl-2 and mutation of WGR→WAR motif in the alpha helix of Bcl-2 has been shown to disrupt Bcl-2 anti-apoptotic function (28). Since this motif has been shown to be responsible for binding to nucleic acid, a role for galectin-7 in the nucleus would be consistent with its strong nuclear staining we observed in breast cancer cells. This mechanism would be consistent with our statistically significant correlation between galectin-7 and Ki67. Further studies regarding the role of galectin-7 in resistance to apoptosis is currently under investigation.

Conclusion

We provide evidence that galectin-7 plays a pivotal role in controlling the metastatic behavior of breast cancer cells and is associated with the basal subtype of primary breast cancers. Galectin-7 may thus represent a potential target for both specific detection and therapeutic inhibition of metastatic breast cancer.

Demers et al/ Galectin-7 in breast cancer

Abbreviations

TMA = tissue microarrays

IHC = immunohistochemistry

DMEM = Dulbecco's Modified Eagles Medium

CK = cytokeratin

EGFR = epidermal growth factor receptor

ER = oestrogen receptor

HER-2 = human epidermal growth factor receptor 2

PR = progesterone receptor

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Author's contribution

M.D. contributed to the study design, generated and characterized the transfectants, along with data mining and writing of the manuscript. A.A.N.R. and P.M.S. contributed to study design along with data mining and image analysis of osteolytic lesions. A.A.G. constructed the tissue microarrays and performed the IHC analysis. A.A.G. and L.G. scored the IHC results, analyzed the tumour grade and performed clinical data analysis. Y.S.P. conceived the study, was in charge of its design and coordination and writing of the manuscript. All authors read and approved the manuscript.

Acknowledgements

We thank Diane Tremblay for her excellent technical support, Dr. François Denis for providing the S α vector, and Dr. Edouard F. Potworowski for critical reading of the manuscript. This work was funded by grants to Y.S.P. from the Canadian Institute for Health Research (Grant No. MOP-89697) and P.M.S from the Canadian Breast Cancer Research Alliance (Grant No. MOP-84386). M.D. and A.A.N.R are supported by studentships from the Fond de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ). P.M.S. is a research scientist of the Canadian Cancer Society.

References

1. Elola MT, Wolfenstein-Todel C, Troncoso MF, Vasta GR, Rabinovich GA. **Galectins: matricellular glycan-binding proteins linking cell adhesion, migration, and survival.** *Cell Mol Life Sci.* 2007, **64**: 1679-700
2. Liu, F.T., Rabinovich, G.A. **Galectins as modulators of tumor progression.** *Nature reviews Cancer* **5**: 29-41.
3. Madsen P, Rasmussen HH, Flint T, Gromov P, Kruse TA, Honoré B et al. **Cloning, expression, and chromosome mapping of human galectin-7.** *J Biol Chem* 1995, **270**: 5823-582.
4. Magnaldo T, Bernerd F, Darmon M. **Galectin-7, a human 14-kDa S-lectin, specifically expressed in keratinocytes and sensitive to retinoic acid.** *Dev Biol* 1995, **168**: 259-271
5. Bernerd F, Sarasin A, Magnaldo T. **Galectin-7 overexpression is associated with the apoptotic process in UVB-induced sunburn keratinocytes.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999, **96**: 11329-11334.
6. Polyak K, Xia Y, Zweier JL, Kinzler KW, Vogelstein B. **A model for p53-induced apoptosis.** *Nature* 1995, **389**: 300-305.
7. Kuwabara I, Kuwabara Y, Yang RY, Schuler M, Green DR, Zuraw BL et al. **Galectin-7 (PIG1) exhibits pro-apoptotic function through JNK activation and mitochondrial cytochrome c release.** *J Biol Chem* 2002, **277**: 3487-3497.
8. Ueda S, Kuwabara I, Liu FT. **Suppression of tumor growth by galectin-7 gene transfer.** *Cancer Res* 2004, **64**: 5672-5666.
9. Kopitz J, André S, von Reitzenstein C, Versluis K, Kaltner H, Pieters RJ et al. **Homodimeric galectin-7 (p53-induced gene 1) is a negative growth regulator for human neuroblastoma cells.** *Oncogene* 2003, **22**: 6277-6288.
10. Lu J, Pei H, Kaeck M, Thompson HJ. **Gene expression changes associated with chemically induced rat mammary carcinogenesis.** *Mol Carcinog* 1997, **20**: 204-215.
11. Rorive S, Eddafali B, Fernandez S, Decaestecker C, André S, Kaltner H et al. **Changes in galectin-7 and cytokeratin-19 expression during the progression of malignancy in thyroid tumors: diagnostic and biological implications.** *Mod Pathol* 1997, **15**: 1294-301.
12. Demers M, Magnaldo T, St-Pierre Y. **A novel function for galectin-7: promoting tumorigenesis by up-regulating MMP-9 gene expression.** *Cancer Res* 2005, **65**: 5205-5210.
13. Demers M, Biron-Pain K, Hébert J, Lamarre A, Magnaldo T, St-Pierre Y. **Galectin-7 in lymphoma: elevated expression in human lymphoid malignancies and decreased lymphoma dissemination by antisense strategies in experimental model.** *Cancer Res* 2007, **67**: 2824-2829.
14. Rose AA, Pepin F, Russo C, Abou Khalil JE, Hallett M, Siegel PM. **Osteoactivin promotes breast cancer metastasis to bone.** *Mol Cancer Res* 2007, **5**: 1001-1014.
15. Kang Y, Siegel PM, Shu W, Drobnjak M, Kakonen SM, Córdón-Cardo C et al: **A multigenic program mediating breast cancer metastasis to bone.** *Cancer Cell* 2003, **3**: 537-549.

16. Elston CW, Ellis IO. **Pathological prognostic factors in breast cancer: I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow up.** *Histopathology* 1991, **19**: 403-410.
17. Wilson BJ, Giguère V : **Meta-analysis of human cancer microarrays reveals GATA3 is integral to the estrogen receptor alpha pathway.** *Mol Cancer* 2008, **7**: 49.
18. Eckhardt BL, Parker BS, van Laar RK, Restall CM, Natoli AL, Tavarria MD, et al. **Genomic analysis of a spontaneous model of breast cancer metastasis to bone reveals a role for the extracellular matrix.** *Mol Cancer Res* 2005, **3**: 1-13.
19. Aslakson CJ, Miller FR. **Selective events in the metastatic process defined by analysis of the sequential dissemination of subpopulations of a mouse mammary tumor.** *Cancer Res* 1992, **52**: 1399-1405.
20. Mundy GR. **Metastasis to bone: causes, consequences and therapeutic opportunities.** *Nat Rev Cancer* 2002, **2**: 584-593.
21. Jones C, Mackay A, Grigoriadis A, Cossu A, Reis-Filho JS, Fulford L et al. **Expression profiling of purified normal human luminal and myoepithelial breast cells: identification of novel prognostic markers for breast cancer.** *Cancer Res* 2004, **64**: 3037-3045.
22. Chung CH, Bernard PS, Perou CM. **Molecular portraits and the family tree of cancer.** *Nat Genet* 2002, **32** Suppl: 533-40.
23. Castronovo V, Van Den Brule FA, Jackers P, et al. **Decreased expression of galectin-3 is associated with progression of human breast cancer.** *J Pathol* 1996, **179**: 43-8.
24. Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA et al. **Molecular portraits of human breast tumours.** *Nature* 2000, **406**: 747-752.
25. Kouros-Mehr H, Bechis SK, Slorach EM, Littlepage LE, Egeblad M, Ewald AJ et al. **GATA-3 links tumor differentiation and dissemination in a luminal breast cancer model.** *Cancer Cell* 2008, **13**:141-152.
26. Nakahara, S., Oka, N., and Raz, A. **On the role of galectin-3 in cancer apoptosis.** *Apoptosis* 2005, **10**: 267-275.
27. Lin CI, Whang EE, Abramson MA, Donner DB, Bertagnolli MM, Moore FD Jr, Ruan DT. **Galectin-3 regulates apoptosis and doxorubicin chemoresistance in papillary thyroid cancer cells.** *Biochem Biophys Res Commun* 2009, **379**: 626-31.
28. Yin XM, Oltvai ZN, Korsmeyer SJ. **BH1 and BH2 domains of Bcl-2 are required for inhibition of apoptosis and heterodimerization with Bax.** *Nature* 1994, **369**: 321-3.

Table I: Histoclinical correlations of breast cancers according to galectin-7 expression

| Characteristic | Galectin-7- positive cases | <i>P</i> values |
|---------------------------|-------------------------------|-----------------|
| Age | | |
| < 45 years | 7/29 | NS |
| ≥ 45 years | 24/147 | |
| Pathological type | | |
| Ductal | 29/158 | NS |
| Medullar | 1/11 | |
| Molecular subtype | | |
| Basal-like | 20/41 | < 0.0001 |
| HER-2 | 6/25 | |
| Luminal A | 0/34 | |
| Luminal B | 0/6 | |
| SBR-EE grade | | |
| I (low) | 0/34 | |
| II | 0/13 | |
| III (high) | 31/131 | < 0.0001 |
| LN metastasis | | |
| Negative | 17/107 | NS |
| Positive | 12/66 | |
| ER status | | |
| Negative | 31/90 | < 0.0001 |
| Positive | 0/69 | |
| PR status | | |
| Negative | 30/113 | < 0.0001 |
| Positive | 0/40 | |
| HER-2 status | | |
| Negative | 24/124 | NS |
| Positive | 6/31 | |
| ER/PR/HER-2 status | | |
| Triple negative | 22/51 | < 0.0001 |
| Other | 7/99 | |

| | | |
|----------------------|--------|----------|
| CK5/6 status | | |
| Negative | 9/110 | < 0.0001 |
| Positive | 20/46 | |
| CK14 status | | |
| Negative | 19/126 | 0.0022 |
| Positive | 11/25 | |
| Ki-67 status | | |
| Negative | 7/81 | 0.0009 |
| Positive | 23/76 | |
| EGFR Status | | |
| Negative | 5/98 | < 0.0001 |
| Positive | 23/54 | |
| GATA-3 status | | |
| Negative | 31/89 | < 0.0001 |
| Positive | 0/68 | |
| MMP-3 status | | |
| Negative | 3/25 | NS |
| Positive | 25/86 | |
| CD276 Status | | |
| Negative | 6/72 | 0.0047 |
| Positive | 20/76 | |

*To assess differences in clinicopathologic features between the two groups of patients, Fisher's exact test was used for qualitative variables with discrete categories.

Table II: Histoclinical correlations of Her2-positive breast cancer according to galectin-7 expression.

| Characteristic | HER-2 ⁻ /gal-7 ⁺ (n = 24) | | HER-2 ⁺ /gal-7 ⁺ (n = 6) | P values |
|----------------------|--|---------|---|-------------------|
| Age | | | | |
| < 45 years | 6/29 | NS | 1/29 | NS |
| ≥ 45 years | 18/146 | | 5/146 | |
| LN metastasis | | | | |
| Negative | 17/107 | NS | 0/107 | <i>p</i> = 0.0066 |
| Positive | 6/65 | | 5/65 | |
| GATA-3 status | | | | |
| Negative | 24/88 | <0.0001 | 6/88 | <i>p</i> = 0.0359 |
| Positive | 0/68 | | 0/68 | |
| EGFR Status | | | | |
| Negative | 3/98 | <0.0001 | 2/98 | <i>p</i> = 0.0359 |
| Positive | 19/54 | | 4/54 | |

* The LN status for two patients were not available.

Table III: Quantification of Bone Metastases Following Cardiac Injection of 66cl4 cells.

| Construct | % of mice ^a with Bone Metastases (X-Ray) | % of Bones with Metastases ^b (H&E) | % Lesion Area/Tissue ^c (H&E) |
|-------------------------------------|--|--|--|
| pSRα/Empty | 0.0 | 50.0 | 12.1 |
| pSRα/Gal-7 | 53.8 | 100.0 | 48.5 |
| P value | 0.01^d | 0.01^d | <0.0001^e |

^a pSR α /Empty (n=9), pSR α /Gal-7 (n=13)

^b Multiple bone samples were taken from individual mice. pSR α /empty (n=3 mice, n=12 bones), pSR α /Gal-7 (n=4 mice, n=12 bones)

^c includes only those bones with metastatic lesions

^d Fisher's exact test (2 tails)

^e T-test for independent samples (2 tails)

Figure legends.**Figure 1. Galectin-7 expression in normal mammary myoepithelial cells.**

Immunohistological analysis of (A) human normal tissues showing expression of galectin-7 in the stratified epithelium of the skin (*Upper panel*) and in mammary tissues showing specific expression in myoepithelial cells (*Central and lower panels*). Note the presence of intense galectin-7 protein immunoreactivity in the mammary myoepithelial cells and its absence in the lumens of normal ducts and adjacent stroma. Strong galectin-7 cytoplasmic and nuclear protein staining was found in myoepithelial cells.

Figure 2. Galectin-7 expression in human breast carcinomas. Scoring of tissue microarrays constructed from human breast carcinomas specimens were stained (DAB, *brown*) with anti-galectin-7 antibody. Specimens were scored for percentages of galectin-7-positive cells by immunohistochemistry of paraffinembedded tissue in low grade (LG) and high grade (HG) carcinoma. The absence of signal was scored as "0".

Figure 3. Effect of galectin-7 expression on lung metastasis induced by 4T1

cells. (A) 4T1 cells were transfected with the Sra/puro expression vector containing the murine *galectin-7* cDNA and stable transfectants (Gal7#2, Gal7#18, and Gal7#37) constitutively expressing galectin-7 were obtained. The levels of endogenous and overexpressed galectin-7 protein were determined by Western blotting. β -actin was used as a loading control. The expression of galectin-7 in transfectants was not decreased upon long-term *in vitro* culture of the clones but was nevertheless always assessed by Western blot analysis before their *in vivo* testing. Control transfectants (Sra) included 4T1 cells transfected with the Sra/puro expression vector without cDNA insert. (B) Survival analysis of syngeneic Balb/c mice injected into the mammary fat pad with transfectants (\square) or controls (\blacksquare). (C) At necropsy, lungs were harvested and fixed in 10% formalin for histological examination to study the effect of galectin-7 on 4T1 tumor cells that spontaneously metastasize into the lung.

Figure 4: Galectin-7 expression promotes bone metastasis of 66c14 breast

cancer cells following cardiac injection. (A) 66c14 breast carcinoma cells were transfected with the Sr α /puro expression vector containing the murine galectin-7 cDNA and stable transfectants constitutively expressing galectin-7 were obtained and tested for galectin-7 by Western blot analyses. Control transfectants (Sr α) also included 66c14 cells transfected with the Sr α /puro expression vector without cDNA insert. In (B), X-ray images of tibiae derived from Balb/c mice injected into the left cardiac ventricle with either 66c14 cells containing an empty vector (upper panel, 66c14/vector control) or two independent clones expressing Galectin-7 (lower panel, 66c14/Galectin-7). Arrows indicate regions of bone destruction.

Figure 5. Immunohistological analyses of bone metastases induced by 66c14

transfectants. (A) H&E stained images revealing the proximal tibia of an animal injected with 66c14SR α cells harboring an empty vector (*upper panel*, 66c14/vector control) or 66c14Gal7 expressing galectin-7 (*lower panel*, 66c14/Galectin-7). Outlined regions indicate areas of 66c14-derived lesions growing in the bone. (B) Immunohistochemical staining for Galectin-7 in lesions resulting from 66c14/Vector control cells (i, ii) and 66c14/Galectin-7 (iii, iv) breast cancer cells. The open boxes found in panels i and iii indicate regions that are shown at higher magnification in panels ii and iv. Scales bars represent 75 μ M (panels i, iii) or 25 μ M (panels ii, iv).

Figure 1



Figure 2

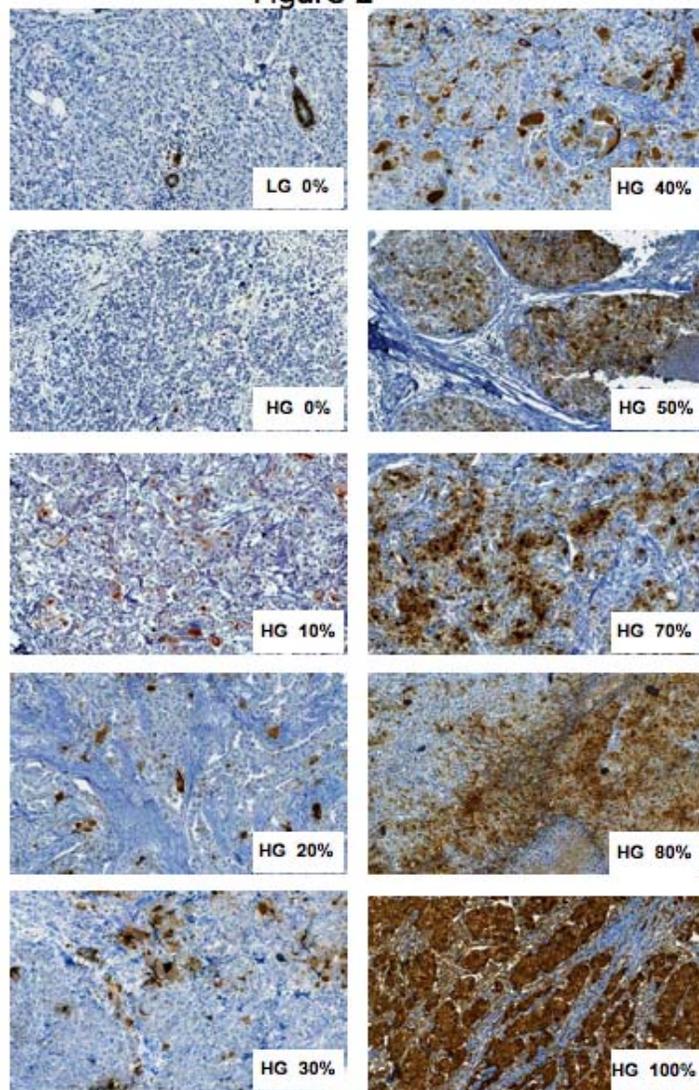


Figure 3

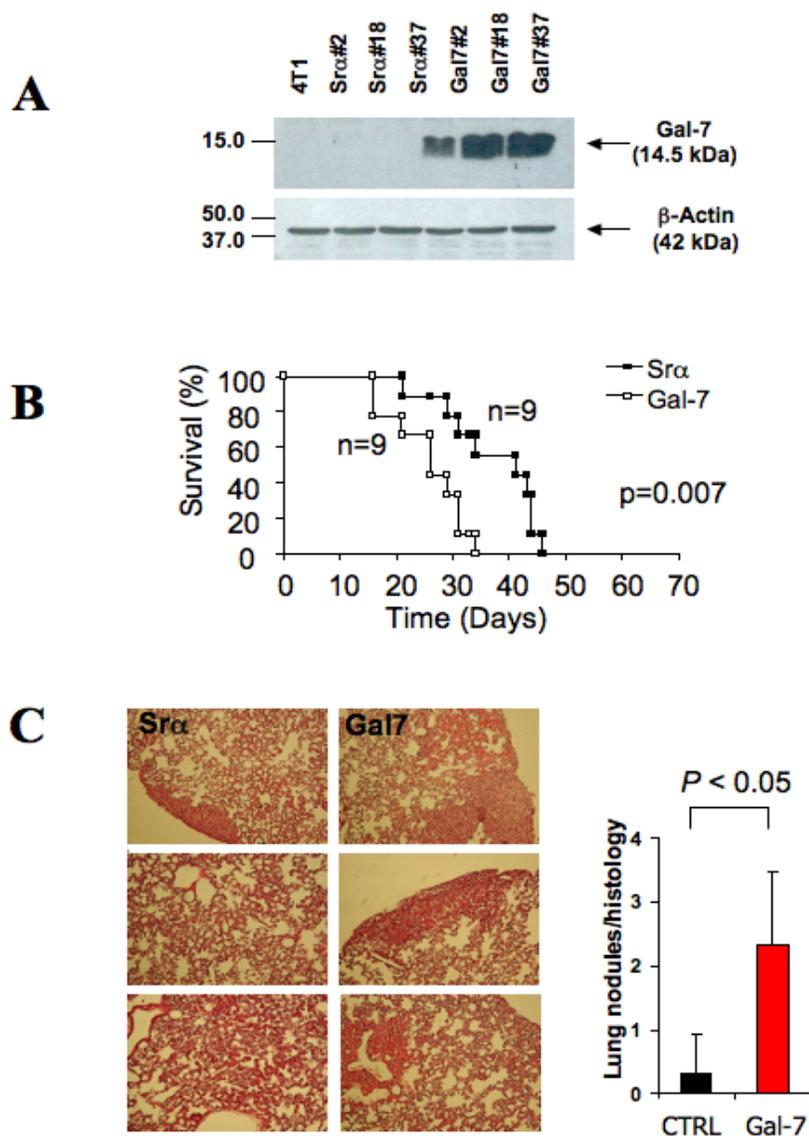
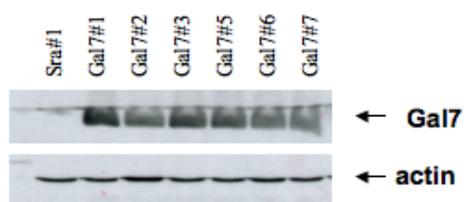


Figure 4

A**B**

SR alpha (n=9)



Gals7 (n=13)



Figure 5

