



UNIVERSITE SIDI MOHAMED BEN ABDELLAH
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

Projet de Fin d'Etudes

Licence Sciences & Techniques

Sciences Biologiques Appliquées et Santé
(LST – SBAS)

**Apport de l'immunoreactivité de l'anticorps MDM2
dans les sarcomes**

Présenté par : Douae Zogarh

Encadré par : Pr Sefrioui Samira

Pr Bennis Sanae

Soutenu le : 9 juin 2016

Devant le jury composé de :

- Pr Sefrioui Samira
- Pr Bennis Sanae
- Pr BahafidWifak

Stage effectué à : la faculté de médecine et de pharmacie de
Fès

Année universitaire 2015-2016

Etude
Etude

bibliographique
bibliographique

Introduction

Les sarcomes sont des tumeurs rares (0,5-1% des tumeurs de l'adulte) qui se développent à tout âge, y compris chez l'enfant. Ils sont de localisation ubiquitaire. Leur rareté, mais également leur variabilité morphologique font que ces tumeurs représentent un véritable défi diagnostique pour le pathologiste. La classification de l'organisation mondiale de la santé (OMS) propose un typage histologique en fonction du type cytologique prédominant, et du grade qui repose sur certain nombre de critères histologique. Généralement on distingue deux types de sarcomes :

- Les sarcomes osseux qui se développent au niveau de l'os
- Les sarcomes des tissus mous Ce sont les sarcomes les plus fréquents. qui prennent naissance à partir des tissus conjonctifs, tissus graisseux Les principaux sarcomes des tissus mous chez l'adulte sont les liposarcomes, les léiomyosarcomes et les sarcomes à cellules fusiformes (tendons et ligaments).

La classification actuelle des sarcomes est complexe avec plus de 70 types et sous-types histologiques et est de ce fait peu reproductible. Ces tumeurs touchent cependant assez souvent des sujets jeunes, en particulier des enfants, et bénéficient actuellement de traitements efficaces mais lourds de plus en plus adaptés au type de sarcome en cause

Plusieurs anomalies génomiques simples, et probablement causales, ont été rapportées au cours des dernières années dans les sarcomes. Il s'agit principalement de translocations réciproques surtout présentes dans les sarcomes de l'enfant et de l'adulte jeune, de mutations activatrices dans les tumeurs stromales du tube digestif et d'amplifications simples dans les liposarcomes bien différenciés et dédifférenciés.

Les outils techniques utiles pour mettre en évidence ces translocations sont actuellement la RT-PCR et la FISH .ainsi que l'immunohistochimie qui nous permettra la détection de la surexpression du gène MDM2.

En effet dans ce projet réalisé seront abordées successivement la classification histologique de l'OMS et la classification moléculaire avec les principales cibles des altérations moléculaires observées dans les STM.

L'objectif sera surtout focalisé sur la détection d'expression protéique la stratégie donc adoptée consiste en l'utilisation de l'immunohistochimie.

I. Généralités

1-Définition des tissus mous

Les tissus mous peuvent être définis comme les tissus non épithéliaux extra-squelettiques de l'organisme, à l'exclusion des viscères, du tissu lymphoïde et du système nerveux central. Ils sont donc représentés par les muscles striés, la graisse, les tissus fibreux, les vaisseaux et le système nerveux périphérique (figure 1). Les tissus mous accomplissent de nombreuses fonctions dont les principales sont de soutenir, de protéger et de relier les tissus et structures du corps. Ils peuvent être le siège de tumeurs bénignes ou malignes, bien que les tumeurs bénignes (lipomes, angiomes) soient rarement explorées.

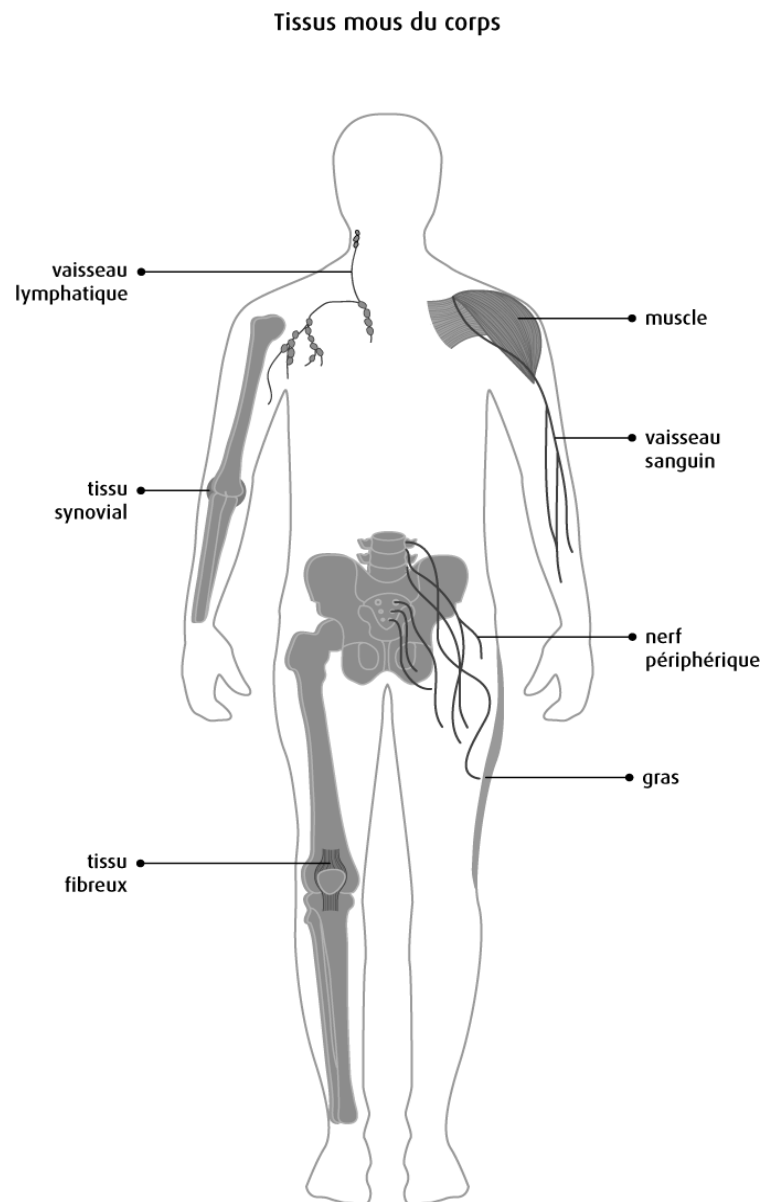


Figure 1 : Tissus mous du corps

2-Sarcomes des tissus mous

Selon l'OMS, Les sarcomes des tissus mous (STM) sont définis comme des tumeurs malignes, rares développées aux dépens du tissu conjonctif commun extra – squelettique comme le tissu adipeux, le tissu musculaire, les vaisseaux et le système nerveux périphérique, et pouvant survenir à tout âge.

Le sarcome se développant aux dépens d'un tissu graisseux s'appelle un «LIPOSARCOME», alors que celui provenant d'un muscle strié est un «RHABDOMYOSARCOME».

a-Sur le plan histologique

Leur histologie est complexe et variée, leur évolution est relativement sévère, (à 5 ans, le taux de survie est de l'ordre de 45 % et celui de la survie sans rechute est de 25 %)

Le diagnostic repose sur un examen histologique standard, complété par une étude immunohistochimique, et sur une analyse moléculaire à partir d'un échantillon représentatif obtenu à partir d'une biopsie chirurgicale. L'étude a pour **but** d'établir entre autre le grade histopronostique de la tumeur, qui constitue le facteur pronostique le plus important pour évaluer le risque de métastase. Plusieurs grading ont été proposés. Celui de la Fédération Nationale des Centres de Lutte Contre le Cancer (FNCLCC) utilise des critères simples tels que la différenciation, l'index mitotique et la nécrose tumorale, définissant trois grades d'agressivité croissante. Sa reproductibilité est évaluée à 75%

Ces sarcomes apparaissent plus souvent au niveau des membres qu'au niveau du tronc (figure 2).

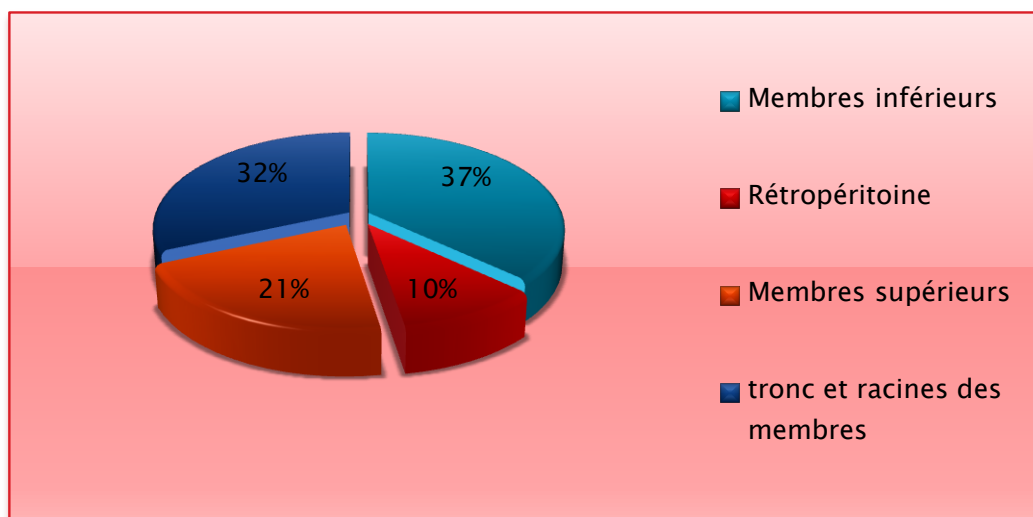


Figure2 : Répartition des sarcomes selon la localisation

II. Incidences

Les sarcomes de l'adulte représentent environ 1% de tous les cancers. Ils sont observés à tous les âges, mais l'incidence augmente avec l'âge ; 50% des STM sont observés après l'âge de 60 ans.

Incidences

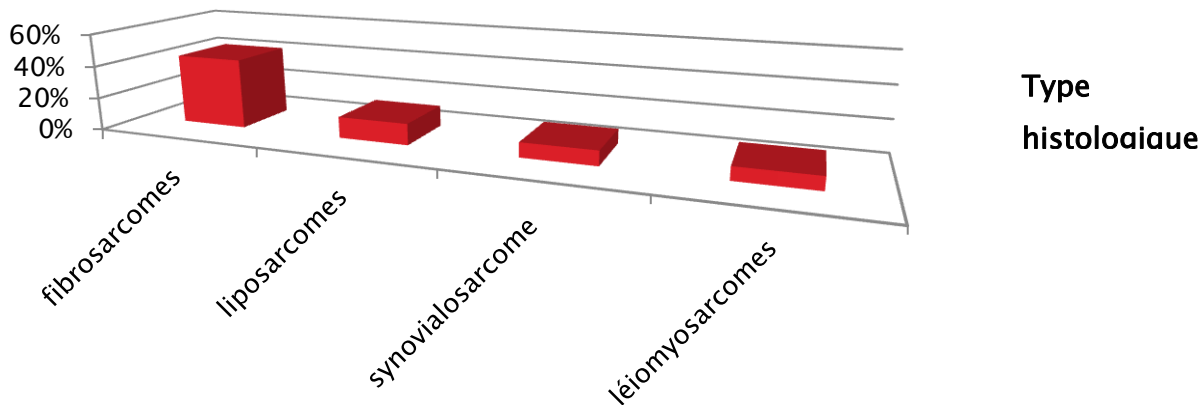


Figure 3 : incidence des sarcomes selon leurs types histologique

Les sarcomes des tissus mous (figure 3) les plus fréquents sont les fibrosarcomes (43%), suivis par les liposarcomes (13%), les synoviosarcomes (9%) et les léiomyosarcomes (8%).

A l'intérieur de ces différentes catégories, existent plusieurs sous-groupes de sarcomes qui vont avoir une topographie, une épidémiologie et un pronostic parfois très différents.

Les sarcomes sont rares mais regroupant un large spectre d'entités histopathologiques distinctes. Du fait de leur rareté et de leur difficulté diagnostique, l'épidémiologie des sarcomes reste mal connue. Les bases de données mondiales du CIRC montre un taux d'incidence relativement constant à travers le monde, estimé à 1-3 cas/100 000 pour les sarcomes des tissus mous (STM) et à 0,5 cas /100 000 pour les sarcomes osseux.

Néanmoins, les registres publient leurs données d'incidence par organe, ce qui tend à sous-estimer l'incidence réelle des sarcomes de localisation ubiquitaire.

Aux états unis, l'incidence annuelle est de 30 cas par un million d'habitants, moins de 1% de l'ensemble des cancers chez l'adulte, et aux alentours de 7% des cancers de l'enfant.

Entre 2004 et 2008, l'institut national des cancers a recensé 12814 cas de cancers des tissus mous dont 85,7% étaient des sarcomes.

En Europe, l'incidence annuelle des sarcomes des tissus mous de l'adulte est estimée à 3 – 4,5/100 000, soit environ 10 fois moins que les tumeurs bénignes des parties molles (incidence estimée à 300/100 000 habitants par an).

En France, les taux d'incidence annuelle sont estimés à 6 par 100000 habitants, chez les enfants de moins de 10 ans. L'incidence annuelle a été estimée à 0,9 pour 100000 par an .

Selon la littérature, La répartition homme-femme est équilibrée (toujours après exclusion des sarcomes de Kaposi), les tumeurs malignes des tissus mous sont 20 fois plus fréquentes chez l'homme que chez la femme.

III. Classification histologique

La classification proposée par l'OMS repose sur la mise en évidence d'une ligne de différenciation dans les cellules qui prolifèrent. L'aspect morphologique prédominant des cellules tumorales constitue le fil rouge de la démarche diagnostique. Ainsi, on peut classer les tumeurs en tumeurs à cellules fusiformes, à cellules rondes, à cellules pléomorphes, à cellules épithélioïdes... Les diagnostics histologiques possibles sont alors passés en revue en fonction du cadre morphologique et du contexte clinique.

1 - DONNEES HISTOLOGIQUES

Les STM peuvent être classés en trois grands groupes :

- Les STM gradés histologiquement de bas grade à haut grade. Ce sont les histiocytofibromes malins, les léiomyosarcomes, les liposarcomes, les fibrosarcomes et les tumeurs malignes des gaines des nerfs périphériques (schwannomes malins).
- Les STM non gradés. Ce sont les synoviosarcomes, les sarcomes épithélioïdes, les sarcomes à cellule claires, les sarcomes alvéolaires, les chondrosarcomes mésenchymateux. Ces sarcomes sont considérés comme de haut grade.
- Les Sarcomes à petites cellules qui sont de haut grade. Ce sont les sarcomes d'Ewing des parties molles, les rhabdomyosarcomes, les neuroblastomes, les sarcomes à petites cellules indifférenciés.

L'intérêt de la connaissance précise de l'histologie permet de prédire l'efficacité des traitements adjuvants et notamment la chimiothérapie. En pratique, les STM de bas grades ne se traitent que par la chirurgie. Pour les sarcomes de haut grade, la chimiothérapie et la radiothérapie sont associés au traitement chirurgical.

2- LA CLASSIFICATION HISTOLOGIQUE SELON L'OMS

La classification de l'OMS 2002 [1] reprend l'essentiel des données antérieures avec quelques modifications dues à une meilleure connaissance des lignes de différenciation et aussi du comportement biologique des tumeurs.

Ainsi, la notion de tumeur à malignité intermédiaire s'enrichit et se développe, en se scindant en deux sous-groupes, l'un est formé de tumeurs à potentiel de récurrence locale (type tumeur desmoïde), tandis que l'autre comporte des entités capables de donner parfois des métastases (type tumeur fibrohistiocytaireplexiforme), et s'approche donc des sarcomes, même si le taux de dissémination métastatique ne dépasse pas 2%.

Tableau 1 classification histologique des STM selon l'OMS 2002

Ligne de différenciation	Tumeurs à malignité intermédiaire (rarement métastasiantes)	Tumeurs malignes
Tumeurs adipeuses	*Tumeur lipomateuse atypique *Liposarcome bien différencié	*Liposarcome dédifférencié *Liposarcome myxoïde *Liposarcome à cellules rondes *Liposarcome pléomorphe *Liposarcome mixte *Liposarcome (sans autre spécification)
Tumeurs fibroblastiques myofibroblastiques	*Tumeur fibreuse solitaire *Hémangiopéricytome *Tumeurs myofibroblastique inflammatoire *Sarcome myéofibroblastique de faible grade *Sarcome fibroblastique myxoïnflammatoire *Fibrosarcome infantile	*Fibrosarcome de type adulte *Myxofibrosarcome *Sarcome fibromyxoïde de faible grade Et tumeur hyalinisante à cellules fusiformes *Fibrosarcome épithélioïde sclérosant
Tumeurs dites fibrohistiocytaires	*Tumeur fibrohistiocyttaire plexiforme *Tumeur à cellules géantes des tissus mous	*Sarcome indifférencié pléomorphe (« MFH pléomorphe ») *Sarcome indifférencié pléomorphe à cellules géantes (« MFH à cellules géantes ») *Sarcome indifférencié pléomorphe inflammatoire (« MFH inflammatoire »)
Tumeurs du muscle lisse		*Léiomyosarcome
Tumeurs péricytaires (périvasculaires)		*Tumeur glomique maligne
Tumeurs du muscle strié		*Rhabdomyosarcome embryonnaire (y compris à cellules fusiformes, botryoïde, anaplasique) *Rhabdomyosarcome alvéolaire (y compris solide, anaplasique) *Rhabdomyosarcome pléomorphe
Tumeurs vasculaires	*Hémangioendothéliome rétifforme *Angioendothéliome papillaire *Hémangioendothéliome composite *Sarcome de kaposi	*Hémangioendothéliome épithélioïde *Angiosarcome
Tumeurs chondro-osseuses		* Chondrosarcome mésoenchymateux * Ostéosarcome extrasquelettique
Tumeurs à différenciation incertaine	*Histicytofibrôme angiomatoïde *Tumeur fibromyxoïde ossifiante *Tumeur mixte- myoépithéliome- parachondrome	*Sarcome synovial *Sarcome épithélioïde *Sarcome alvéolaire des parties molles *Sarcome à cellules claires des tissus mous *PNET (tumeur périphérique neuroectodermique) *Tumeur d'Ewing extrasquelettique *Tumeur desmoplastique à cellules rondes *Tumeur rhabdoïde extra-rénale *Mésoenchymome malin *Tumeurs à différenciation périvasculaire épithélioïde (PECome) *Sarcome intimal

IV. Différentes anomalies moléculaires

Les sarcomes constituent un groupe hétérogène de tumeurs de classification complexe et peu reproductible. Cependant, au cours des dix dernières années, et Parallèlement au développement des thérapies ciblées, est apparue une classification moléculaire des sarcomes, basée sur la présence d'anomalies cytogénétiques récurrentes à type de translocations, amplifications d'oncogènes et perte de gènes suppresseurs de tumeur [3].

Environ la moitié des sarcomes sont porteurs d'au moins une anomalie moléculaire. La recherche de ces anomalies se fait idéalement sur tissu tumoral congelé. Plusieurs grands groupes de sarcomes ont été identifiés en fonction du type d'anomalie moléculaire qui les caractérise :

1-sarcomes avec translocation réciproque

Représentent environ 10 à 15 % de l'ensemble des sarcomes. La présence d'une translocation réciproque dans le sarcome d'Ewing a été la première translocation rapportée dans une tumeur solide humaine par deux équipes françaises en 1983 [4, 5].

Les sarcomes avec translocation ont plusieurs points communs : il s'agit habituellement de tumeurs qui surviennent chez des patients jeunes, qui sont constituées de petites cellules rondes ou fusiformes monomorphes et sont assez souvent agressives. Ces sarcomes peuvent être utilisés comme marqueur diagnostique. les translocations peuvent être mises en évidence par RT-PCR à partir d'ARN messagers extraits de tissu congelé ou de tissu fixé et inclus en paraffine. Il est fortement recommandé d'utiliser une technique de RT-PCR en temps réel qui est bien adaptée à la routine et, en particulier, diminue de manière importante le risque de contamination. Ou par technique de FISH qui peut être réalisée à partir d'empreintes cellulaires, de coupes congelées et de coupes en paraffine. Avec plusieurs sondes encadrantes disponibles dans le commerce.

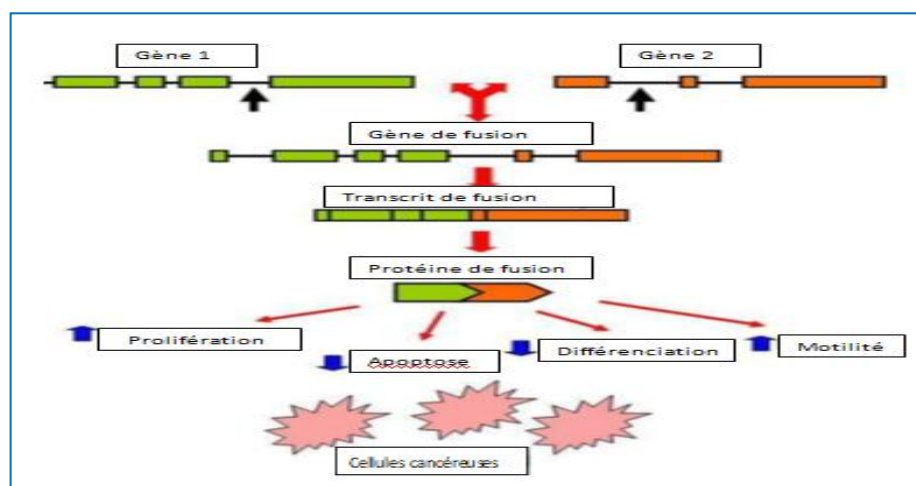


Figure 4 : Représentation schématique d'une translocation générant un cancer

2-sarcomes avec un profil génomique en présence d'amplifications

Il s'agit principalement des tumeurs adipeuses atypiques ou liposarcomes bien différenciés, des liposarcomes dédifférenciés [10] et plus accessoirement du sarcome intimal (sarcome peu différencié des gros vaisseaux) et de l'ostéosarcome parostéal. Cette amplification implique MDM2 dans tous les cas et CDK4 dans 90 % des cas.

La catégorie des tumeurs adipeuses bien différenciées ou liposarcomes bien différenciés et liposarcomes dédifférenciés représente 10 à 15 % de l'ensemble des sarcomes et à peu près 80 % des liposarcomes.

La Co-amplification MDM2 et CDK4 est certainement responsable du processus tumoral : MDM2, en tant qu'inhibiteur de p53, augmente la survie cellulaire tandis que CDK4, en tant qu'inhibiteur de RB1, augmente la prolifération cellulaire

- la mise en évidence d'une amplification de MDM2 et CDK4 constitue le marqueur diagnostique de ce type de tumeurs. Cette détection peut être faite par IHC qui montre une hyperexpression de ces deux gènes. Il convient cependant de savoir qu'une hyperexpression du gène MDM2 existe dans environ 20 % des sarcomes autres que le liposarcome bien différencié ou dédifférencié [12], et que dans les cas difficiles la recherche d'une amplification par technique de FISH est requise pour le diagnostic [13].

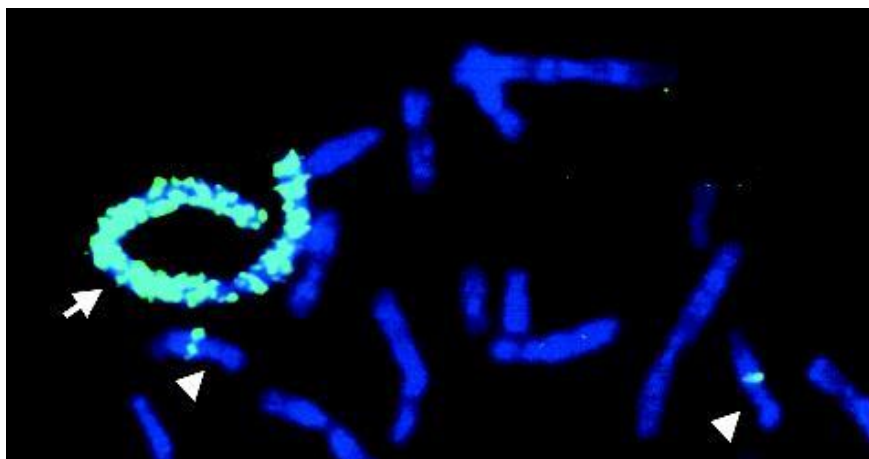


Figure 5 : Détection par hybridation *in situ* en fluorescence (FISH) de l'amplification du gène *MDM2* sur un chromosome géant surnuméraire d'un cas de liposarcome bien différencié.

3-sarcomes avec une mutation activatrice

Il s'agit des tumeurs stromales du tube digestif ou GIST (gastro-intestinal stromaltumor) qui présentent des mutations activatrices des gènes KIT ou PDGFRA.

Sur le plan histologique

Dans 70 % des cas ces tumeurs sont constituées exclusivement de cellules fusiformes, de cellules épithélioïdes ou d'un mixte des deux types de cellules.

Il existe, en fait, dans ces tumeurs une mutation au niveau des gènes KIT ou PDGFRA qui codent pour des récepteurs tyrosines-kinases de type III.

Ces mutations sont exclusives l'une de l'autre et les GIST non traitées ne présentent qu'une seule mutation. Environ 80 % des GIST présentent une mutation du gène KIT

- le plus souvent au niveau de l'exon 11 de situation juxtamembranaire dans les deux tiers des cas.
- plus rarement au niveau de l'exon 9 extracellulaire.
- exceptionnellement au niveau de l'exon 13 ou de l'exon 17.

→ La mise en évidence de ces mutations est utile pour le diagnostic des rares GIST, négative pour le CD117 en IHC

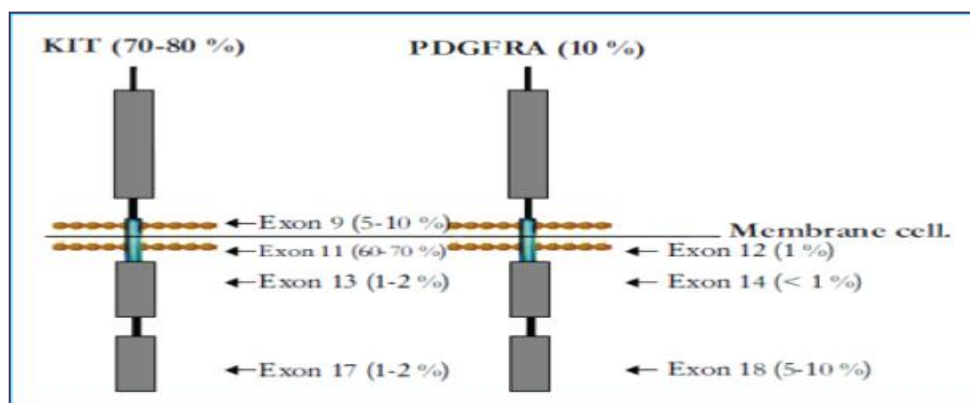


Figure 6 : Les mutations de KIT ou PDGFRA conduisent à une activation permanente du récepteur tyrosine-kinase indépendamment du ligand.

4-sarcomes avec mutation inactivatrice

Ils résultent de la perte de la fonction protéique. L'exemple est la tumeur rhabdoïde maligne avec une inactivation bi-allélique du gène INI1 et qui peut être mise en évidence par immunohistochimie.

5-sarcomes à profil génomique complexe

Caractérisé par de nombreux gains et des pertes géniques, avec fréquemment perte du gène RB1 et altération de p53.

Les léiomyosarcomes, rhabdomyosarcomes pléomorphes, liposarcomes pléomorphes, myxofibrosarcomes et sarcomes peu différenciés (anciens histiocytofibromes malins et fibrosarcomes) appartiennent à cette catégorie et ne montrent pas d'anomalie spécifique.

V. Les liposarcomes

1 - Généralités

Les liposarcomes ont été décrits pour la première fois par R. Virchow en 1857

se sont les sarcomes des tissus mous les plus répandus chez l'adulte mais restent, comme tous les sarcomes, une maladie rare.

Les liposarcomes sont des tumeurs cancéreuses dérivées de cellules primitives qui ont suivi une différenciation adipocytaire qui, se développant à partir des cellules graisseuses, sont régulièrement confondues avec des tumeurs bénignes appelées « lipomes ».

Ils sont généralement de grosses tumeurs volumineuses, et ont tendance à avoir plusieurs petits satellites qui vont au-delà des principales limites de la tumeur

→ Le liposarcome se développe principalement :

- chez les adultes d'âge moyen ;
- chez les personnes ayant entre 50 et 65 ans.
- Les hommes sont très légèrement plus touchés que les femmes.

Le liposarcome est susceptible de faire son apparition dans **n'importe quelle région du corps**.

Néanmoins, on le retrouve le plus souvent au niveau :

- de la cuisse dans plus de 50 % des cas.
- du rétro péritoine (partie postérieure de la cavité abdominale) dans 30 % des cas .
- des membres supérieurs dans 10 % des cas.
- de la tête et du cou dans 5 % des cas.

Beaucoup plus exceptionnellement, on retrouve une localisation au niveau des aisselles, du cordon Spermatique, du sein, de la vulve ou au niveau intra-péritonéal (à l'intérieur du péritoine)

La gravité et le pronostic des liposarcomes dépend :

- de leur grade et de leur sous-type :
 - la survie à 5 et 10 ans va de 85 à 100 % pour les liposarcomes différenciés.
 - de 40 à 56 % pour les liposarcomes pléiomorphes.
 - de 76 à 88 % pour les liposarcomes myxoïdes.

- de la localisation de la tumeur primitive.
- de la qualité de la chirurgie pratiquée (les rechutes sont fréquentes lorsque quelques cellules cancéreuses restent présentes après la chirurgie) .
- de l'existence ou non de métastases.

2-Classification des liposarcomes selon l'OMS 2002

La nouvelle classification de l'organisation mondiale de la santé implique les caractéristiques anatomo-pathologiques et les anomalies moléculaires des liposarcomes, et individualise trois différents types auxquels est corrélée leur évolution: les liposarcomes bien différenciés/dédifférenciés, les liposarcomes myxoïdes/à cellules rondes, et les liposarcomes pléomorphes (tableau 2).

Tableau 2 :Sous-types de liposarcomes

<p>Bien différenciés</p>	<p>liés à une anomalie du 12e chromosome</p> <p>Inclut les lipomes atypiques</p> <p>Sous-type le plus courant (50% des liposarcomes)</p> <p>Bas grade (ne métastase pas mais peut réapparaître localement)</p> <p>Risque de dédifférenciation</p> <p>d'évolution lente ;</p> <p>pouvant être extrêmement volumineux ;</p> <p>récidives fréquentes</p>
<p>Myxoïdes</p>	<p>Grade intermédiaire</p> <p>Inclut la variété à cellules rondes comme son homologue de haut grade</p> <p>Catégorie la plus fréquente chez les enfants</p> <p>Risque de métastases en particulier pour la variété à cellules rondes</p> <p>liés à un échange de matériel génétique entre les chromosomes 12 et 16</p> <p>souvent localisés dans les membres</p>
<p>Pléomorphes</p>	<p>Catégorie la plus rare (5 à 10% des liposarcomes)</p> <p>Grade élevé</p> <p>Risque élevé de récurrence locale et métastases</p> <p>souvent localisés dans les membres ;</p> <p>relativement rares (pas plus de 10 % des liposarcomes) ;</p> <p>risques élevés :</p> <ul style="list-style-type: none"> -de récurrences (dans 30 % des cas) ; -de métastases pulmonaires (dans 40 % des cas).
<p>Dédifférenciés</p>	<p>liés à une anomalie sur le 12e chromosome</p> <p>Sarcome de haut grade apparaissant en association avec un liposarcome bien différencié (HFM, fibrosarcome)</p> <p>La plus commune des lésions rétro péritonéales</p> <p>Risque de métastases</p>

VI. Voies de signalisation mdm2 et p53

La protéine MDM2 joue un rôle majeur dans la régulation de p53. En effet, en absence de stress, ces deux protéines régulent mutuellement leur niveau d'expression selon une boucle de rétroaction [8,9].

Le facteur de transcription p53 est une protéine antiproliférative et pro-apoptotique. L'accumulation de p53 dans la cellule peut induire l'arrêt de cycle cellulaire en phase G1 ou G2 et/ou l'apoptose, imposant une régulation stricte du niveau de p53 dans les cellules en l'absence de stress.

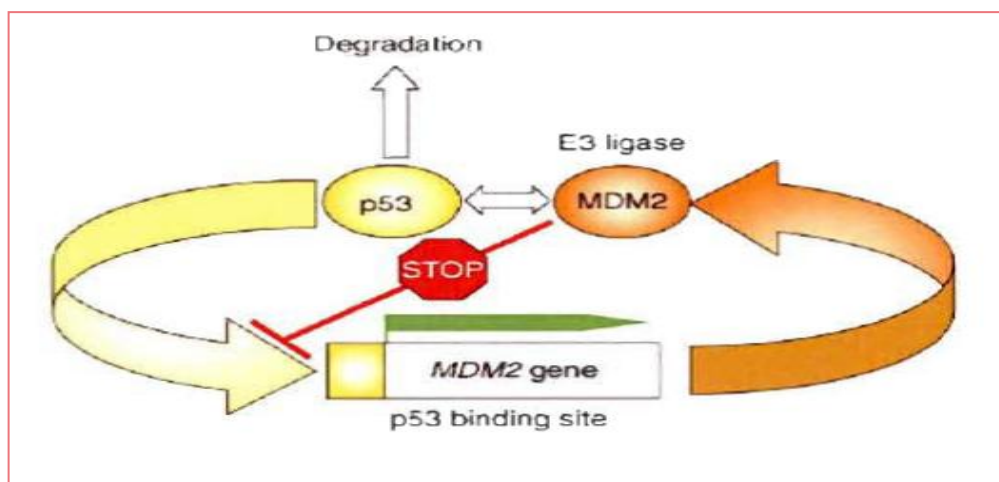


Figure 7 :

Boucle de rétroaction des régulations de MDM2 et p53.

La transcription de MDM2 est activée par de fortes concentrations de p53 puisque le promoteur de MDM2 contient un élément de réponse à cette protéine. En retour MDM2 se lie à p53, inhibant son activité de transcription et par conséquent sa propre expression [10].

➔ MDM2 peut réguler l'activité de p53 selon trois voies:

- Inhibition de la transcription,
- Export de p53 hors de noyau vers le cytoplasme,
- Activation de la dégradation de p53 par le protéasome grâce à son activité ubiquitine ligase.

La surexpression de MDM2 résultant de l'amplification de ce gène induit l'inhibition de P53 responsable de l'arrêt de cycle cellulaire en phase G1 ou G2 et/ou l'apoptose, ce qui entraîne une prolifération continue des cellules.

VII. Murine Double Minute 2

Le MDM2 est un oncogène impliqué dans un certain nombre de processus tumoraux [11], de nature épithéliale [12,13] ou conjonctive [14,15]. L'amplification de ce gène est constante dans les sarcomes [16,17].

- Deux types de résultats ont, par la suite, permis de classer MDM2 parmi les oncoprotéines :
- 1) l'augmentation du potentiel tumorigène de cellules murines présentant une expression élevée du gène *mdm2*.
 - 2) l'observation que différents types de tumeurs humaines présentent un gène *mdm2* amplifié aboutissant à une surexpression de la protéine.

A cet égard, un récent travail de compilation de données a montré que ce sont les tumeurs des tissus mous et les ostéosarcomes qui présentent les plus forts taux d'amplification du gène *mdm2* (20 % et 16 % de ces tumeurs respectivement)

D'autres mécanismes, cependant, peuvent aussi aboutir à une accumulation de la protéine MDM2 dans des cellules tumorales humaines. Ainsi, une surexpression des ARN et de la protéine a été observée dans diverses leucémies, en absence d'amplification du gène et une augmentation spécifique du niveau de traduction du messager *mdm2* a été décrite dans plusieurs types de tumeurs.

Le gène humain MDM2 (appelé également « hDM2 »), localisé sur le chromosome 12 (région 12q14-q15), code pour une protéine nucléaire ayant une masse de 90/95 kDa avec 5 régions conservées phylogénétiquement :

- Région amino-terminal essentiel pour la liaison de p53 plus autres protéines.
- Région acide (composée d'acide glutamique et aspartique) important pour l'ubiquitination de p53.
- Domaine doigts de zinc.
- Domaine carboxy-terminal, assure à MDM2 son activité ubiquitin ligase. [17]

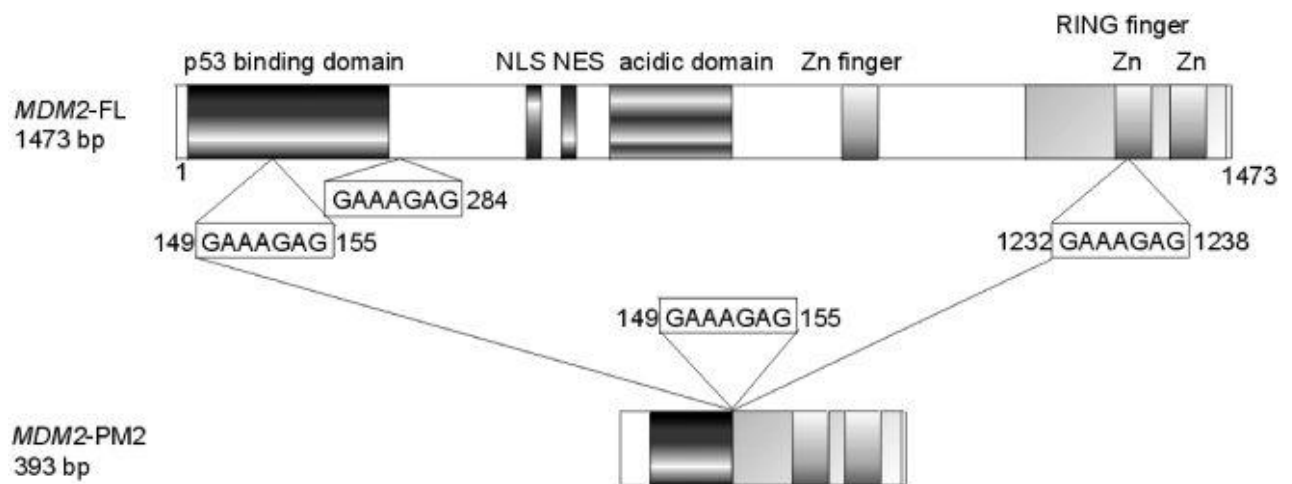


Figure 8 : différentes régions constituant le gène MDM2

materiel
materiel

et
et

methodes

methodes

Il s'agit d'une étude rétrospective menée entre l'unité de génétique médicale et oncogénétique et le service d'Anatomopathologie au Centre Hospitalier Universitaire (CHU) Hassan II de Fès. L'étude est réalisée sur une série de 21 patients présentant des sarcomes des parties molles en particulier le liposarcome dédifférencié et bien différencié,

Le travail réalisé consiste d'abord en une étude histologique des prélèvements reçus, suivi d'une étude immunohistochimique en utilisant des anticorps spécifiques.

Il est important de préciser que les échantillons destinés au laboratoire d'anatomopathologie doivent être rapidement placés dans une solution de fixation et transporté au laboratoire d'oncogénétique

Le matériel biologique correspond à des prélèvements tissulaires obtenus par résections chirurgicales ou à des biopsies, collectées au Service d'anatomie pathologique du CHU Hassan II de FES.

I. Examen histologique sur tissu fixé

Les prélèvements destinés au laboratoire pour un examen histologique, passent par une série d'étape avant qu'ils ne soient lus et interprétés par le pathologiste responsable.

La technique est réalisée en six étapes, qui sont principalement:

- La fixation.
- L'inclusion.
- L'enrobage.
- La microtomie.
- La coloration.
- Le montage.

1-Fixation

Elle constitue une technique de référence pour l'étude histologique des prélèvements humains destinés à un examen anatomopathologique. Il s'agit d'une étape essentielle dans la préparation tissulaire.

Le but de la fixation est d'éviter l'autolyse tissulaire, la putréfaction, d'assurer la conservation des structures et le durcissement des pièces, afin de garder le prélèvement dans un état aussi proche que possible de l'état vivant. Cette étape doit être réalisée le plus tôt possible.

La fixation se déroule pendant une nuit, au formol [10%] ou encore au Bouin. Un examen macroscopique est d'abord réalisé, en faisant une description détaillée du prélèvement (taille mesurée dans les trois dimensions, couleur, forme, aspect à la coupe, ...etc.) et les biopsies seront incubées par la suite dans des cassettes en plastique.



Figure 9 : cassette en plastique

N.B :

Quand il s'agit d'un fragment osseux, il doit être décalcifié par l'acide nitrique (5%) pendant 1h, avant qu'il ne soit fixé par le formol.

2-Inclusion

Elle a pour but d'enfermer le prélèvement dans une substance qui le pénètre et l'infiltrer. Les tissus acquièrent ainsi une consistance permettant d'obtenir des coupes minces au microtome. La substance d'inclusion, généralement l'aparaïne, est une substance liquide à chaud, solide à température ambiante et insoluble dans l'eau et dans l'alcool.

Comme cette substance est hydrophobe (non miscible à l'eau), la pièce anatomique doit être entièrement déshydratée avant son inclusion dans la paraffine. Vu qu'elle est aussi insoluble dans l'alcool utilisé pour la déshydratation ; une double substitution doit être réalisée, l'eau est remplacée par de l'alcool (déshydratation) qui sera remplacé à son tour par le toluène (substitution).

Pour réaliser cette étape, un automate appelé histokinette, et qui peut se charger de toutes les phases d'inclusion est utilisé.



Figure 10 : histokinette

La circulation est l'étape qui consiste à faire séjourner les pièces dans une série de liquides intermédiaires :

1-Fixation : 2 bains de formol 10%,

30min chacun

2-Déshydratation : 5 bains d'alcool de degré croissant 75, 80, 90, 95°, absolu

1h, 1h, 1h, 1h30min, 2h

3-Eclaircissement : 3 bains de toluène

1h, 1h30min, 2h

4-Enrobage : 2 bains de paraffine

2h, 3h

La déshydratation par l'alcool consiste à débarrasser le tissu de l'eau qu'il contient, tenant compte que l'agent déshydratant doit être miscible en même temps à l'eau et à la paraffine.

L'éclaircissement par le toluène est une étape qui réalise le remplacement de l'alcool par un solvant de la paraffine, qui est destiné à chasser l'alcool par trois bains successifs de toluène.

En remplaçant l'agent déshydratant, le toluène rend le tissu transparent, d'où le nom d'éclaircissement.

L'enrobage dans la paraffine, est l'étape terminale de la circulation, réalisée par passage du tissu dans la paraffine liquide.

L'inclusion ne se fera de façon satisfaisante que si la pièce à couper ne contient ni eau ni solvant intermédiaire (alcool).

3-Enrobage

Il se fait par la même substance d'inclusion, et consiste à enrober le fragment par de la paraffine, afin d'obtenir un bloc facile à manipuler que le tissu seul, et qui peut s'attacher à la pince porte-objet du microtome sans briser la pièce.

La préparation des blocs de paraffine se fait au moyen d'un petit moule préalablement chauffé dans lequel de la paraffine fondue est versée grâce à un distributeur de paraffine.

Après refroidissement complet, le bloc de paraffine est démoulé.

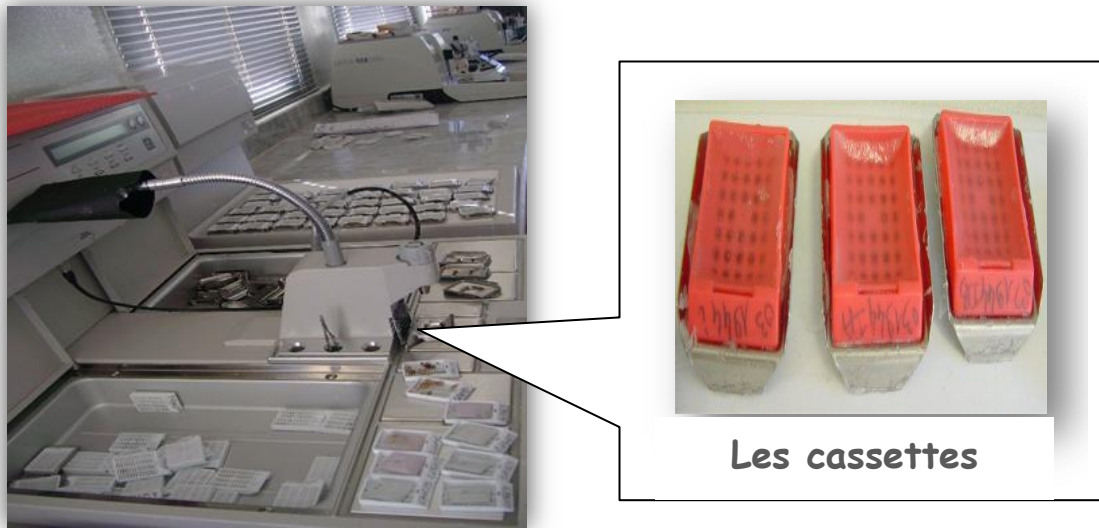


Figure 11 : Appareil d'enrobage

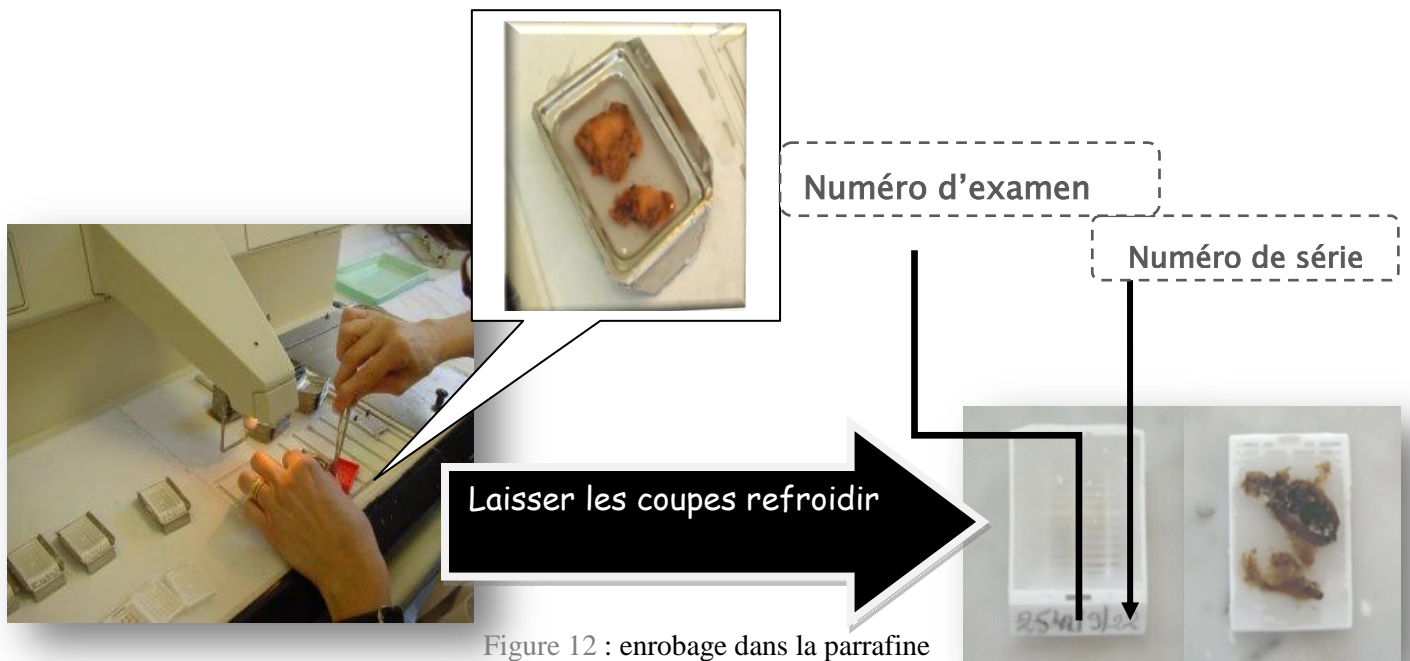


Figure 12 : enrobage dans la paraffine

4-Réalisation des coupes : microtomie

Après montage du bloc dans le porte-bloc du microtome destiné à produire de fines tranches de matière (coupes 3-5 μ m), la réalisation des rubans est effectuée.

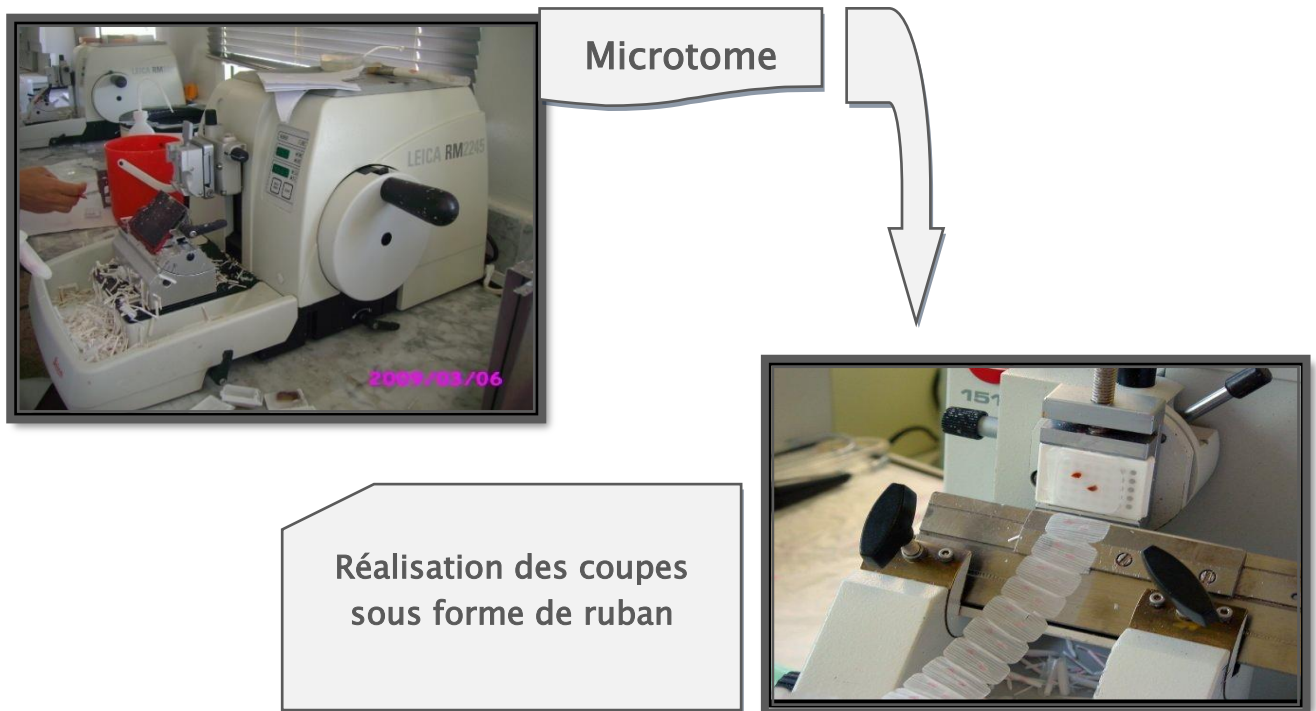


Figure 13: Microtomie

Ces coupes sont immergées dans des bains d'alcool, puis étalées en les dépliant sur la lame par flottation à la surface d'un bain chaud.



Figure 14 : Bain marie

→ Rébitées en coupes, les pièces anatomiques doivent être colorées.

5-Coloration

La coloration histologique est celle qui permet de différencier finement tous les éléments d'un tissu. Elle consiste à accentuer les contrastes pour mieux reconnaître les différents éléments de la préparation.

La coloration utilisée est de type H.E.S (hématoxyline-éosine safran) qui a pour but de permettre la mise en évidence des noyaux et du cytoplasme des cellules ainsi que des fibres de collagène (s'ils existent). L' hématoxyline colore les noyaux en violet, l'éosine colore le cytoplasme en rose, et le safran se charge de colorer les fibres de collagène en jaune.

Avant de colorer les coupes les lames doivent être préparées :

- Déparaffinage

Consiste à enlever la paraffine de la coupe tissulaire pour que les colorants (préparés en phase aqueuse), puissent pénétrer le tissu et le colorer.

Ce déparaffinage consiste à mettre les lames dans l'étuve sous une température de 70°C pendant une heure, puis de les plonger dans le toluène.

- Hydratation

Elle a pour objet de retirer le toluène du tissu et le remplacer par de l'eau. Le toluène et l'eau n'étant pas miscibles, le toluène est d'abord remplacé par l'alcool, et les coupes sont ensuite passées dans un bain d'eau courante, permettant de remplacer l'alcool par l'eau.

La coloration des coupes par Hématéine-Eosine-Safran (HES)

Les coupes sont colorées par l'hématéine pendant 5 à 7 min. Un rinçage à l'eau courante puis à l'eau distillée est ensuite réalisé. Après transfert dans le carbonate de lithium (facultatif), les coupes sont rincées à l'eau courante puis distillée, et ensuite colorées dans une solution d'éosine à 1 % pendant 2 min. Un rinçage rapide à l'eau courante est réalisé, suivi d'une déshydratation dans l'alcool à 100°. Les coupes sont enfin colorées dans le safran alcoolique pendant 1 min, et passées rapidement dans les alcools (Méthanol - Ethanol pour éclaircissement). Le montage des coupes se fait au toluène.



Figure 15 : les différents colorants Figure 16 : Appareil de coloration

La coupe, ainsi colorée, est protégée définitivement par une lamelle de verre collée à l'aide d'un produit synthétique transparent qui se polymérise à l'air.

6-Montage

Il permet une protection mécanique des coupes, ainsi qu'une protection chimique des colorants.



Figure 17 : Lames montées et colorées

Après le montage, les lames sont classées dans des portoirs, accompagnées de leurs fiches d'identification, afin qu'elles soient prêtes à l'examen au microscope par les pathologistes responsables.

7-Lecture et interprétation des résultats

Les coupes obtenues sont le fruit de procédures techniques, qui requièrent toutes les différentes étapes successives de l'examen histologique. L'analyse microscopique de ces coupes,

faite par les pathologistes responsables, permet d'affirmer ou d'infirmier le caractère tumoral d'une lésion ou d'une tumeur.

La lecture des lames se fait au faible grossissement en utilisant impérativement des objectifs plans pour avoir une bonne vue de l'ensemble des tissus, cette lecture mettra en évidence les critères de malignité

II. Immunohistochimie (IHC)

Cette technique est l'outil quotidien du diagnostic anatomopathologique. Plus de 20 ans d'usage l'ont perfectionnée, enrichie, et surtout standardisée. Schématiquement, c'est un système de mise en évidence immunologique à trois étages : anticorps spécifique appliqué sur l'antigène, système de révélation et d'amplification fondé sur une association d'anticorps et de peroxydase, chromogène visualisant la réaction (fig.20). Ces opérations sont maintenant réalisées par des automates, et font l'objet de contrôles d'assurance qualité.

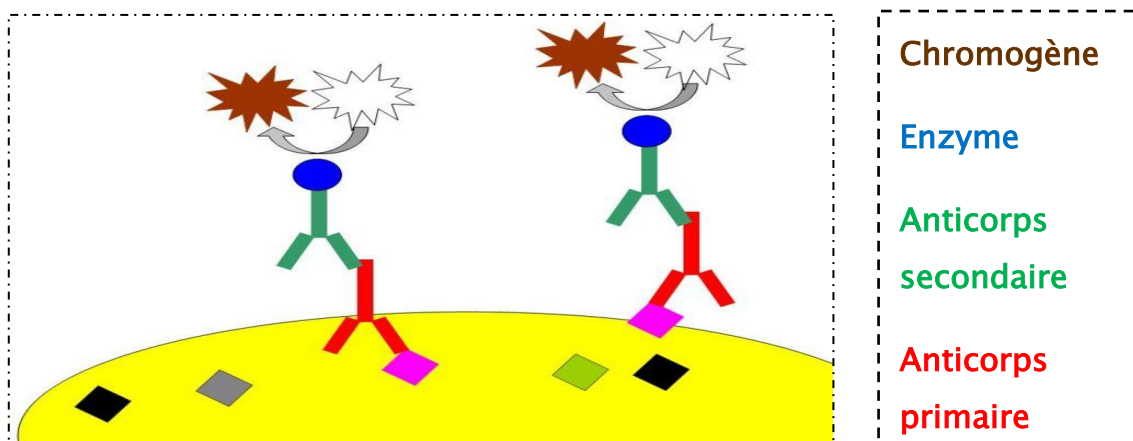


Figure 18 : Composants de la réaction immunohistochimique

PROTOCOLE EXPERIMENTAL DE L'IMMUNOHISTOCHEMIE MANUELLE

La préparation des lames pour l'IHC commence par le déparaffinage. Cette opération nécessite le passage des lames une nuit à l'étuve à 60°C. Les lames sont ensuite déparaffinées grâce à 2 bains de toluène absolu (5-10 min chacun) et 2 bains d'alcool absolu (5-10 min chacun). Un rinçage à l'eau courante est effectué pendant 10 min.

Ensuite, après avoir égoutté les lames, elles sont passées dans H₂O₂ à 3% pendant 10 min.

Plusieurs tissus contiennent des peroxydases endogènes qui peuvent donner des réactions non spécifiques, les tissus sont donc traités par H₂O₂ puis rincés avec l'eau courante.

Après cette opération, ils sont placés dans le tampon citrate bouillant (95°C) pendant 20 min. le démasquage antigénique permet aux anticorps d'accéder aux antigènes en rompant les liaisons covalentes et intramoléculaires entre les protéines, les glycoprotéines, les polysaccharides et les acides nucléiques.

Les lames sont à nouveau rincées avec du PBS pendant 5 min. Elles sont par la suite égouttées et les fragments sont entourés par le PAP-PEN.

Le bloquant est déposé sur le fragment (lait écrémé 0,4%) pendant 15 min dans une chambre humide, le surplus du bloquant est enlevé en secouant la lame. L'anticorps primaire est appliqué pendant 1 heure. Les lames sont rincées 2 fois pendant 10 min dans du PBS. L'anticorps secondaire est appliqué pendant 15 min et les lames sont ensuite rincées dans 2 bains de PBS 5 min chacun. La peroxydase est appliquée pendant 15 min et les lames sont ensuite rincées dans 2 bains de PBS pendant 10 min.

Le substrat chromogène fraîchement préparé (2 gouttes +5 ml d'AEC) est appliqué pendant 15 min. Un rinçage à l'eau courante est effectué suivi par un égouttage des lames.

L'hématoxyline est appliquée sur chaque lame pendant 4 min afin de colorer les noyaux. Les lames sont rincées à l'eau courante et sont passées rapidement dans du carbonate de lithium saturé. Cette opération est suivie d'un rinçage à l'eau de robinet. Le montage des lames se fait finalement dans un milieu de montage et les lames seront en suite observées sous microscope photonique.

Results

Results

et
et

discussion

discussion

I. Caractéristiques générales de la population

1-Répartition des liposarcomes selon l'âge

L'étude de la répartition des malades selon les tranches d'âge (figure 19) montre un pic de fréquence, entre 51 et 60 ans, avec 9 cas soit 42.85%

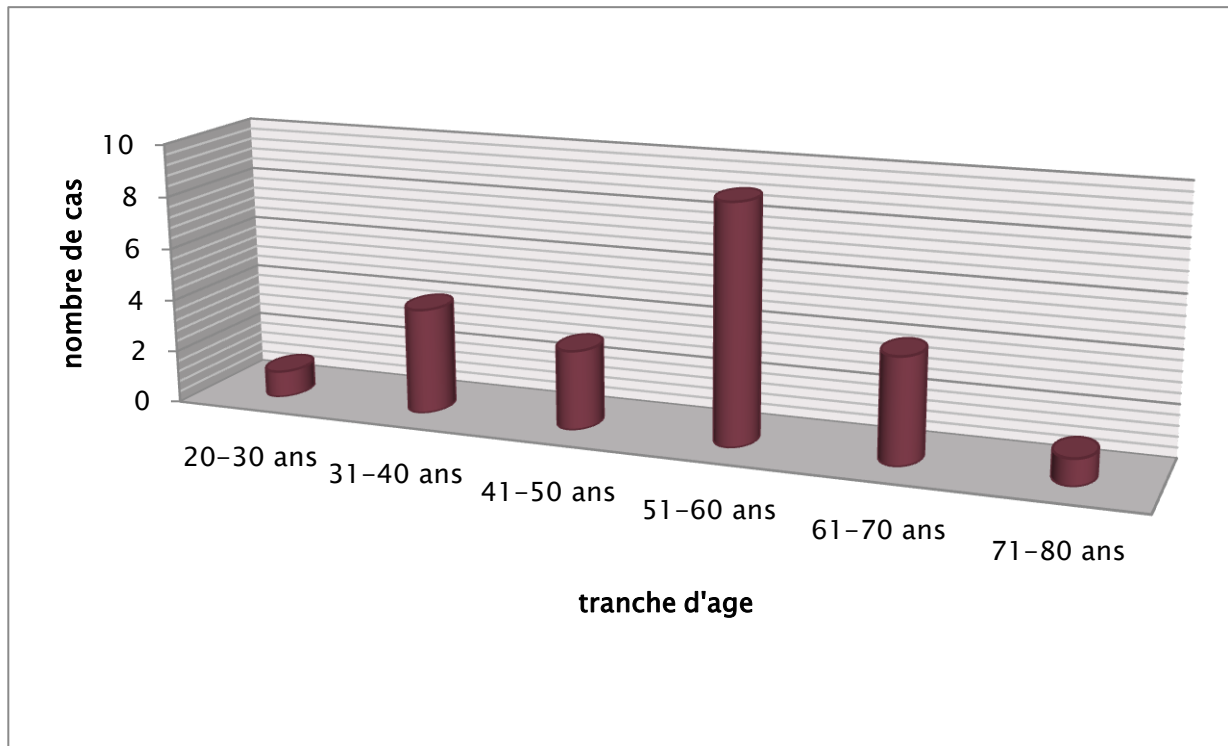


Figure 19 : Répartition des patients selon les tranches d'âge

2-Répartition des liposarcomes selon le sexe

L'étude de la répartition des liposarcomes selon le sexe,(figure 20) montre une légère prédominance féminine avec 52,38 % (11 cas) et 47,61% d'hommes (10 cas).

Avec un sex-ratio M/F est de 0.9



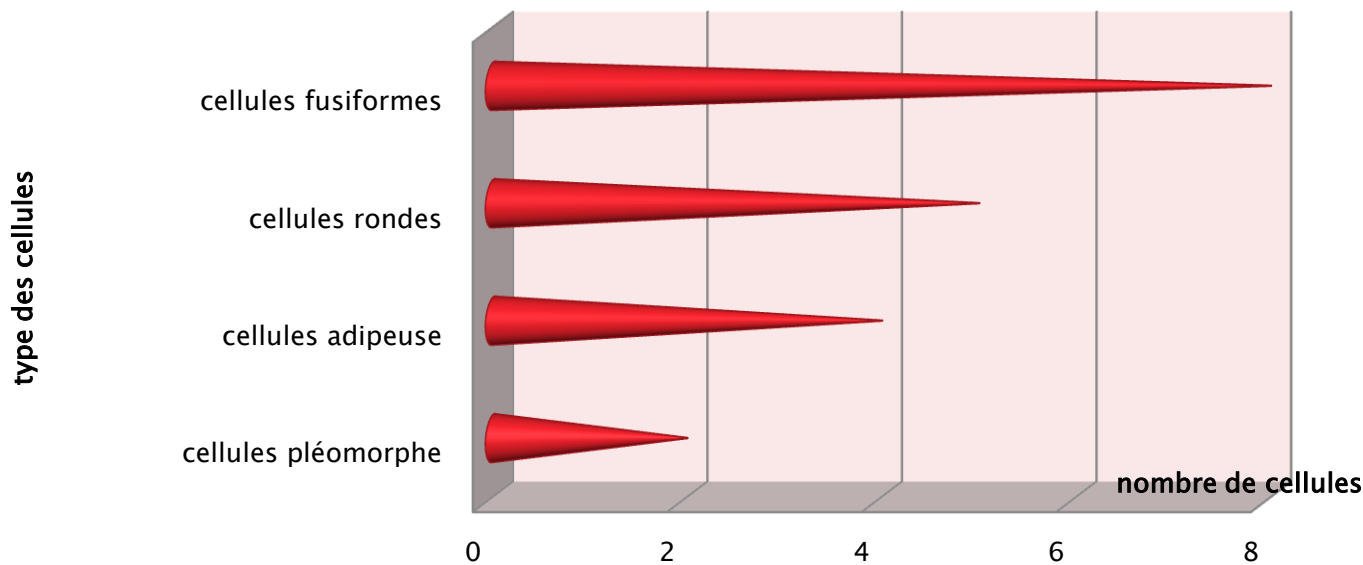
Figure 20 : Répartition des liposarcomes étudiés selon le sexe

3-Répartition des liposarcomes selon l'aspect des cellules

Les deux types de cellules les plus souvent rencontrés au niveau des sarcomes, sont les cellules fusiformes dans 8 cas soit (42.10%), les cellules rondes dans 5 cas soit (26.31%).

Les tumeurs à cellules adipeuses présentes dans 4 cas soit (21.05%) alors que pour les cellules pléomorphes ont été noté dans 2 cas soit (10,52%)

répartition des cas selon le type histologique des cellules



	cellules pléomorphe	cellules adipeuse	cellules rondes	cellules fusiformes
■ répartition des cas selon le type histologique des cellules	2	4	5	8

Figure 21 : Répartition des liposarcomes en fonction de l'aspect des cellules

4-Répartition des liposarcomes selon la localisation

tenant compte de ce qu'on a évoqué dans l'étude bibliographique en comparant avec les résultats obtenus on peut déterminer 6 régions de développement de la masse tumorale.

Selon les cas traités dans notre étude , on peut noter une concentration des tumeurs au niveau des membres inférieurs, tel que la jambe , la cuisse à un pourcentage de 57,14% (figure 22) , le psoas (muscle qui commence au niveau de la hanche jusqu'au bassin)...ainsi qu'au niveau de la région abdo-pelvienne comme la tuméfaction scrotale (dans le scrotum)

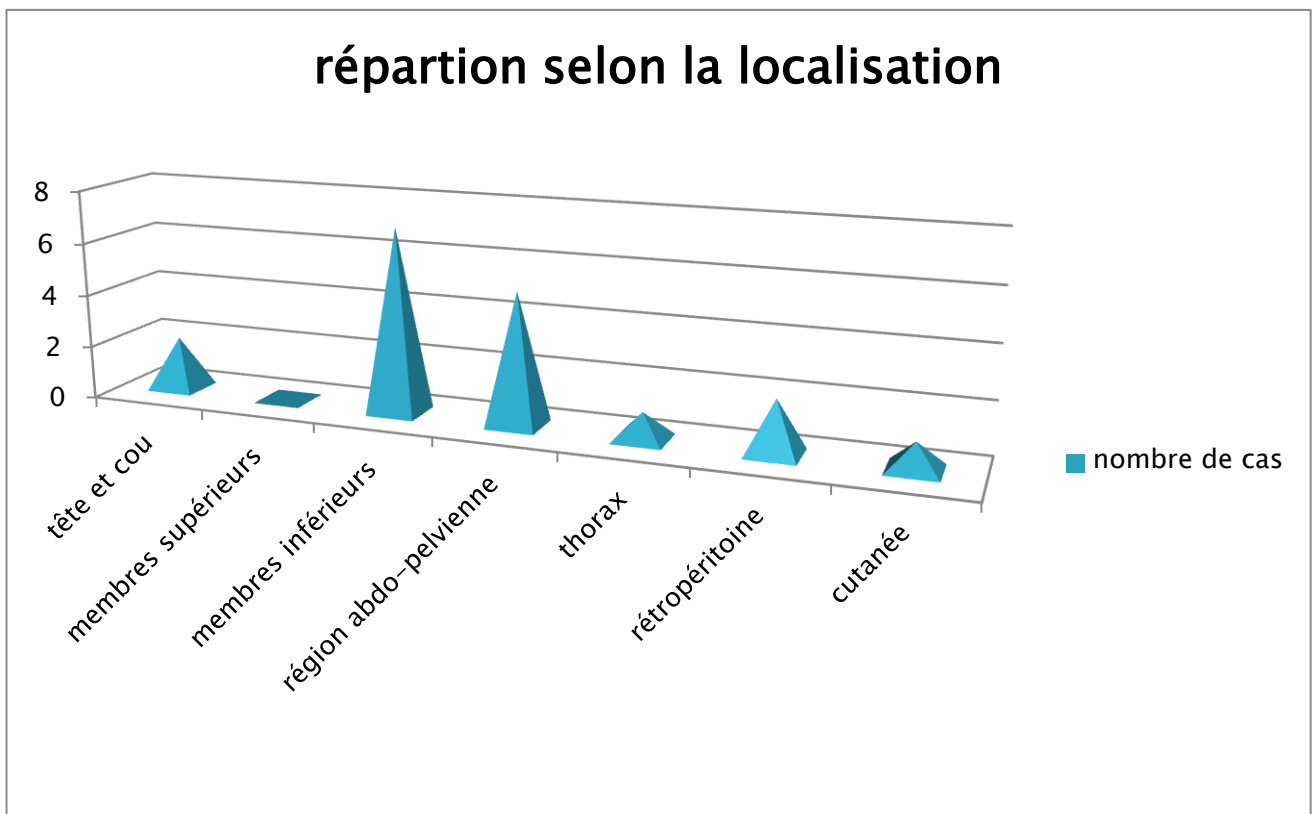
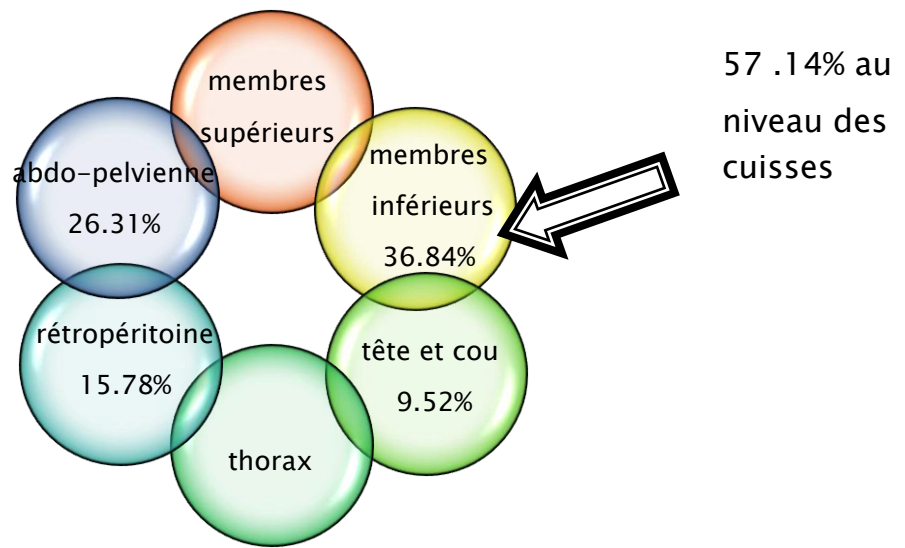


Figure 22 : répartition des cas selon la localisation

II. Immunohistochimie des Liposarcomes

Dans l'étude immunohistochimique nous avons utilisé l'anticorps anti-MDM2 comme marqueur des liposarcomes.

L'expression de cet anticorps est visualisée dans la figure 23.

Pour les 21 cas étudiés, (figure 24) les résultats ont été positifs pour 18 cas soit (85.71%) et négatifs pour 14.28% des cas .

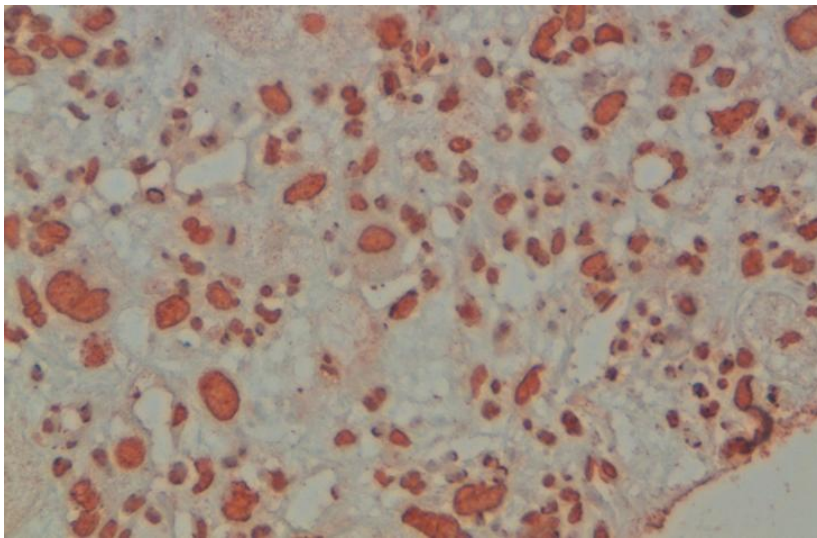


Figure 23: Expression Nucléaire du MDM2 par toutes les cellules tumorales

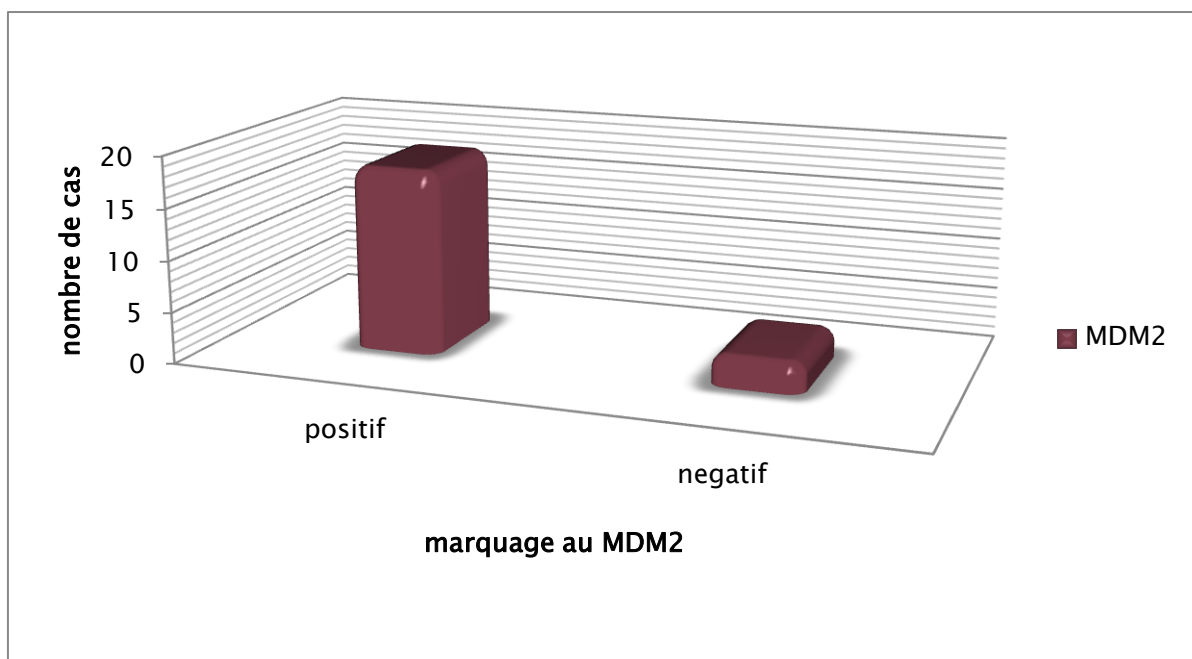


Figure23: Résultat de l'IHC en utilisant MDM2 pour les liposarcomes.

Discussion

L'immunohistochimie est actuellement indispensable pour diverses classifications histologiques des tumeurs incluant des données de biologie moléculaire sur des profils génétiques de prédiction pronostique.

Dans notre étude le pic de fréquence (9 cas parmi 21) ont un âge entre 51 et 60 ans et les 12 cas restants correspondent à des sujets âgés entre 61 ans et 70 ans, d'autre entre 31ans -40 ans avec un nombre de 4 cas. Selon une mise au point de l'épidémiologie des STM, la répartition homme femme montre une nette prédominance masculine, dans notre étude un sex-ratio de 0.9 indique une légère prédominance féminine notée, le sexe masculin est présenté avec 48% des cas contrairement au sexe féminin avec un pourcentage de 52%. Ceci montre l'incompatibilité de l'incidence étudiée avec la littérature vu que l'échantillon est peu représentatif.

Les liposarcomes sont des tumeurs malignes rares qui se développent à partir des cellules lipoblastiques primitives ou embryonnaires. La spécification de la localisation dépend du type histologique. Il est le plus souvent localisé au niveau des extrémités ou du péritoine, selon le cas général, les liposarcomes surviennent le plus souvent au niveau de la cuisse (50%) l'abdomen, dans une région appelée «rétro péritoine » (20%), Quand à notre étude, il a été démontré que la localisation fréquente des liposarcomes était au niveau des membres inférieurs avec un pourcentage de (36,84%) avec 57.14% localisés au niveau de la cuisse, la région abdomino-pelvienne à un pourcentage de (26,31%), et (15,78%) au niveau de la retro-péritoine, ceci implique que ces résultats sont en accord avec la littérature.

L'aspect cellulaire est très varié, les cellules fusiformes sont majoritaires, ce qui nous orientent vers les liposarcomes bien différenciés (lipoma-like, sclérosant), et sont présentes chez 8 patients. Les cellules pléomorphes sont présentes chez 2 cas, et 5 cas présentant un aspect de cellules rondes ces dernières sont les plus métastatiques parmi les autres sous types. C'est cette similitude immunohistochimique et moléculaire entre les liposarcomes bien différenciés et les liposarcomes dédifférenciés, qui a permis leur regroupement en une seule entité par la nouvelle classification de l'OMS.

L'expression de MDM2 est mise en évidence avec l'immunohistochimie qui révèle une positivité pour 85,71% des cas (soit 18 cas).

L'amplification des gènes MDM2 et CDK4 peut être mise en évidence en pratique diagnostique par immunohistochimie, FISH et PCR quantitative.

Les anticorps anti-MDM2 et CDK4 sont relativement spécifiques et sensibles pour détecter une amplification de ces gènes. Cependant, la technique est parfois difficile à mettre en œuvre du fait de la fixation non contrôlée aboutissant à un bruit de fond rendant la technique ininterprétable. Il convient en outre de se souvenir qu'une positivité en immunohistochimie révèle une hyperexpression de la protéine mais pas toujours une amplification du gène contrôlant cette protéine.

conclusion

Les sarcomes sont des tumeurs avec un taux d'incidence faible, mais leur agressivité est variable. Certains sont liés à des anomalies génétiques spécifiques (translocation, amplification...) et le diagnostic de ces anomalies nécessite des analyses anatomopathologiques et cytogénétiques. La place de l'immunohistochimie (IHC) est prépondérante dans le diagnostic des sarcomes et se prescrit toujours en fonction de la morphologie et du contexte clinique. Une technique de bonne qualité est indispensable, tout comme la vérification systématique de témoins internes lorsque cela est possible (mais non totalement garant d'une technique fiable, car les niveaux d'expression des témoins peuvent s'avérer insuffisants).

A travers l'étude de 21 patients adressés au service d'anatomopathologie du CHU Hassan II de Fès, le rôle que joue l'immunohistochimie dans l'établissement du diagnostic, du pronostic et de la démarche thérapeutique a été bien établi. En se basant sur la détection de la surexpression de MDM2, cette dernière peut être utilisée pour distinguer les liposarcomes bien différenciés des tumeurs adipeuses bénignes. Mais elle reste d'une fiabilité peu importante devant d'autres techniques comme la FISH et la RT-PCR qui présentent la meilleure prise en charge des patients souffrants de sarcomes.

Références bibliographiques

- [1] – Fletcher CDM, Unni KK, Mertens F. 2002 ,World Health Organization classification of tumors. Pathology and genetics of tumours of soft tissue and bone. Lyon: IARC Press;
- [2]– Barretina J, Taylor BS, Banerji S, Ramos AH, Lagos-Quintana M, Decarolis PL, et al. 2010, Sub- type-specific genomic alterations define new targets for soft-tissue sarcoma therapy. Nat Genet; 42:715-21.
- [3]– Aurias A, Rimbaut C, Buffe D, Dubousset J, Mazabraud A. 1983 .Translocation of chromosome 22 in Ewing's sarcoma. CR SeancesAcadSci III; 296 : 1105-7.
- [4]– Turc-Carel C, Philip I, Berger MP, Philip T, Lenoir G. 1983.Chromosomaltranslocation (11;22) in cell of Ewing's sarcoma. CR SeancesAcadSci III: 1101-3
- [5]– Coindre JM, Pédeutour F, Aurias A. 2010. Well-differentiated and dedifferentiated liposarcomas.Virchows Arch; 456 : 167-79.
- [6]– Bui Nguyen Binh M, Sastre-Garau X, Guillou L, de Pinieux G, Terrier PH, Lagacé R, et al. 2005. MDM2 and CDK4 immunostainings are useful adjuncts in diagnosing well-differentiated and dedifferentiated liposarcoma subtypes. A comparative analysis of 559 soft tissue neoplasms with genetic data. Am J SurgPathol; 29: 1340-7.
- [7]– Sirvent N, Coindre JM, Maire G, Hostein I, Keslair F, Guillou L, et al. 2007 Detection of MDM2-CDK4 amplification by fluorescence insitu hybridization in 200 paraffin-embedded tumor samples: utility in diagnosing adipocytic lesions and comparison with immunohistochemistry and real-time PCR. Am J SurgPathol ; 31 :1476-89
- [8]– Brooks, CL., Gu, W., 2006. p53 ubiquitination: Mdm2 and beyond. Mol. Cell 21 (3) 307-315
- [9]– Vassilev LT: 2007. MDM2 inhibitors for cancer therapy. Trends in Molecular Medicine, 13:23-31. 67.
- [10]– Vassilev LT, Vu BT, Graves B, Carvajal D, Podlaski F, Filipovic Z, Kong N, Kammlott U, Lukacs C, Klein C, Et al: 2004. In Vivo Activation of the p53 Pathway by Small-Molecule Antagonists of MDM2. Science, 303:844-848.
- [11]– Momand J, Jung D, Wilczinski S, Niland J. 1998. The MDM2 gene amplification database. Nucleic Acids Res; 26 (15):3453-9. 100

[12]– Dworakowska D, Jassem J, Peters B, Dziadziuszko R, Zylicz M, et al. 2004.MDM2 gene amplification : a new independent factor of adverse prognosis in nonsmall cell lung cancer (NNSCLL). *Lung Cancer*; 43(3):285–95.

[13]– Mu Z, Hachem P, Agrawal S, Pollack A. 2004.Antisense MDM2 oligonucleotides restore the apoptotic response of prostate cancer cells to androgen deprivation. *Prostate*; 60(3):187–96.

[14]– Leach FS, Tokino T, Meltzer P, Burrell M, Oliner JD, Smith S, et al. 1993.P53 Mutation and MDM2 amplification in human soft tissue sarcomas. *Cancer Res*.53(10):2231–4.

[15]– Oliner JD, Kinzler KW, Meltzer PS, George DL, Vogelstein B. 1992.Amplification of a gene encoding a p53-associated protein in human sarcomas, *Nature* 358(6381):80–3.

[16]– Pseudotour F, Suijkerbuijk RF, Van Gaal J, Van de Klundert W, Coindre JM, Van Haelst A, et al. Chromosome 12 origin in rings and giant markers in well-differentiated liposarcoma.

[17]– Pseudotour F, Suijkerbuijk RF, Forus A, Van Gaal J, Van de Klundert W, Coindre JM et al. Complex composition and co-amplification of SAS and MDM2 in ring and giant rod marker chromosomes in well-differentiated liposarcoma