UNIVERSITÉ DE GENÈVE

Archive ouverte UNIGE
https://archive-ouverte.unige.ch

Thèse 2001

Open Access

This version of the publication is provided by the author(s) and made available in accordance with the copyright holder(s).

Expression de P53 dans les tumeurs à cellules géantes osseuses

Trottet, Cécile

How to cite

TROTTET, Cécile. Expression de P53 dans les tumeurs à cellules géantes osseuses. Doctoral Thesis, 2001. doi: 10.13097/archive-ouverte/unige:121

This publication URL: https://archive-ouverte.unige.ch/unige:121
Publication DOI: 10.13097/archive-ouverte/unige:121

© This document is protected by copyright. Please refer to copyright holder(s) for terms of use.

UNIVERSITE DE GENEVE
Département de pathologie clinique
Division de pathologie clinique

FACULTE DE MEDECINE
Professeur Jean-Philippe BONJOUR
Professeur Bettina BORISCH

EXPRESSION DE P53 DANS LES TUMEURS A CELLULES GEANTES OSSEUSES

Thèse

présentée à la Faculté de Médecine

de l'Université de Genève

pour obtenir le grade de Docteur en médecine

par

Cécile TROTTET

Genève

Thèse n° 10226

Genève
2002

UNIVERSITÉ DE GENÈVE

FACULTE DE MEDECINE

Doctorat en médecine

Thèse de :

Madame Cécile TROTTET
Originaire de Genève

Intitulée :

EXPRESSION DE P53 DANS LES TUMEURS A CELLULES GEANTES OSSEUSES

La Faculté de médecine, sur le préavis de Madame Bettina Borisch, professeur adjoint, au Département de Pathologie clinique, autorise l'impression de la présente thèse, sans prétendre par là émettre d'opinion sur les propositions qui y sont énoncées.

Genève, le 17 janvier 2002

Thèse n° 10226

Peter SUTER
Doyen

N.B. - La thèse doit porter la déclaration précédente et remplir les conditions énumérées dans les "Informations relatives à la présentation des thèses de doctorat à l'Université de Genève".

Remerciements

Je tiens à remercier le Professeur Jean-Philippe Bonjour et le Professeur Bettina Borisch de m'avoir donné la possibilité d'accomplir ce travail.

Je remercie la Doctoresse Anne-Marie Kurt pour le partage de ses connaissances et pour m'avoir dirigée tout au long de ce travail.

Je remercie vivement le Docteur Juerg Schwaller de m'avoir acceptée au sein de son laboratoire. Je tiens également à lui exprimer ma reconnaissance pour son soutien et ses conseils qui m'ont grandement aidés dans la réalisation de ce travail ainsi que sa disponibilité.

Mes remerciements vont également à Madame Béatrice Conne et Madame Margaret Berczy pour leur précieuse aide technique.

Table des matières

		page
Résumé		**1**
1. Introduction		**2**
2. Matériel et méthodes		
2.1	**Collectif total**	**11**
2.2	**Histologie conventionnelle**	**14**
2.3	**Immunohistochimie**	**14**
2.4	**Isolation de l'ADN et analyse de la qualité de l'échantillon**	**16**
2.5	**SSCP**	**18**
3. Résultats		
3.1	**Histologie conventionnelle**	**20**
3.2	**Immunohistochimie**	**21**
3.3	**Biologie moléculaire**	**24**
4. Discussion		**27**
5. Références		**31**

Résumé

Le gène de la p53 est considéré comme un gène suppresseur de tumeur.
Nous avons étudié son expression dans les tumeurs à cellules géantes osseuses (TCG) pour rechercher s'il pouvait être considéré comme un marqueur prédictif de l'évolution dans les tumeurs à cellules géantes osseuses.
La protéine p53 a été étudiée dans 33 cas de tumeurs à cellules géantes osseuses par immunohistochimie pour analyser son expression et par Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP) pour rechercher la présence de mutations dans les tumeurs primaires et leurs récidives.

Nos résultats montrent que les tumeurs à cellules géantes osseuses expriment la p53, mais qu'il n'y a pas de différence significative entre l'expression de la p53 dans les tumeurs primaires et les récidives.
De plus aucune mutation du gène de la p53 pour les exons 5, 6, 7 et 8 n'a été trouvée dans les tumeurs de notre étude.

1) Introduction

Les tumeurs à cellules géantes (TCG) sont des tumeurs osseuses habituellement bénignes et relativement rares. Bien que bénignes, elles ont un comportement agressif et imprévisible. Elles ne représentent que 4 à 5% des tumeurs osseuses primitives, et 18,2% des tumeurs bénignes (1). Elles surviennent principalement chez l'adulte jeune, un peu plus souvent chez la femme (57% de femmes pour 52% d'hommes), avec une localisation préférentielle au niveau de la région épiphyso-métaphysaire des os longs et au voisinage du genou (1). La partie distale du fémur et la partie proximale du tibia sont touchées dans environ 40 à 50 % des cas de TCG. Le troisième site de localisation le plus fréquent est la partie distale du radius touchée dans 10 à 12 % des cas ; les autres localisations ne sont atteintes que dans moins de 7 % des cas: partie proximale du fémur, tibia distal, sacrum, ulna distale, fibula proximale, pelvis, petits os tubulaires de la main (2%) et du pied et corps vertébraux (1).
Les tumeurs se manifestent chez des patients entre 15 et 40 ans avec un pic d'incidence dans la troisième décennie (1).

Les symptômes cliniques associés aux TCG consistent essentiellement en des douleurs, des tuméfactions souvent inflammatoires, et parfois des limitations de la fonction articulaire, avec boiterie dans les localisations près du genou. Toutefois les TCG peuvent également être asymptomatiques jusqu'à la survenue d'une fracture pathologique (2).

En ce qui concerne l'aspect radiologique, les TCG apparaissent comme des lésions lytiques, expansives situées dans l'extrémité des os longs. Autour de la lésion, le cortex est aminci et peut parfois être détruit. Dans la majorité des cas il n'y a pas de réaction périostée (2). Le cartilage articulaire peut être détruit.

L'aspect histologique de cette tumeur est caractérisé par une prolifération de cellules stromales ovoïdes et de cellules géantes multinuclées dans des proportions

variables avec néanmoins le plus souvent une prédominance de cellules géantes. Le nombre de noyaux dans les cellules géantes multinuclées varie de 10 à 50 par cellule. Quant aux cellules stromales, elles montrent d'occasionnelles mitoses (2). On peut également observer des foyers de nécrose sur les coupes histologiques (2).

Pour la plupart des TCG les lésions sont uniques, mais dans 1% des cas elles sont multicentriques. Elles apparaissent simultanément ou à un court intervalle de 4 mois jusqu'à 16 ans après la détection de la TCG initiale, ce qui revient à dire qu'elles sont métachrones.

Pour les TCG multicentriques il existe des cas ayant jusqu'à 7 localisations. Le site préférentiel des TCG multicentriques est la main. En effet seulement 2% des TCG touchent la main mais ce pourcentage est de 39% lorsque les tumeurs sont multicentriques. C'est pourquoi dès que la main est atteinte par une tumeur à cellules géantes osseuse, il faut rechercher d'autres localisations de la tumeur (1).

La pathologie la plus fréquemment associée à la tumeur à cellules géantes osseuse est la maladie de Paget. Les patients atteints d'une maladie de Paget et d'une TCG ont un âge plus avancé (60 ans) que la moyenne des patients atteints de TCG. Les hommes sont les plus fréquemment atteints comme c'est le cas dans la maladie de Paget. Les localisations les plus fréquentes des TCG en association avec une maladie de Paget sont le crâne, les os de la face et le squelette axial plus que les extrémités comme c'est le cas dans les TCG sans autre pathologie associée. Ces TCG ont une histologie comparable aux TCG habituelles et se trouvent localisées dans les zones pagétiques.

L'autre pathologie souvent rencontrée en association avec une TCG est le kyste anévrysmal. Il a la particularité de se développer sur une lésion osseuse pré-existante, avec une prédilection pour les TCG (1).

Les TCG malignes sont très rares, moins de 5 % de l'ensemble des TCG. La grande majorité de ces formes malignes provient d'une transformation secondaire après radiothérapie. Il s'agit alors d'un fibrosarcome dans les 2/3 des cas, d'un

ostéosarcome ou plus rarement d'un histiocytome fibreux malin. Le délai d'apparition après radiothérapie est de l'ordre d'une dizaine d'années. Toutefois, certaines TCG malignes peuvent survenir dans l'évolution d'une TCG bénigne lors d'une récidive après exérèse chirurgicale ou en l'absence de tout traitement. Les TCG malignes primitives sont exceptionnelles et se caractérisent à l'histologie par l'existence d'un composant sarcomateux juxtaposé à des zones de TCG bénigne (1).

Les patients atteints de TCG bénigne, peuvent rarement développer des métastases pulmonaires. Ces nodules pulmonaires ont une histologie comparable à celle de la TCG primitive, c'est-à-dire bénigne. L'incidence des métastases pulmonaires dans les TCG bénignes est de 1 à 3,5%. L'intervalle entre la découverte de la tumeur primitive et la détection de la métastase pulmonaire varie entre 0 à 10 ans avec une moyenne autour de 3,5 ans. 92% des métastases pulmonaires sont détectées dans les 7,5 ans suivant la présentation de la tumeur initiale.

Le traitement des TCG est principalement chirurgical. Bien que les TCG soient des tumeurs bénignes, elles ont un comportement agressif et elles ont une forte propension à la récidive locale après chirurgie (3). Un traitement par curetage simple est associé à une forte fréquence de récidive (52% selon Goldenberg et collaborateurs (2)). Le risque de récidive locale après une résection en bloc emportant une articulation suivi d'une reconstruction par allogreffe ou par prothèse est moindre qu'après une procédure intra-lésionnelle. Mais les complications à long terme liées à la prothèse ou à la reconstruction par allogreffe font que ce traitement est en général inapproprié pour la plupart des tumeurs à cellules géantes osseuses. C'est pourquoi la plupart des TCG sont traitées par résection intra-lésionnelle. Avec la méthode de traitement utilisant une fraise à haute vitesse pour réséquer la tumeur suivie d'une autogreffe et insertion d'une allogreffe d'os irradié si nécessaire (selon la taille du défect à combler) la fréquence de récidive est de 12% selon Blackley et collaborateurs (4), ce qui est comparable avec les résultats cliniques reportés après l'utilisation d'adjuvants chimiques et de ciment. Le facteur majeur du succès ou de l'échec du

curetage, selon Backley et collaborateurs (3), est surtout lié à une résection complète de la tumeur.

Dans le but de prédire l'évolution des tumeurs à cellules géantes osseuses plusieurs critères ont été étudiés. Tout d'abord le grade histologique qui est basé sur la proportion des cellules stromales et des cellules géantes multinuclées selon la gradation de Jaffe, Lichtenstein et Portis. Mais selon l'étude de Goldenberg (2), le grade histologique de la tumeur primaire n'a pas de valeur pronostique pour les TCG. De plus selon l'étude de Suhl et collaborateurs (5) il n'y a pas de différence significative entre l'index de prolifération des cellules stromales mononuclées et des cellules géantes multinuclées, ce qui rend inutile la gradation histologique des tumeurs à cellules géantes osseuses basée sur la prédominance des cellules stromales. Ensuite la cytométrie de flux pour analyser la ploïdie a également été étudiée, mais selon l'étude de Sara et collaborateurs (6) il n'y a pas de différence clinique, radiologique ou histologique en fonction du contenu en ADN des tumeurs. Aucun de ces critères ne s'est révélé utile à ce jour pour prédire l'évolution des TCG après traitement chirurgical. Dans le but de prédire le comportement des TCG, nous nous sommes intéressés à la protéine p53.

La protéine p53 est un facteur de transcription qui se comporte comme un suppresseur de tumeur (7,8). Le gène de la p53 est le gène que l'on trouve le plus fréquemment muté dans les cancers humains (9,10,11). On trouve des mutations de la p53 par exemple dans les lymphomes, les leucémies, dans le carcinome à petites cellules du poumon, dans les sarcomes, dans les astrocytomes, dans 70 à 80% des carcinomes colorectaux et dans encore bien d'autres tumeurs (10,11). Le gène de la p53 est situé sur le bras court du chromosome 17 (12,13). Il code pour une protéine de 393 acides aminés. La p53 est un facteur de transcription qui induit l'arrêt du cycle cellulaire ou l'apoptose en réponse à une altération de l'ADN selon le taux de p53, le

type de cellule, l'importance de l'altération de l'ADN, la présence ou l'absence de facteurs de survie dans l'environnement externe (12). La protéine p53 est une protéine considérée comme un facteur suppresseur de tumeur qui agit comme régulateur négatif de la croissance cellulaire en induisant l'arrêt du cycle cellulaire ou l'apoptose (7,8). En effet l'activation de la p53 après une altération de l'ADN mène à l'arrêt du cycle cellulaire pour permettre, soit une réparation de la cellule soit son apoptose, ce qui empêche la survenue de mutations dans la cellule et par là même le développement d'une tumeur (7,8). Pour acquérir son avantage de prolifération, qui est à la base de la création d'une tumeur, les 2 allèles de la p53 doivent être inactivés (14).

Après une altération de l'ADN la protéine p53 s'accumule et augmente sa capacité à lier l'ADN, permettant ainsi l'activation de la transcription. Ceci mène à une activation des gènes dont les produits favorisent l'arrêt du cycle cellulaire, l'apoptose ou la réparation de l'ADN (4,15,16). La protéine p53 agit en induisant l'arrêt du cycle cellulaire en G1 ; ce qui est supposé prévenir la réplication de l'ADN endommagé et permettre sa réparation avant l'entrée de la cellule en phase S (12). Pour induire l'apoptose de la cellule, l'arrêt du cycle cellulaire se fait en G2 via l'induction de l'expression de la protéine σ 14-3-3 ce qui permet l'apoptose de la cellule (15). La p53 peut fonctionner via un mécanisme indirect, qui implique la séquestration des facteurs de transcription, ou via un mécanisme direct impliquant l'inhibition de gènes spécifiques par une déacétylation des histones (9).

Plusieurs facteurs agissent comme des inhibiteurs de la p53; dont le MDM2 et le $p14^{ARF}$ (17,18). A l'état non activé, le MDM2 et la p53 se contre-balancent et sont présents à un faible taux. Le taux d'ARN messager de MDM2 est régulé par le taux de la protéine p53 type natif. Une augmentation du taux de la p53 entraîne une augmentation du taux de MDM2.

Le rôle principal de MDM2 est d'interagir directement avec la p53 et d'inhiber son activité (19). En effet la liaison de MDM2 à la p53 inhibe la fonction normale de la p53, en réduisant la capacité de cette dernière à activer l'expression du gène de la

p53. Le MDM2 participe également à la dégradation de la p53 (20). Si la p53 est mutée elle ne peut alors plus réguler le gène MDM2.

Le $p14^{ARF}$ lie directement le MDM2. Il fonctionne en inhibant l'activité de ligase ubiquitaire de MDM2 et en séquestrant le MDM2 dans le noyau, ce qui prévient l'export nucléaire nécessaire à sa dégradation. Le $p14^{ARF}$ stabilise donc la p53 et le MDM2.

Lorsque les protéines de la p53 sont mutées, elles sont alors incapables d'activer l'expression de MDM2 (qui contrôle le taux de p53 en inhibant l'activation de son gène), ce qui résulte en une p53 inhabituellement stable, qui s'accumule à un taux élevé dans les cellules tumorales. La perte de la fonction normale de la p53 entraîne donc une prolifération cellulaire incontrôlée, qui est caractéristique de la progression néoplasique (21,22). Un taux élevé de p53 est retrouvé dans une grande variété de cellules transformées, tandis que dans les cellules non-transformées ce taux est faible (12). L'inactivation de la p53 est un évènement qui apparaît très tôt dans la tumorogenèse dans certains types de cancers, alors que pour d'autres c'est un événement tardif (14).

Les patients atteints du syndrome de Li-Fraumeni ont hérité d'un défaut au niveau de l'allèle du gène de la p53. Ces patients ont plus de risque de développer des cancers que ceux qui n'ont pas ce défaut. Non seulement l'inactivation de la p53 prédispose à l'induction du cancer, mais de plus il a été supposé que la réussite du traitement par radiothérapie et chimiothérapie dépendrait d'une p53 fonctionnelle (9). Pour lui conférer un avantage de prolifération, il faut que les 2 allèles de la p53 soient inactivés (14). La protéine p53 a une courte demi-vie de 6 à 30 minutes (23). Les mutations prolongent significativement sa demi-vie par stabilisation de la protéine mutée ce qui permet sa détection par immunohistochimie (IHC) (21,23,24). Mais une immunoréactivité positive pour un anticorps anti-p53 ne signifie pas forcément qu'il y a une mutation car il existe des faux positifs (une coloration positive pour une tumeur sans mutation de la protéine p53)(23). En effet l'IHC détecte l'accumulation nucléaire de la protéine p53, une conséquence fréquente d'une mutation mais pas la

conséquence exclusive. De plus des problèmes de coloration non-spécifique, de coloration de background, de fixation et d'artéfacts peuvent compliquer l'interprétation de la technique d'immunohistochimie. Pour augmenter la sensibilité de la technique d'immunohistochimie, un recrutement de l'antigène peut être obtenu pour les fragments tissulaires fixés par le formol tamponné et conservés dans la paraffine (23,25). Comme l'IHC ne permet pas d'affirmer qu'il y a une mutation de la protéine p53 la technique de Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP) peut être utilisée pour détecter le type natif ou mutée de la p53. Cette technique, qui est une méthode de screening rapide, repose sur le fait que la mobilité électrophorétique des fragments d'ADN simple-brin sur un gel non-dénaturé est altérée s'il y a une variation de la séquence des nucléotides (26,27). Les changements de la migration de l'ADN simple-brin sont dus à une altération de sa conformation. Une amplification d'un fragment de 100-500 paires de bases d'ADN par Polymerase Chain Reaction (PCR) suivie d'une analyse par SSCP permet la détection d'une substitution d'un nucléotide avec une haute sensibilité (26,28). Les exons les plus fréquemment mutés dans les différentes tumeurs malignes humaines sont les exons 5 à 8 de la protéine p53 (10,29,30). La figure 1 représente la p53 avec les sites de prédilection pour les mutations (31).

Dans beaucoup de tumeurs la p53 a été étudiée et est prédictive pour nombre d'entre elles. En effet il a été trouvé que les tumeurs dans lesquelles on détecte une accumulation de la p53 à l'immunohistochimie sont plus agressives que celles dans lesquelles on ne détecte pas la p53. C'est le cas dans l'étude d'Esrig et collaborateurs (32), selon laquelle l'accumulation nucléaire de la p53 est plus fréquemment associée à une récidive et diminue la survie des patients atteints d'un carcinome transitionnel de la vessie. L'accumulation de la p53 a été étudiée dans beaucoup de tumeurs où l'on a montré une bonne corrélation entre son accumulation dans la tumeur et le stade tumoral. Cette relation est démontrée dans l'étude de Chemeris (21) sur les tumeurs rénales. Toujours selon cette étude de Chemeris, il existe une relation clairement positive entre l'accumulation de la protéine p53 et le grade histologique qui reflète la relative agressivité de la tumeur.

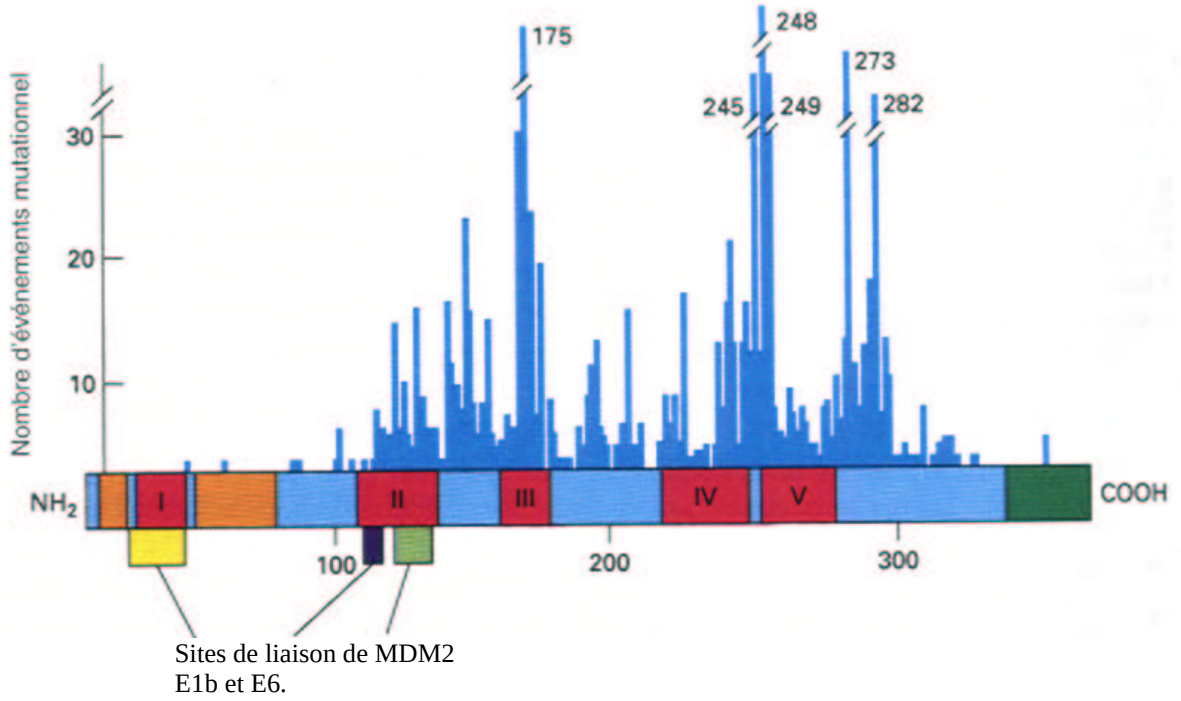

Figure 1:
Mutations qui inactivent la fonction de la protéine p53, telles qu'on les trouve dans des tumeurs humaines. Le graphique situe les 1'361 mutations de la p53 observées dans des tumeurs humaines. On y remarque des sites de prédilection. La partie centrale de la chaîne est indispensable à la fixation de la protéine à l'ADN, fixation que la plupart des mutations abolissent. La carte structurelle de la protéine en révèle la complexité : elle comporte cinq régions conservées par l'évolution (en rouge), des régions de transactivation (en orange), et une région favorisant l'oligomérisation (en vert). La protéine MDM2 se fixe au site indiqué et inactive p53. (Les protéine E1b, qui provient d'un adénovirus, et E6, qui provient d'un virus de papillome, inactivent la p53 en se fixant aux sites indiqués.)

Les TCG sont des tumeurs rares, habituellement bénignes, mais avec un comportement imprévisible, pour lesquelles aucun facteur prédictif n'a été trouvé jusqu'ici. De nombreuses études ayant montré un comportement plus agressif et un taux de récidive plus élevé pour les tumeurs comportant une surexpression de p53, notamment dans les carcinomes transitionnels de la vessie (32) par rapport aux tumeurs sans surexpression de la p53, nous avons cherché si nous pouvions appliquer ce principe aux TCG.

Pour cela nous avons tout d'abord essayé, dans notre étude, de détecter par immunohistochimie à l'aide des anticorps DO7, CM1 et Pab240, la présence de la p53 dans les tumeurs à cellules géantes osseuses primaires ainsi que dans leurs récidives. Les anticorps utilisés en immunohistochimie ne permettant pas de différencier les formes natives des formes mutées, nous avons utilisé la technique de SSCP, dans le but de différencier le type natif du type muté de la protéine p53. Nous avons utilisé les exons 5, 6, 7 et 8 de la p53 pour y rechercher d'éventuelles mutations (les exons 5 à 8 étant les exons les plus fréquemment mutés dans la plupart des tumeurs malignes).

De plus nous avons étudié le taux de prolifération cellulaire dans les TCG, pour voir s'il y avait une corrélation entre le taux de prolifération, le grade tumoral et le taux de récidives comme c'est le cas dans les tumeurs des tissus mous, le cancer de la prostate, du sein (5), ceci dans le but de prédire l'évolution tumorale. Pour cela nous avons utilisé l'anticorps MiB1 qui reconnaît l'antigène de prolifération Ki-67.

Nous avons aussi étudié l'intensité de la coloration immunohistochimique des noyaux des cellules stromales ainsi que la quantité de noyaux colorés pour les anticorps DO7, CM1 et Pab240. Nous avons recherché une éventuelle corrélation entre l'intensité de la coloration immunohistochimique des noyaux des cellules stromales, l'agressivité tumorale et le taux de récidive, ainsi qu'une éventuelle corrélation entre la quantité de noyaux positifs à l'IHC, l'agressivité et le taux de récidive des TCG. En effet notre première hypothèse était qu'une immunoréaction de très forte intensité se trouvait dans une tumeur de forte agressivité et donc que cette TCG avait un fort taux de récidive. La seconde hypothèse était qu'un nombre élevé de noyaux positifs à l'immunohistochimie se trouvait dans une tumeur de forte agressivité donc avec un risque élevé de récidive de la tumeur.

2) Matériel et méthode

Nous avons revu tous les cas de tumeurs à cellules géantes osseuses répertoriés à la Division de Pathologie Clinique de l'Hôpital Cantonal de Genève entre 1970 et 1997.

36 biopsies ont été répertoriées. 3 cas ont été écartés de l'étude car il n'y avait plus de matériel archivé à disposition. Les 33 biopsies restantes correspondent et se répartissent comme suit : pour 24 patients 24 tumeurs primitives, 7 récidives et 2 biopsies d'une même tumeur. Nous avons considéré comme récidives les cas avec au moins 6 mois de délai entre 2 biopsies. En dessous de ce délai une seule biopsie était prise en compte.

33 cas ont été retenus pour l'étude immunohistochimique, et 29 cas pour la biologie moléculaire. Pour chaque cas, nous avons choisi un bloc de paraffine dont le matériel n'avait pas subi de décalcification préalable. Pour tous les patients restants dans notre étude, le diagnostic de tumeur à cellules géantes osseuse a été confirmé après révision des coupes colorées en hématoxyline-éosine.

2.1) Collectif total

Le collectif total de notre étude est composé de 24 patients se répartissant en 17 hommes et 7 femmes. En plus de notre collectif total nous avons utilisé comme contrôles, les cellules de 2 donneurs. Le premier donneur, dont les cellules ont été extraites à partir du tissu amygdalien, a été considéré comme le contrôle négatif (N) de notre étude, vu qu'il n'avait pas de mutation de la p53. Tandis que pour le deuxième donneur (Daudi), dont les cellules du lymphome de Burkitt ont été utilisées, a été considéré comme le contrôle positif car il présentait une mutation sur l'exon 6 de la p53.

L’âge moyen de notre collectif de patients est de 35 ans avec des extrêmes de 17 à 71 ans.

Les tumeurs à cellules géantes osseuses sont localisées pour 18 patients, soit 76 % du collectif total, dans les os longs (dont 8 cas dans le tibia, 6 cas dans le fémur, 3 cas dans le radius et 1 cas dans le péroné), pour 4 autres patients, soit 16 % du collectif total, la TCG se situe dans les os plats (dont 1 cas dans l’omoplate, 1 cas dans l’aile iliaque, 1 cas dans le sacrum et 1 cas dans une vertèbre) et enfin 2 patients, soit 8 % du collectif total, ont une tumeur à cellules géantes osseuses dans les petits os des mains et des pieds (dont 1 cas dans un métatarse et 1 cas dans une phalange).

L’ensemble des données cliniques des patients est détaillé dans le tableau I.

Tableau I : Données cliniques sur les patients ayant une TCG

* cas	âge	sexe	localisation
1a	19	F	tibia G
1b	20	F	récidive
2a	36	M	radius G
2b	37	M	1°récidive
2c	38	M	2°récidive
3	17	M	métatarsien
4	25	M	fémur G
5	33	F	phalange P1
6	25	F	fémur G
7	71	M	péroné G
8	33	M	tibia D
9a	23	M	omoplate D
9b	24	M	1°récidive
10	40	M	aile iliaque D
11	65	F	fémur G
12'	36	F	tibia D
12"	36	F	tibia D
13	30	F	tibia G
14a	50	M	vertèbre L2
14b	52	M	1°récidive
14c	56	M	2°récidive
15	32	M	tibia D
16	39	M	radius G
17	27	M	tibia D
18	35	M	tibia G
19	19	M	sacrum
20	57	M	radius
21	40	M	tibia D
22'	31	F	fémur D
22"	31	F	fémur D
23	29	M	fémur D
24a	30	M	fémur G
24b	32	M	1°récidive

*: b et c = récidive de la tumeur primaire a

" = 2 biopsies de la même tumeur car intervalle entre biopsies < 6 mois

2.2) Histologie conventionnelle

Tous les cas ont été revus au microscope optique sur les coupes colorées à l'hématoxyline-éosine, en tenant compte des critères histologiques suivants : le rapport entre cellules géantes et cellules stromales et la présence ou l'absence de nécrose.

2.3) Immunohistochimie

Après l'étude histologique des coupes, nous avons cherché à mettre en évidence la présence de p53 mutée dans les tumeurs à cellules géantes osseuses de notre collectif de patients. Nous avons choisi l'immunohistochimie comme méthode de détection parce que cette technique permet de détecter l'accumulation nucléaire de la protéine p53 qui est une conséquence fréquente, mais non exclusive d'une mutation de la protéine p53. Mais comme toutes les biopsies avaient été au préalable fixées en formol tamponné et enrobées en paraffine, ce qui interfère avec la détection immunohistochimique des antigènes, nous avons d'abord dû procéder à un démasquage des antigènes par la méthode du micro-ondes, selon le protocole suivant.

Des coupes de 4 μ obtenues à partir des blocs de paraffine ont été mises dans le micro-ondes à 600 Watt pendant 3 fois 5 minutes. Ces sections ont été immergées dans du méthanol-H_2O_2 5% pendant 10 minutes pour inhiber la peroxidase endogène puis incubées avec l'anticorps primaire pendant 1 heure à température ambiante. Après rinçage au PBS, les coupes ont été incubées avec le sérum anti-souris-biotin (Dako) ou anti-lapin-biotin (Swine) dilué à 1 :250 dans du PBS + BSA 5% pendant 30 minutes puis rincées au PBS. Ensuite les coupes ont été incubées avec la streptavidine-biotin-complex-horseradish (Dako) diluée à 1 :100 de PBS 5% et 1 :100 de BSA 5% puis rincées une nouvelle fois au PBS. Pour révéler la liaison anticorps-antigène les coupes ont été incubées pendant 10 minutes avec de la diaminobenzidine puis rincées à l'eau courante et finalement colorées à l'hémalun pendant 2 minutes.

4 anticorps (Ac) primaires différents ont été utilisés selon ce protocole. 3 anticorps pour la p53 et un autre Ac qui reconnait l'antigène Ki-67 qui est marqueur

de la prolifération cellulaire. Tous ces anticorps utilisés sont des anticorps monoclonaux de souris sauf le CM1 qui est un Ac polyclonal de lapin.

Les différents anticorps sont détaillés dans le tableau II.

Tableau II : Anticorps

clone	cible	provenance	dilution
DO7	l'épitope entre a.a. 21 et 25 de p53	Dako	1/200
Pab240	l'épitope entre a.a. 213 et 217 de p53	Oncogene Research Products	1/20
CM1	épitopes de la partie terminale de p53	Novocastra	1/400
MiB1	l'antigène Ki-67	Dianova	1/20

a.a. : acide aminé

Pour ces 4 anticorps, les valeurs suivantes ont été définies afin de classer les tumeurs à cellules géantes osseuses. Les TCG ont été classées en 3 groupes en fonction du pourcentage de noyaux des cellules stromales marqués par l'anticorps MiB1.

< 10% de noyaux des cellules stromales colorés
de 10-50% de noyaux des cellules stromales colorés
> 50% de noyaux des cellules stromales colorés

Pour les anticorps anti-p53, c'est-à-dire le DO7, le Pab240 et le CM1, les tumeurs ont été classées selon 2 critères : le pourcentage de noyaux des cellules stromales colorés à l'immunohistochimie (IHC) et l'intensité de cette coloration. Pour le pourcentage de noyaux de cellules stromales colorées, les groupes ont été définis comme suit :

0 = aucun noyau coloré
focal = < 10 % des noyaux colorés
étendu = > 10 % des noyaux colorés

Pour l'intensité de la coloration immunohistochimique des noyaux des cellules stromales, les TCG ont été classées selon les 4 groupes suivants :

0 pas de coloration
1 faible coloration
2 moyenne coloration
3 forte coloration

2.4) Isolation de l'ADN et l'analyse de la qualité de l'échantillon

L'immunohistochimie nous a permis de mettre en évidence des cellules tumorales dont le noyau réagissait avec les Ac dirigés contre la p53. Mais la technique de l'IHC ne permettant pas d'affirmer qu'il y ait une mutation de la protéine p53 (en effet l'accumulation nucléaire de la p53 est une conséquence fréquente mais non exclusive d'une mutation de la p53), nous avons utilisé l'analyse par Single Strand Conformation Polymorphism de l'ADN, car cette technique, de screening rapide, est plus spécifique pour détecter les mutations. Pour cela nous avons d'abord isolé l'ADN puis vérifié la « qualité » de l'ADN de nos échantillons.

Pour isoler l'ADN à partir des biopsies fixées, 10 lames de tissu fixé en formol tamponné et enrobé en paraffine de 10 microns d'épaisseur ont été coupées puis déparaffinées 2 à 3 fois avec du xylol pour ensuite être lavées successivement avec de l'éthanol à 100% puis à 70%. Après séchage le matériel a été suspendu une nouvelle fois dans 500 µl de solution de tampon de lyse auquel 10 µl de protéinase K (20 µg/µl) ont été ajoutés.

La protéinase K a agi pendant toute la nuit au bain-marie à 56°C. Le lendemain le tube a été mis à bouillir pendant 10 minutes au bain-marie pour inhiber la protéinase K. Et pour finir, la densité optique de l'échantillon à 260 nm a été analysée afin de vérifier la concentration d'ADN et si besoin les échantillons ont été dilués pour obtenir une concentration d'environ 0.1 µg/µl d'ADN par échantillon.

Notre matériel, dont certains échantillons ont plus de 30 ans, a été conservé par une ancienne méthode dénaturante pour l'ADN (fixation en formol tamponné puis

enrobage en paraffine). Pour vérifier l'intégrité de l'ADN de nos échantillons, nous avons testé la présence de la β-globine (qui est une petite molécule de 100 paires de bases, donc plus facilement restée intacte après cette méthode de conservation dénaturante) puis de la β-actine (dont la taille de 284 paires de bases est proche de la taille des fragments d'ADN de la p53 que nous voulons amplifier). Ces 2 gènes sont présents dans tous les gènes humains. C'est pourquoi les gènes de la β-globine et de la β-actine ont été amplifiés, par la méthode de Polymerase Chain Reaction standard, dans tous nos échantillons à l'aide des primers détaillés dans le tableau III.

Tableau III : <u>Primers de la β-globine et de la β-actine</u>

primer	***longueur**	**séquence primer**	**provenance**
β-globine	100	5'-ACA-CAA-CTG-TGT-TCA-CTA-GC-3' (S) 5'-CAA-CTT-CAT-CCA-CGT-TCA-CC-3' (AS)	Genebank
β-actine	284	5'-GGG-AAA-TCG-TGC-GTG-ACA-TT-3' (S) 5'-GGA-GTT-GAA-GGT-AGT-TTC-GTG-3' (AS)	Genebank

S= sens
AS= anti-sens
*longueur= longueur (en paires de bases) du fragment d'ADN à amplifier

Puis 20 µl de l'échantillon ont été chargés sur un mini-gel d'agarose, dans un tampon de bromure d'éthidium et les résultats ont été analysés aux ultra-violets (U.V.) après électrophorèse.

Nous avons considéré les échantillons positifs pour la β-actine dans notre étude, comme de suffisamment bonne qualité pour permettre une analyse convenable de l' « état » de la p53 par SSCP.

2.5) SSCP

Pour chaque cas de notre étude positif pour la β-actine, nous avons amplifié, par PCR, l' ADN de la p53 au niveau des exons 5, 6, 7 et 8 sur lesquels nous recherchions une mutation. Nous avons choisi ces 4 exons car ils sont le plus fréquemment mutés dans la p53 (10,29,30). Nous avons donc répété pour chaque exon sélectionné l'opération suivante, c'est-à-dire le marquage radioactif des primers et la préparation du mélange pour la PCR, pour 23 échantillons. Les 23 échantillons comprennent nos 21 cas positifs pour la β-actine et les 2 contrôles (le négatif et le positif). Ayant partagé l'exon 5 de la p53 en 2 car il était trop grand pour être détecté en raison de la « faible » qualité de l'ADN de nos échantillons, nous avons donc répété 5 fois la technique suivante.

Nous avons effectué le programme suivant de 40 cycles d'amplification sur l'appareil PCR (« Tgradient » thermocycler de Whatman Biometra). Chaque cycle était composé d'une phase de dénaturation à 94°C pendant une minute, d'une phase de liaison de l'amorce (« annealing ») d'une minute à 65°C et d'une phase de polymérisation d'une minute à 72°C. Pour terminer, les échantillons ont été incubés cinq minutes à 72°C, pour obtenir une polymérisation optimale.

Les primers pour p53 utilisés sont détaillés dans la tableau IV .

Tableau IV : Primers de p53

primer	*longueur	séquence du primer
p53 exon 5a	184	5'-CGT-TTC-ACT-TGT-GCC-CTG-AC-3' (S) 5'-TCA-TGT-GCT-GTG-ACT-GCT-TG-3' (AS)
p53 exon 5b	158	5'-CCA-TGG-CCA-TCT-ACA-AGC-AGT-C-3' (S) 5'-CAG-CCC-TGT-CGT-CTC-TCC-AG-3' (AS)
p53 exon 6	166	5'-ACG-ACA-GGG-CTG-CTT-GCC-CAG-3' (S) 5'-AGT-TGC-AAA-CCA-GAC-CTC-AGG-3' (AS)
p53 exon 7	168	5'-GGC-CTC-ATC-TTG-GGC-CTG-TG-3' (S) 5'-TGT-GCA-GGG-TGG-CAA-GTG-GC-3' (AS)
p53 exon 8	199	5'-CTG-CCT-CTT-GCT-TCT-CTT-TTC-3' (S) 5'-TCC-ACC-GCT-TCT-TGT-CCT-GC-3'(AS)

S= sens AS= anti-sens
*longueur= longueur (en paires de bases) du fragment d'ADN à amplifier
Ces 5 primers proviennent de c/o MGW-Biotech AG.

Pour la préparation du marquage des primers nous avons suivi le protocole suivant, pour chacun des 5 primers. Pour 23 tubes de PCR, 2.6 µl de PNK 10x ont été mélangés avec 2.6 µl de primers sens (S), 2.6 µl de primers anti-sens (AS), 1.3 µl de PNK 5U/µl, 2.6 µl de γ32 PATP et 13.9 µl d'H_2O. Ce mélange (de 25.6 µl de γ32 oligo) a été chauffé à 37°C pendant 30 minutes, puis 10 minutes à 94°C.

Puis nous avons préparé le mélange pour la PCR, selon le protocole suivant. Pour 23 tubes d'un volume final de 20µl dont 10 µl d'ADN par tube, 46 µl de buffer10x ont été mélangés avec 46 µl de dNTPs 2mM, 11.5 µl de primers (S), 11.5 µl de primers (AS), les 25.6 µl de γ32 oligo, 2.3 µl de Taq polymerase (AmpliTaq DNA polymerase with GeneAmpli, de c/o Perkin-Emler) et 87.1 µl d'H_2O.

L'analyse des résultats a été faite par électrophorèse sur un gel d'acryl. C'est pourquoi 20µl de la solution amplifiée ont été ajoutés à 50 µl de la solution-stop composée de 95% de formamide, 10mM NaOH, bromophénol, cyanobleu. Ce mélange a bouilli pendant 20 minutes, puis a été mis sur glace et a immédiatement été chargé sur un gel de séquençage (pour 60 ml de gel : 15 ml de MDE 2x, 6 ml de glycérol 87%, 300 µl d'APS, 50 µl de TEMED et 31.450 ml d'H_2O).
Finalement après migration pendant 16h à 10 Watt dans une pièce à 4°C et autoradiographie avec un écran d'intensification pendant 4-16h, les résultats ont été visualisés.

3) Résultats

3.1) Histologie conventionnelle

Nous avons regardé au microscope optique les coupes histologiques colorées à l'hématoxyline-éosine des biopsies de notre collectif de patients présentant une tumeur à cellules géantes osseuse. En comparant le nombre de cellules stromales avec le nombre de cellules géantes, nous avons observé 23 cas sur les 31 qui avaient plus de cellules stromales que de cellules géantes, 6 cas sur les 31 qui avaient autant de cellules stromales que de cellules géantes et 2 cas sur les 31 qui avaient plus de cellules géantes que de cellules stromales.

Sur les 31 cas étudiés, 3 cas présentaient une nécrose extensive touchant un tiers de l'ensemble de la tumeur.

L'aspect histologique classique d'une tumeur à cellules géantes osseuse est illustré sur la figure 2.

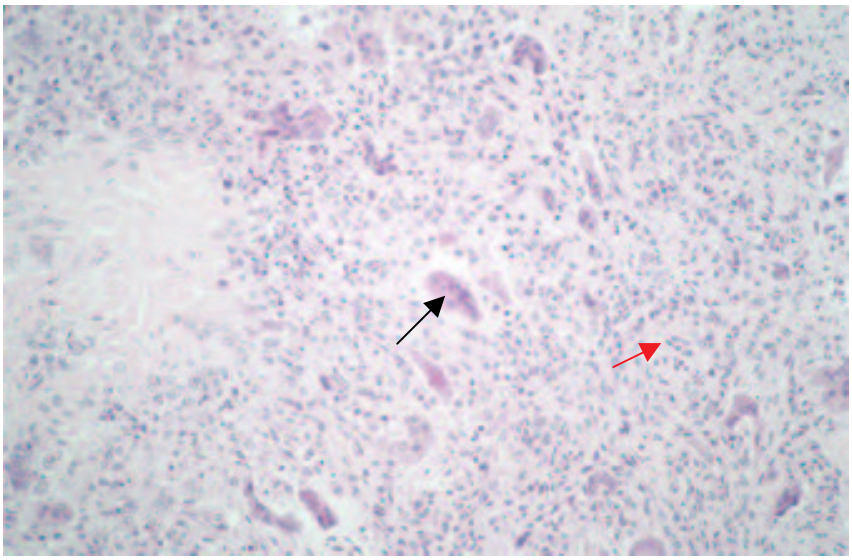

Figure 2.
Aspect histologique d'une tumeur à cellules géantes osseuse : cellules géantes « ↗ » sur un fond de cellules stromales mononuclées « ↘ » avec une zone de nécrose. Grossissement 200x.

3.2) Immunohistochimie

Tout d'abord nous avons étudié le pourcentage des noyaux des cellules stromales positifs pour l'anticorps MiB1 à l'IHC. Cet anticorps étant dirigé contre l'antigène nucléaire de prolifération Ki-67, le pourcentage de noyaux colorés équivaut au taux de prolifération cellulaire. Nous nous sommes intéressés au taux de prolifération dans le but de trouver une éventuelle corrélation entre le taux de prolifération, l'agressivité tumorale et le taux de récidive.
Sur nos 31 cas, 24 cas avaient un taux de prolifération < 10% (MiB1 < 10%), 9 cas avaient un taux de prolifération entre 10-50% et aucun cas n'avait un taux de prolifération > 50%.

Ensuite nous avons étudié l'intensité de la coloration immunohistochimique ainsi que la quantité de noyaux colorés pour les 3 anticorps dirigés contre la p53 (Pab240, DO7, CM1). Une cellule stromale était comptée et son intensité étudiée uniquement si son noyau était coloré, en effet la coloration du cytoplasme est non-spécifique.
Nous nous sommes intéressés à la quantité et à l'intensité de la coloration immunohistochimique des noyaux des cellules stromales car nous cherchions à mettre en évidence une éventuelle corrélation soit entre l'intensité de la coloration, l'agressivité et le taux de récidive ; soit entre la quantité de noyaux colorés, l'agressivité et le taux de récidive.

La technique d'immunohistochimie utilisée était la même pour les 3 anticorps anti-p53 (le DO7, le Pab240 et le CM1). Pour le Pab240 aucune cellule stromale de nos 31 tumeurs ne montrait de coloration nucléaire positive à l'IHC (bien que le cas contrôle utilisé ait montré une coloration positive des noyaux des cellules stromales, ce qui exclut un problème technique lors de la coloration).

Pour l'intensité de la coloration immunohistochimique des noyaux des cellules stromales 10 des 31 cas ne montraient aucune coloration pour le CM1 et 7 cas sur 31 pour le DO7. 7 sur 31 cas montraient une faible coloration des noyaux des cellules stromales pour le CM1 et 21 cas sur 31 pour le DO7. 10 sur 31 cas montraient une

coloration moyenne pour le CM1 et 5 cas sur les 31 pour le DO7. Finalement 6 sur 31 cas avaient une coloration forte pour le CM1 tandis qu'aucun cas n'avait une forte coloration pour le DO7.

Pour la quantité de noyaux des cellules stromales colorés à l'IHC, nous avions 7 cas sur les 31 qui présentaient une coloration focale pour le CM1 et 7 sur 31 pour le DO7, tandis que 16 des 31 cas avaient une coloration étendue pour le CM1 contre 19 sur 31 cas pour le DO7.

L'aspect du marquage de la p53 par l'anticorps CM1 est illustré sur la figure 3.

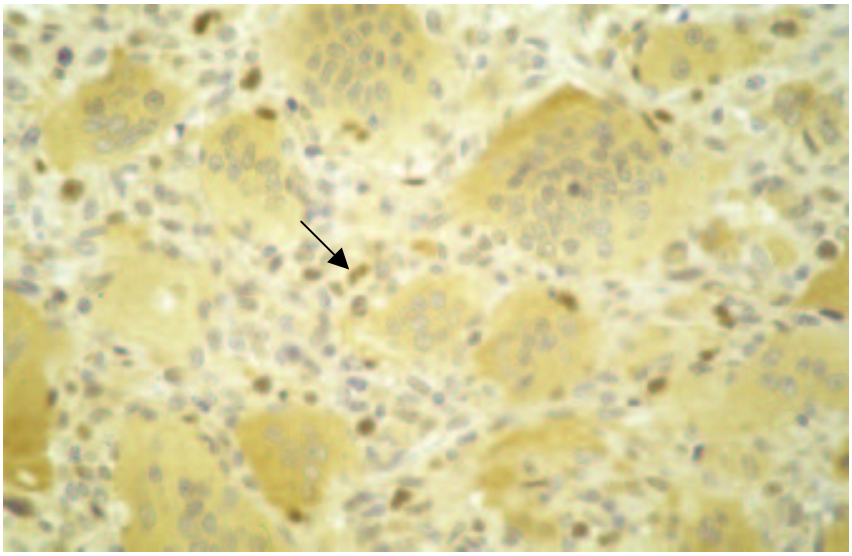

Figure 3.
Expression de la p53 dans une tumeur à cellules géantes osseuse. Cette zone montre une forte intensité de la coloration immunohistochimique des noyaux des cellules stromales « ↘ » sur une surface étendue (> 50% des noyaux des cellules stromales sont colorés).
Marquage de la p53 par l'anticorps CM1, grossissement 400x.

L'ensemble des résultats de l'immunohistochimie est rapporté ci-dessous dans le tableau V.

Tableau V : Résultats d' immunohistochimie

*cas	**p53 DO7	**p53 CM1	MiB1
1a	0/0	1/ focal	< 10%
1b	2/ étendu	0/0	10-50%
2a	1/ focal	1/ focal	< 10%
2b	1/ étendu	3/ étendu	< 10%
2c	1/ focal	3/ focal	< 10%
3	1/ étendu	2/ focal	< 10%
4	1/focal	2/ étendu	< 10%
5	0/0	3/ étendu	< 10%
6	2/ étendu	2/ focal	10-50%
7	0/0	0/0	< 10%
8	1/ étendu	1/ étendu	10-50%
9a	0/0	3/ étendu	< 10%
9b	0/0	0/0	< 10%
10	1/ étendu	2/ étendu	< 10%
11	1/ focal	2/ étendu	< 10%
12'	1/ étendu	0/0	< 10%
12''	1/ focal	2/ focal	< 10%
13	1/ étendu	0/0	10-50%
14a	1/ focal	1/ étendu	< 10%
14b	1/ étendu	1/ étendu	< 10%
14c	1/ focal	0/0	< 10%
15	0/0	0/0	< 10%
16	1/ étendu	3/ étendu	10-50%
17	0/0	1/ étendu	< 10%
18	1/ étendu	2/ étendu	< 10%
19	1/ étendu	2/ étendu	< 10%
20	2/ étendu	3/ étendu	< 10%
21	1/ étendu	1/ étendu	< 10%
22'	1/ étendu	2/ focal	10-50%
22''	1/ étendu	0/0	10-50%
23	1/ étendu	0/0	< 10%
24a	2/ étendu	0/0	10-50%
24b	2/ étendu	2/ étendu	10-50%

Les mêmes paramètres ont été étudiés pour l'anticorps Pab240 (intensité/quantité) mais ils étaient tous négatifs.

* : b et c = récidive de a

'' = la même tumeur que ' car < 6 mois entre les biopsies

** : intensité/quantité

3.3) Biologie moléculaire

Selon les critères décrits (cf. matériel et méthode 2.2), nous avons testé chaque cas pour déterminer lesquels présentaient un matériel susceptible de donner un résultat pouvant être considéré comme interprétable lors d'une analyse de l' « état » de la p53 par SSCP.

Rappelons que seuls les tissus donnant un signal positif avec la PCR pour la β-actine ont été définis comme de « bonne » qualité, c'est-à-dire pas ou peu dénaturés par la fixation en formol et l'enrobage en paraffine.

29 cas étaient positifs pour la β-globine de 100 paires de bases. Sur ces 29 cas, 21 étaient positifs pour la β-actine de 284 paires de bases (dont la taille est proche de la taille des fragments d'ADN de la p53 que nous avons amplifiés). Ces 21 cas ayant répondu aux critères de qualité, ils ont été retenus pour tester l'« état » de la p53.

Sur ces 21 cas, aucun n'a montré de mutation pour les exons 5, 6, 7 et 8 de la p53.

Si l'analyse par SSCP avait révélé une bande aberrante, nous aurions séquencé le gène de la p53 pour cet échantillon, pour confirmer et caractériser la nature de la mutation. Pour confirmer l'hypothèse de cette « mutation » nous aurions analysé l'ADN d'un tissu sain du patient si disponible (sinon grâce à une micro-dissection du tissu sain autour de la TCG). Si la mutation avait été trouvé que dans le tissu tumoral, cela aurait suggéré qu'elle avait été induite lors du processus tumoral. Alors que si le séquençage des 2 tissus (le sain et le tumoral) avait montré la même « anomalie » cela aurait suggéré un polymorphisme génétique.

Le tableau VI résume les résultats de l'étude en biologie moléculaire.

La figure 4 représente l'analyse par SSCP de l'exon 6 du gène de la p53 dans les TCG.

Tableau VI : Résultats de SSCP sur les exons 5 à 8 de la p53

* cas	PCR B-GL100	PCR B-AC284	mutation ex5(2a)	mutation ex5(2b)	mutation ex6.1	mutation ex7.2	mutation ex8.2
1a	O	O	WT	WT	WT	WT	WT
1b	O	O	WT	WT	WT	WT	WT
2a	O	O	WT	WT	WT	WT	WT
2b	O	O	WT	WT	WT	WT	WT
2c	O	N					
3	O	O	WT	WT	WT	WT	WT
4	O	O	WT	WT	WT	WT	WT
5	O	O	WT	WT	WT	WT	WT
6	O	O	WT	WT	WT	WT	WT
7	O	O	WT	WT	WT	WT	WT
8							
9a	O	N					
9b	O	O	WT	WT	WT	WT	WT
10	O	O	WT	WT	WT	WT	WT
11	O	O	WT	WT	WT	WT	WT
12’	O	O	WT	WT	WT	WT	WT
12’’							
13	O	O	WT	WT	WT	WT	WT
14a							
14b	O	O	WT	WT	WT	WT	WT
14c	O	N					
15	O	N					
16	O	O	WT	WT	WT	WT	WT
17	O	O	WT	WT	WT	WT	WT
18	O	N					
19	O	N					
20	O	N					
21	O	O	WT	WT	WT	WT	WT
22’							
22’’	O	O	WT	WT	WT	WT	WT
23	O	N					
24a	O	O	WT	WT	WT	WT	WT
24b	O	O	WT	WT	WT	WT	WT
contrôles							
**« N »			WT	WT	WT	WT	WT
Daudi			WT	WT	M	WT	WT

M=MUTE

N=NON

O=OUI

WT=WILD TYPE

** « N »= contrôle négatif

Daudi= contrôle positif

* : b et c = récidive de la tumeur primitive a
'' = la même tumeur que ' car < 6 mois entre les 2 biopsies
B-GL = β-globine
B-AC = β-actine

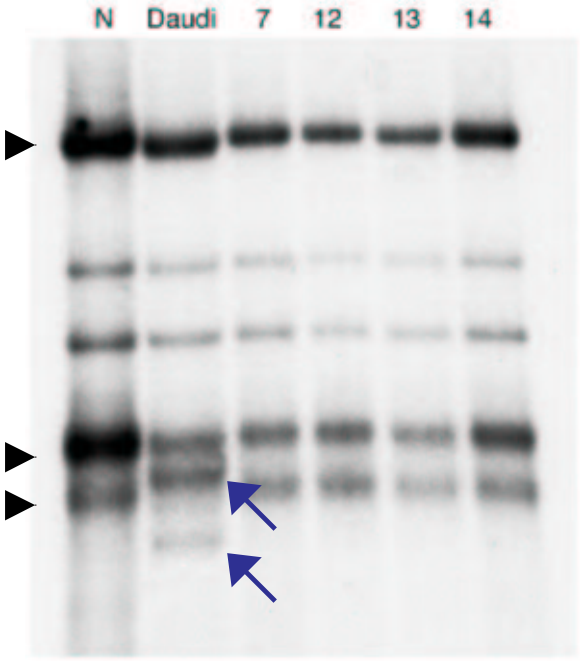

Figure 4.
Analyse par SSCP de l'exon 6 du gène de la p53 dans les tumeurs à cellules géantes osseuses.
La ligne N (cellules extraites du tissu amygdalien) montre un cas dont on sait qu'il ne comporte pas de mutation pour l'exon 6 (contrôle négatif). « ▶ » = bande normale
La ligne Daudi (cellules extraites à partir d'un lymphome de Burkitt) montre un cas dont on sait qu'il comporte une mutation dans l'exon 6 (contrôle positif)(28).
« → » = bande anormale
Les lignes 6, 11, 12' et 13 montrent 4 tumeurs à cellules géantes osseuses de notre étude qui ne montrent pas de mutation de l'exon 6.

4) Discussion

Dans notre étude, nous avons cherché à détecter par immunohistochimie la présence de la p53 dans les tumeurs à cellules géantes osseuses primaires ainsi que dans les récidives de notre collectif de patients. Puis nous avons utilisé la technique de SSCP pour détecter d'éventuelles mutations de la p53 (en effet l'immunohistochimie ne permet pas de différencier la forme native de la forme mutée de la p53). Nous avons également étudié le taux de prolifération cellulaire dans ces TCG, en recherchant une éventuelle corrélation entre le taux de prolifération et le taux de récidive, dans le but de prédire l'évolution tumorale. De plus pour rechercher s'il existait une corrélation entre l'intensité ou la quantité de cellules positives à l'immunohistochimie (pour les anticorps dirigés contre la p53) avec l'agressivité tumorale et le risque de récidive de la tumeur à cellules géantes osseuses, nous avons étudié l'intensité ainsi que la quantité de noyaux de cellules stromales colorés à l'immunohistochimie. En effet notre première hypothèse était qu'une tumeur fortement positive à l'immunohistochimie (pour les anticorps dirigés contre la p53) était plus agressive et récidivait plus souvent qu'une tumeur ayant une immunoréaction plus faible. Tandis que notre deuxième hypothèse était qu'une tumeur avec une grande quantité de noyaux des cellules stromales positifs à l'immunohistochimie, était plus agressive et récidivait plus souvent qu'une tumeur avec une immunoréaction limitée.

Pour notre collectif, nous retrouvons les mêmes pourcentages de patients par localisation que dans les données de Manaster et collaborateurs (1) avec 25% de TCG dans le fémur ; 34% dans le tibia ; 13% dans le radius et 4% dans d'autres localisations (dans le péroné, l'omoplate, la vertèbre, le métatarse, la phalange, le sacrum et l'aile iliaque).

Mais contrairement à son étude, nous avons une prédominance masculine avec 70% (17/24) d'hommes pour 30% (7/24) de femmes dans notre collectif de patients.

Dans notre étude, la majorité des cas montre un faible indice de prolifération avec seulement 9/33 cas montrant 10-50 % de noyaux positifs pour le MiB1 et aucune tumeur ayant plus de 50% de noyaux positifs. Sur les 5 tumeurs ayant récidivé, une avait un taux de prolifération de 10-50 % et 4 un taux <10%. Le taux de prolifération cellulaire ne peut donc pas être considéré comme un facteur prédictif de récidive pour les tumeurs à cellules géantes osseuses. Nos résultats concordent avec l'étude de Suhl et collaborateurs (5), selon laquelle l'index de prolifération et l'angiogenèse tumorale ne sont pas des paramètres utiles pour prédire la récidive des TCG.

Nous avons trouvé, par immunohistochimie, 26/33 cas positifs pour le DO7 ; 23/33 cas positifs pour le CM1 et 0/33 cas positifs pour le Pab240. 3 tumeurs ne montraient pas de positivité immunohistochimique et cela pour aucun des 3 anticorps anti-p53 (CM1, DO7 ou Pab240), les 30 autres étaient positives, soit pour le DO7 ou le CM1, soit pour les 2. Aucune des tumeurs ne montrait de positivité immunohistochimique pour le Pab240. La coloration était rarement forte et diffuse comme c'est le cas pour d'autres tumeurs notamment les tumeurs malignes. Il n'y avait pas de différence significative entre les colorations avec le DO7 et le CM1.

Nos résultats sont en contradiction avec l'étude de Souza (33) selon laquelle aucune de leurs 9 tumeurs à cellules géantes osseuses n'était positive pour le DO7. L'étude était faite à partir de matériel fixé en formol tamponné et enrobé en paraffine et la technique d'immunomarquage utilisait, comme nous, la technique du micro-ondes pour le démasquage des antigènes.

Pour les 4 cas ayant récidivé (dont 1 cas avec 2 récidives), la ou les récidives ne montraient pas une positivité immunohistochimique pour les anticorps anti-p53 DO7 et CM1, significativement plus intense que pour la tumeur primitive. De plus les tumeurs ayant récidivé n'avaient pas non plus une coloration plus étendue et plus forte que celles qui n'avaient pas récidivé.

Donc l'intensité et la quantité de noyaux des cellules stromales, positifs à l'immunohistochimie, ne sont pas des paramètres utiles pour prédire une récidive.

L'immunohistochimie ne nous permettant pas de déterminer si la p53 est mutée ou non, nous avons recherché d'éventuelles mutations par SSCP. Par cette technique, nous n'avons pas pu mettre en évidence aucune mutation sur les 21 cas de tumeurs ayant été analysées pour les exons 5 à 8 de la p53 (ces exons étant les localisations les plus fréquentes de mutation de la p53).

Aucune tumeur de notre étude n'a montré d'immunoréactivité pour le Pab240 et aucune tumeur ne présentait de mutation de la p53, ce qui est en accord avec l'étude de Chemeris (21) selon laquelle le Pab240 serait un anticorps qui reconnaît un épitope (entre l'acide aminé 156 et 214) de la p53 qui semble être exprimé comme le résultat d'un effet commun de conformation exercé par différentes mutations de la p53 (21).

Une question importante soulevée par nos résultats, est liée à la cause de l'accumulation du produit du gène de la p53. Bien que l'on pense que dans la majorité des cas, l'accumulation de la protéine p53 est le résultat d'une augmentation de la stabilité, due à une mutation du gène de la p53, des mécanismes alternatifs peuvent être suggérés.

Premièrement, il est difficile d'exclure la possibilité que dans certains cas la surproduction de la p53 (probablement due à une altération de certains gènes régulateurs) soit si massive que l'instable protéine p53 native devienne détectable par immunohistochimie. De la même manière, la protéine p53 est soumise à des modifications post-translationnelles ou peut être stabilisée par d'autres protéines cellulaires, tels les inhibiteurs de la p53 : MDM2 et $p14^{ARF}$. Une amplification de MDM2 (34) ou du $p14^{ARF}$ pourrait également expliquer la présence de tumeurs malgré un taux élevé de protéine p53 non mutée.

Deuxièmement, quelques mutations peu fréquentes en dehors des exons 5 à 8 de la p53 pourraient être responsables de l'accumulation de la p53 dans certains cas. Quoique, vu la rareté de ce type de mutation, cette explication soit hautement improbable.
Finalement la technique de SSCP ne détecte pas toutes les mutations sur un fragment donné d'ADN (35,36). En effet il existe par exemple des résultats de SSCP faussement négatifs. C'est le cas lorsque la forme mutante ne présente pas de migration anormale sur le gel électrophorétique (36). Le contraire peut aussi se voir, comme lors d'un polymorphisme génétique où la migration sur le gel d'électrophorèse est anormale alors que la mutation est silencieuse (35).

Conclusion

Les résultats de notre étude nous permettent de conclure que les mutations de la p53 ne sont pas importantes dans la progression des tumeurs à cellules géantes osseuses. Néanmoins le collectif de patients de notre étude était réduit ; c'est pourquoi il serait intéressant de faire une étude sur un collectif plus grand avec une évolution à plus long terme. Il serait également intéressant de chercher si le taux des inhibiteurs de la p53 est augmenté, ce qui expliquerait que bien que le taux de la p53 soit élevé il n'y ait pas de réparation de l'ADN, favorisant ainsi la survenue de tumeurs.

5) Références

1. B.J Manaster and Anthony J.Doyle. Giant Cell Tumors of Bone. Radiol. Clin. North. Am. 1993;31:299-323.

2. Raphael R.Goldenberg, Crawford J.Campbell and Michael Bonfiglio. Giant-Cell Tumor of Bone. An Analysis of Two Hundred and Eighteen Cas. J. Bone and Joint Surg. 1970, 52-A;619-664

3. H. R. Blackley, J. S. Wunder, A. M. Davis, L. M. White, R. Kandel and R. S. Bell. Treatment of Giant-Crell Tumors of Long Bones with Curettage and Bone-Grafting. J. Bone and Joint Surg. 1999, 81-A;811-820.

4. Nils Albrechtsen, Irene Dornreiter, Frank Grosse, Elle Kim, Lisa Wiesmuller and Wolfgang Deppert. Maintenance of genomic Integrity by p53: Complementary Roles for Actived and non-actived p53. Oncogene 1999;18:7706-7717.

5. Muhammadsamir A. Sulh. M Alba Graco, Tony Jiang, Sunanda B. Goswami, David Present and German Steiner. Proliferation Index and Vascular Density of Giant-Cell Tumors of Bone. Are They Prognostic Markers?. Cancer 1996, 77; 2044-2051.

6. Atef S. Sara, Alberto G. Ayala, Adel El-Naggar, Jae Y. Ro, Austin K. Raymond and John A. Murray. Giant Cell Tumor of Bone. A Clinicopathologic and DNA Flow Cytimetric Analysis. Cancer 1990, 66; 2186-2190.

7. David W. Meek. Mechanisms of Switching on p53: a Role for Covalent Modification?. Oncogene 1999;18:7666-7675.

8. Silvano Bosari, Antonio Marchetti, Fiamma Buttitta, Daniela Graziani, Giorgio Borsani , Massimo Loda and all.. Detection of p53 Mutations by Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP) Gel Electrophoresis. Diagn. Mol. Pathol. 1995;4:249-255.

9. Mats Ljungman. Dial 9-1-1 for p53 : Mechanisms of p53 Activation by Cellular Stress. Neoplasia 2000;2:208-225.

10. Monica Hollstein, David Sidransky, Bert Vogelstein, Cirtis C.Harris. p53 Mutations in Humans Cancers. Sciences 1991;253:49-53.

11. E.Rubin, J.L. Fraber. Neoplasia: in: E. Rubin, J.L. Farber, editors. Pathology. 2nd ed. Philadelphia: J.B. Lippincott Company; 1994. p.182-183.

12. Pierre May, Evelyne May. Twenty Years of p53 Research: Structural and Functional Aspects of the p53 Protein. Oncogene 1999;18:7621-7636.

13. Junya Toguchida, Toshikazu Yamaguchi, Bruce Ritchie, Roberta L. Beauchamp, Siri H. Dayton, Guillermo E. Herrera and all. Mutation Spectrum of the p53 Gene in Bone and Soft Tissue Sarcomas. Cancer Res. 1992, 52; 6194-6199.

14. Stephen B. Hunter, Cladiu Bandea, David Swan, Karen Abbott and Vijay A. Varma. Mutations in the p53 Gene in Astrocytomas: Detection by Single-Strand Conformation Polymorphism Analysis and Direct DNA Sequencing. Mod.Pathol. 993;6:442-445.

15. Nicholas D. Lakin,and Stephen P.Jackson. Regulation of p53 in Response to DNA Damage. Oncogene 1999;18:7644-7655.

16. Greg Matlashewski. p53: Twenty Years on, Meeting Review. Oncogene 1999,18:7618-7620.

17. Margaret Ashcroft, Karen H Vousden. Regulation of p53 Stability. Oncogene. 1999;18:7637-7643.

18. Damian BS. Yap, Jung-Kuang Hsieh, Florence SG Chan and Xin Lu. mdm2: a Bridge over the two Tumor Suppressors, p53 and Rb. Oncogene 1999;18:7681-7689.

19. Fredrick S. Leach, Takashi Tokino, Paul Meltzer, Marilee Burrell, Jonathan D. Oliner, Sharon Smith and all. p53 Mutation and MDM2 Amplification in Human Soft Tissue Sarcomas. Cancer Res. 1993, 53; 2231-2234.

20. Gretchen S. Jimenez, Shireen H. Khan, Jayne M. Stommel and Geoffrey M.Wahl. p53 Regulation by Post-translational Modification and Nuclear Retention in Response to Diverse Stresses. Oncogene 1999;18:7656-7665.

21. Galina Chemeris, Alexandre Loktinov, Annette Rempel, Michael Schwarz and Peter Bannasch. Elevated Content of p53 Protein in the Absence of the p53 Gene Mutations as a Possible Prognostic Marker fot Human Renal Cell Tumors. Virchows Arch. 1995, 426; 563-569.

22. David W. Yandell and D Thor. p53 Analysis in Diagnostic Pathology. Diagn. Mol. Pathol. 1993, 2; 1-3.

23. Michael D.Linden, S. David Nathanson, and Richard J. Zarbo. Evaluation of anti-p53 Antibody Staining Immunoreactivity in Benign Tumors and Nonneoplastic Tissues. Philadelphia 1995;3:232-238.

24. B. Wadayama, J. Toguchida, T. Yamaguchi, M. S. Sasaki, Y. Kotoura and T. Yamamuro. p53 Expression and its Relationship to DNA Alterations in Bone and Soft Tissue Sarcomas. Br. J. Cancer 1993, 68; 1134-1139.

25. Corine Tenaud, Adrien Negoescu, Françoise Labat-Moleur, Yann Legros, Thierry Soussi and Elizabeth Brambilla. p53 Immunolabeling in Archival Paraffin-Embedded Tissues: Optimal Protocol Based on Microwave Heating for Eight Antibodies on Lung Carcinomas. Mod. Pathol. 1994;7:853-859.

26. John L.Langemeier, R. Frank Cok, Charles J.Issel and Ronald C.Montelaro. Short Technical Reports. Biotechniques 1994;17:490-496.

27. Masato Orrita, Youichi Suzuki, Takao Sekiya and Kenshi Hayashi. Rapid and Sensitive Detection of Point Mutations and DNA polymorphisms Using the Polymerase Chain reaction. Genomics 1989;5:874-879.

28. Antonio Marchetti, Giorgio Merlo, Fiamma Buttitta, Silvia Pellegrini, Robert Callahan Maria Bistocchi and all. Detection of DNA Mutations in Acid Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Archival Tumor Specimens by Polymerase Chain Reaction-Single Strand Conformation Polymorphism Analysis. Cancer Detection and Prev. 1995;19:278-281.

29. Emma D'Andrea, Raffael Baffa, Chiara Menin, Marco Montagna, Massimo Rugge, Luigi Chieco-Bianchi. TP53 Gene Mutations in Gastric Carcinoma Detected by Polymerase Chain Reaction/Single Strand Conformation Polymorphism Ananlysis of Archival Material. J. Cancer Res. Clin. Oncol. 1995;121:79-83.

30. Françoise Boman, Julius Peters, Nicola Ragge and Timothy Triche. Infrequent Mutation of the p53 Gene in fibrous Tumors of Infancy and Chilhood. Diagn. Mol. Pathol. 1993;2:14-22.

31. S.P. Chellappan, E.Culotta, J.A. De Caprio, S.H. Friend, E. Harlow, C.C. Harris. Le cancer. Lodish, Baltimore, Berk, Zipursky, Matzudaira, Darnell, éditeurs. Biologie moléculaire de la cellule. Italie: De Boeck Université ; 1997. p.1265-1267.

32. David Esrig, Donald Elmajian, Susan Groshen, John A. Freeman, John P. Stein, Su-Chiu Chen and all. Accumulation of Nuclear p53 and Tumor Progression in Bladder Cancer. N.Engl J.Med.1994;331:1259-1264.

33. PAE Souza, JFO Paim, JN Carvalhais,and RS Gomez. Immunohistochemical Expression of p53, MDM2, Ki-67 and PCNA in Central Giant Cell Granuloma and Giant Cell Tumor. J. Oral Pathol. Med. 1999, 28; 54-8.

34. Antonio Pellin, Javier Boix-Ferrero, Domenica Carpio, Dolores Lopez-Terrada, Carmen Carda, Samuel Navarro and all. Molecular Alteration of the RB1, TP53, and MDM2 Genes in Primary and Xenografted Human Osteosarcomas. Diagn. Mol. Pathol. 1997;6:333-341.

35. Giandluca Gaidano, Paola Ballerini, Jerry Z. Gong, Giorgio Inghirami, Antonio Neri, Elizabeth W. Newcomb and all. p53 Mutations in Human Lymphoid Malignancies: Associations with Burkitt Lymphoma and Chronic Lymphocytic Leukemia. Proc. Natl. Acad. Sci. 1991;88:5413-5417.

36. Alvaro S. Sarkis, Guido Dalbagni, Carlos Cordon-Cardo, Zuo-Feng Zhang, Joel Shienfeld, William R. Fair et collaborateurs. Nuclear Overexpression of p53 Protein in transitional Cell Bladder Carcinoma: A Marker for Disease Progression. J. Natl. Cancer Inst. 1993;85:53-59.