

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

**Caractérisation de la cellule myoépithéliale
du sein fœtal, adulte normal et pathologique**

PAR

FRANCINE JOLICOEUR

FACULTÉ DE MÉDECINE

THÈSE PRÉSENTÉE À LA FACULTÉ DES ÉTUDES SUPÉRIEURES

EN VUE DE L'OBTENTION DU GRADE DE

PHILOSOPHIAE DOCTOR (PH.D.)

EN PATHOLOGIE ET BIOLOGIE CELLULAIRE

OPTION BIOLOGIE DU CANCER

MAI 2004

© FRANCINE JOLICOEUR, 2004



W

4

U58

2004

V. 118

Direction des bibliothèques

AVIS

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

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

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

NOTICE

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

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

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

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL
FACULTÉ DES ÉTUDES SUPÉRIEURES

CETTE THÈSE INTITULÉE :
Caractérisation de la cellule myoépithéliale
du sein foetal, adulte normal et pathologique

PRÉSENTÉE PAR :
FRANCINE JOLICOEUR

A ÉTÉ ÉVALUÉE PAR UN JURY COMPOSÉ DES PERSONNES SUIVANTES :

PRÉSIDENT-RAPPORTEUR

DIRECTEUR DE RECHERCHE

CO-DIRECTEUR

MEMBRE DU JURY

EXAMINATEUR EXTERNE

REPRÉSENTANT DU DOYEN DE LA FES

SOMMAIRE

La cellule myoépithéliale mammaire (CMEM) possède des caractéristiques uniques. Située à la base de l'épithélium glandulaire du sein, elle présente des propriétés mixtes, épithéliales et musculaires. Parce qu'elle ne synthétise pas de protéines du lait (sa contraction en faciliterait simplement l'éjection) et qu'elle semble rarement donner naissance au cancer mammaire, on l'a rapidement jugée accessoire. Plus d'un siècle après la description initiale de la CMEM, sa nature véritable demeure donc méconnue. Paradoxalement, en pathologie mammaire, on recherche quotidiennement les CMEM autour des foyers de carcinome par immunohistochimie (IHC), leur disparition étant un indice probant de malignité. Déterminer la présence ou l'absence de CMEM a donc une grande importance pour les patientes atteintes de cancer; l'alpha-actine du muscle lisse demeure le principal marqueur employé à cette fin. Nonobstant la réputation d'«alliée de l'hôte» de la CMEM, un nombre grandissant d'études moléculaires suggèrent que des carcinomes du sein particulièrement agressifs tirent leur origine de cette cellule méconnue.

Estimant que le faible nombre et la spécificité des marqueurs de CMEM utilisés couramment en sénologie pourraient contribuer à masquer l'importance physiologique de ce type cellulaire chez l'humain, nous avons caractérisé les CMEM d'échantillons de sein foetal (12), de sein adulte normal au repos (13) et de diverses lésions mammaires (16), principalement par microscopie optique et par immunohistochimie indirecte. Nous avons aussi employé des colorations enzymatiques et des réactions de transcription inverse suivies de réactions de polymérase en chaîne (RT-PCR) sur cellules microdisséquées au laser. Ces travaux visaient à mieux documenter les propriétés de la CMEM, notamment pour optimiser sa recherche par IHC à des fins diagnostiques, pour approfondir des aspects encore sous-documentés/controversés de sa biologie et pour préciser le contexte d'utilisation, en pathologie mammaire, de 15 marqueurs myoépithéliaux reconnus et putatifs.

Nos travaux apportent des précisions inédites sur les propriétés de CMEM humaines fœtales et pathologiques et mettent en évidence des variations inattendues, non aléatoires du phénotype de la CMEM humaine; certaines de ces variations sont similaires dans le sein foetal, adulte normal et pathologique. Nos données s'opposent à la réputation de «cellules

l'établissement et à la médiation d'interactions épithélio-stromales que tout autre type cellulaire de l'épithélium mammaire et pourraient être des constituants cruciaux du micro-environnement de progéniteurs mammaires (et/ou même agir elles-mêmes comme progéniteurs dans certains contextes).

Par l'importance physiologique qu'elles confèrent aux CMEM, nos observations ouvrent des avenues nouvelles pour la solution de problèmes de sénologie auxquels les cliniciens et chercheurs se heurtent et ce, parfois depuis des décennies. À moyen terme, nos travaux devraient permettre d'optimiser les batteries d'anticorps utilisées à des fins de diagnostic en pathologie mammaire. Enfin, nos résultats nous amènent à proposer un modèle original de l'initiation de la morphogenèse du sein *in utero* et à redéfinir les CMEM comme des cellules plastiques qui, au travers d'interactions impliquant des signaux de nature biochimique, spatiale et/ou physique, subissent les influences inductives de leur micro-environnement (la jonction épithélio-stromale du sein) et agissent à leur tour sur celui-ci.

MOTS CLÉS

Cellule myoépithéliale mammaire, développement, histologie, humain, immunohistochimie, médecine translationnelle, oncologie, pathologie, physiologie, sein

ABSTRACT

As their name suggests, the myoepithelial cells that form the basal layer of the human mammary epithelium (CMEM) disclose smooth muscle-like and epithelial properties. Since they do not synthesize milk proteins (their contraction is thought to facilitate milk ejection) and they very seldom give rise to carcinomas of the breast, they are usually perceived as accessory breast cells. Their study has been neglected: more than a century after their discovery, their properties remain ill-defined and often controversial. Paradoxically, immunohistochemical (IHC) localization of CMEM is an important, daily diagnostic procedure in breast pathology which has serious consequences for patients: indeed, a discontinuous layer of residual CMEM (typically located using alpha-smooth muscle actin) is strongly suggestive of invasion. Nevertheless, according to recent molecular studies, some aggressive breast carcinomas could unexpectedly arise from the “host-friendly” CMEM.

As we believe that the small number and the specificity of the CMEM markers currently used in breast studies might contribute to obscuring the importance of this cell type in human medicine, we studied the CMEM in fetal breasts (12), adult normal resting breasts (13) and various breast lesions (16), mainly by light microscopy and immunohistochemistry. We also used histochemical methods for enzymes and reverse transcription – polymerase chain reactions on samples of laser microdissected cells. We did this in order to optimize CMEM localization by IHC for diagnostic purposes, to explore unknown/controversial aspects of CMEM biology, and to evaluate the efficiency of 15 recognized and putative myoepithelial markers in current breast pathology uses.

Our study allowed us to make original observations on the properties of fetal and pathological CMEM; it also highlighted unexpected, non-random variations of the human mammary myoepithelial phenotype; some of these variations were found in the fetal breast, the adult normal resting breast and in various breast lesions. Contrary to the notion that CMEM are «accessory» breast cells, our data indicate that they are more likely than any other mammary epithelial cell type to mediate epithelial-mesenchymal interactions and that they could be essential components of the elusive mammary stem cell’s microenvironment (and/or perhaps act sometimes themselves as progenitors).

Our data endow the human CMEM with a physiological importance at least equal to that of luminal epithelial breast cells, hence providing new insights into several unsolved problems in breast pathology. We believe our findings should facilitate the optimization of antibody panels used for diagnostic purposes in the near future. Our results lead us to propose a new model of early human mammary morphogenesis and re-define CMEM as highly plastic cells that act on - and are acted upon - by their microenvironment (the breast's epithelial-stromal junction) through multiple interactions involving their integration of biochemical, spatial as well as physical inductive cues.

KEY WORDS

Breast, development, histology, human, immunohistochemistry, mammary myoepithelial cell, oncology, pathology, physiology, translational medicine

TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE.....	III
MOTS CLÉS	IV
ABSTRACT	V
KEY WORDS	VI
TABLE DES MATIÈRES	VII
LISTE DES TABLEAUX.....	X
LISTE DES FIGURES	XI
LISTE DES SIGLES ET DES ABRÉVIATIONS.....	XIII
INTRODUCTION.....	1
REVUE DE LITTÉRATURE.....	2
Le sein adulte normal au repos.....	2
Architecture sub-macroscopique	2
La jonction épithélio-stromale mammaire.....	4
Lames basales, hémidesmosomes et interactions épithélio-stromales	5
L'état (complexe) de repos du sein	6
Le cycle mensuel du sein	7
Ces insaisissables progéniteurs du sein adulte	9
La cellule myoépithéliale du sein adulte au repos	11
LE SEIN FOETAL.....	14
Morphogenèse <i>in utero</i>	15
Les précurseurs myoépithéliaux du sein foetal.....	17
Le sein pathologique	18
De bénignité à malignité : une progression?	19
Outils complémentaires de diagnostic des lésions mammaires	19
Localisation de la lame basale.....	20
Localisation de cellules myoépithéliales résiduelles.....	20
Hétérogénéité pathologique et systèmes de classification.....	21
Sources de confusion en pathologie mammaire	22
Cellule myoépithéliale humaine résiduelle, altérée, ou pathologique	23
HYPOTHÈSE DE RECHERCHE	24
OBJECTIFS	24
PLAN DE L'ÉTUDE	24
MATÉRIEL ET MÉTHODES	26
MATÉRIEL	26
Échantillons de sein foetal.....	26
Échantillons de sein adulte normal au repos	28
Échantillons de sein pathologique.....	29
Tissus de contrôle.....	29

MÉTHODES.....	31
Préparation des spécimens	31
Échantillons de sein foetal.....	31
Échantillons de sein adulte normal au repos	31
Échantillons de sein pathologique	32
Tissus de contrôle.....	32
Microscopie optique (MO).....	32
Immunohistochimie (IHC).....	32
Microdissection par capture au laser sur coupes de sein adulte normal au repos	41
Techniques de biologie moléculaire (sein adulte normal au repos)	43
Extraction d'ARN total de matériel microdisséqué	43
Réaction de transcription inverse (RT).....	44
Réaction de polymérase en chaîne (PCR)	44
Documentation visuelle des résultats	46
RÉSULTATS.....	47
MICROSCOPIE OPTIQUE (MO)	47
Sein foetal (deuxième trimestre de gestation)	47
Structures épithéliales.....	47
Mésenchyme de soutien	50
Sein adulte normal au repos	51
Sein pathologique.....	52
IMMUNOHISTOCHIMIE (IHC).....	56
RÉACTION DE TRANSCRIPTION INVERSE SUIVIE D'UNE RÉACTION DE POLYMÉRISE EN CHAÎNE (RT-PCR).....	93
DISCUSSION	97
PREMIÈRE PARTIE : DESCRIPTION ET ANALYSE DES RÉSULTATS	97
Le sein foetal et les précurseurs de la cellule myoépithéliale mammaire	97
Primordium mammaire ou mamelonaire?	98
Révision du profil antigénique des précurseurs foetaux de la cellule myoépithéliale... 100	
Indices d'une modulation de la différenciation dans l'espace et dans le temps	102
Autres considérations relatives au sein foetal	103
La cellule myoépithéliale dans le sein adulte normal au repos	105
La vacuolisation de cellules basales/myoépithéliales mammaires adultes.....	105
Un immunophénotype incomplètement caractérisé.....	106
Des variations non aléatoires de l'immunophénotype myoépithélial normal	107
Une reconnaissance entravée	111
Des variations non aléatoires de l'activité de phosphatase alcaline endogène.....	112
Une régulation différentielle des niveaux d'expression de la kératine 14?.....	114
La cellule myoépithéliale du sein pathologique	116
Efficacité des marqueurs myoépithéliaux à l'étude vis-à-vis de pratiques usuelles de pathologie mammaire	117
Des marqueurs pour l'étude et le diagnostic de carcinomes myoépithéliaux	121
La demande - irréaliste? - faite aux marqueurs du phénotype myoépithélial mammaire	123
De multiples phénotypes myoépithéliaux résiduels... et péri-lésionnels.....	125
DEUXIÈME PARTIE : UNE REDÉFINITION ET UN MODÈLE DE CROISSANCE PHYSIOLOGIQUE	126
Redéfinition des cellules myoépithéliales du sein.....	129
Un modèle de l'initiation de la morphogénèse du sein <i>in utero</i>	130

TROISIÈME PARTIE : IMPLICATIONS DE NOS TRAVAUX POUR LA SÉNOLOGIE FONDAMENTALE ET APPLIQUÉE.....	138
Implications théoriques et pratiques pour la sénologie	139
Étudier des fonctions et potentiels plutôt que des populations cellulaires?.....	141
Avenues de recherche.....	147
Un nouveau compartiment stromal?.....	148
Fibroblastes mammaires, CD34 et défense de l'hôte	148
Des anastomoses canalaïres.....	150
La peau, ses annexes et la pathologie mammaire	151
Réversion au niveau de métastases... et de primaires?	152
Vers un modèle probabiliste de la physiologie mammaire.....	154
Explication du modèle envisagé.....	158
Autres contextes	163
CONCLUSION.....	166
REMERCIEMENTS	169
SOURCES DOCUMENTAIRES.....	170
ANNEXES.....	I
ANNEXE I	II
ANNEXE II.....	III
ANNEXE III	IV
ANNEXE IV	VIII
ANNEXE V	XIII
ANNEXE VI	XVI
ANNEXE VII.....	XIX
ANNEXE VIII	XXI
ANNEXE IX	XXXIII
ANNEXE X.....	XXXV

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I	Revue des principales altérations morphologiques des unités canalo-lobulaires terminales associées aux différentes phases du cycle mensuel mammaire humain 8
Tableau II	Attributs morphologiques myoépithéliaux et luminaux dans le sein adulte 12
Tableau III	Propriétés antigéniques myoépithéliales et luminales distinctives dans le sein adulte 12
Tableau IV	Profil antigénique myoépithélial putatif dans le sein adulte..... 13
Tableau V	Propriétés myoépithéliales et luminales additionnelles dans le sein adulte 13
Tableau VI	Profil antigénique de précurseurs foetaux de la cellule myoépithéliale du sein selon la littérature 17
Tableau VII	Échantillons de sein foetal 27
Tableau VIII	Spécimens de sein adulte normal au repos 28
Tableau IX	Spécimens de sein pathologique 30
Tableau X	Antigènes-cibles 35
Tableau XI	Batterie immunohistochimique initiale de caractérisation 38
Tableau XII	Caractéristiques et conditions d'utilisation des anticorps primaires employés 40
Tableau XIII	Amorces de PCR..... 45
Tableau XIV	Propriétés antigéniques des cellules épithéliales basales de seins foetaux entre 20 et 24 semaines de gestation..... 66
Tableau XV	Propriétés antigéniques des cellules myoépithéliales dans le sein adulte normal au repos..... 70
Tableau XVI	Profil antigénique des précurseurs foetaux de la cellule myoépithéliale du sein (deuxième trimestre gestationnel) 101
Tableau XVII	Résumé sommaire du profil antigénique de la cellule myoépithéliale dans le sein adulte normal au repos selon la présente étude 107
Tableau XVIII	Résumé visuel des variations topographiques de l'immunophénotype myoépithélial dans le sein normal (foetal et adulte)..... 109
Tableau XIX	Degré d'efficacité attendu, selon cette étude, de marqueurs myoépithéliaux reconnus et putatifs dans le cadre d'usages actuels de la localisation par immunohistochimie de cellules myoépithéliales en pathologie mammaire 118
Tableau XX	Composition du mélange de RT xvi
Tableau XXI	Composition du mélange de base de PCR..... xvii
Tableau XXII	Conditions et produits de PCR xviii

LISTE DES FIGURES

Figure 1	Terminologie décrivant l'architecture sub-macroscopique du sein	3
Figure 2	Schéma de la jonction épithélio-stromale du sein au repos	4
Figure 3	Les composantes hémidesmosomales.....	6
Figure 4	Variations des activités mitotique et apoptotique dans l'épithélium pendant le cycle mensuel mammaire en fonction de l'âge et de la latéralité	9
Figure 5	Microdissection au laser par capture sur film thermoplastique	42
Figure 6	Primordium mammaire humain à 20 semaines de gestation (microscopie optique).....	48
Figure 7	Primordium mammaire humain à 21 semaines de gestation (microscopie optique).....	49
Figure 8	Populations cellulaires du bourgeon primaire et des projections secondaires du sein foetal à 21 semaines (microscopie optique).....	49
Figure 9	Mésenchyme de soutien mammaire humain à 21 semaines de gestation (microscopie optique)	51
Figure 10	Variabilité morphologique des cellules myoépithéliales du sein adulte normal au repos (microscopie optique)	52
Figure 10.5	Lésions du sein à l'étude en microscopie optique	54
Figure 11	Immunohistochimie, «sein» foetal à 15/16 semaines de gestation.....	58
Figure 12	Immunohistochimie, sein foetal et poils à 20 semaines de gestation	60
Figure 13	Immunohistochimie, sein foetal à 21/24 semaines de gestation	63
Figure 14	Caractérisation immunohistochimique de la cellule myoépithéliale dans le sein adulte normal au repos	67
Figure 15	Résultats immunohistochimiques autres dans le sein adulte normal au repos	71
Figure 16	Immunohistochimie, hyperplasie bilatérale floride du sein.....	74
Figure 17	Immunohistochimie, hyperplasie bilatérale floride du sein.....	75
Figure 18	Immunohistochimie, gynécomastie juvénile	76
Figure 19	Immunohistochimie, fibroadénome du sein	77
Figure 20	Immunohistochimie, carcinome canalaire infiltrant de bas grade.....	78
Figure 21	Immunohistochimie, carcinome canalaire infiltrant de haut grade avec métastases ganglionnaires.....	81
Figure 22	Immunohistochimie, carcinome canalaire infiltrant de haut grade sans métastase ganglionnaire.....	82
Figure 23	Immunohistochimie, carcinome lobulaire infiltrant de haut grade.....	83
Figure 24	Immunohistochimie, adénomyoépithéliome présumé du sein.....	84
Figure 25	Microscopie optique et immunohistochimie, adénomyoépithéliome malin du sein.....	85
Figure 26	Microscopie optique et immunohistochimie, myoépithéliome malin du sein et nodule bénin associé.....	87
Figure 27	Immunohistochimie, résultats obtenus pour le CD34 dans le sein et la peau de spécimens foetal, adulte normal et pathologiques.....	89
Figure 28	Activité de phosphatase alcaline endogène et glande mammaire humaine	91
Figure 29	Détection de l'ADN complémentaire du transcrite de la kératine 14 pour les cas N3, N12 et N5 de sein adulte normal au repos (PCR de 45 cycles)	93

Figure 30	Détection de l'ADN complémentaire du transcrit de la kératine 14 pour le cas N3 (représentants de doublets d'échantillons non montrés à la Figure 29).....	94
Figure 31	Détection de l'ADN complémentaire du transcrit de la β 2-microglobuline pour les cas N3, N5 et N12 de sein adulte normal au repos (PCR de 42 cycles).....	94
Figure 32	Détection de l'ADN complémentaire du transcrit de la β 2-microglobuline pour le cas N3 (représentants de doublets d'échantillons non montrés à la Figure 31).....	95
Figure 33	Recherche de l'ADNc complémentaire du transcrit de la γ -actine cytosquelettique pour les cas N3, N5 et N12 de sein adulte normal au repos.....	95
Figure 34	Modèle proposé de l'initiation de la morphogenèse du sein <i>in utero</i> (deuxième trimestre de gestation).....	132
Figure 35	Batterie d'anticorps suggérée.....	145
Figure 36	Potentiels de transformation envisagés de constituants mammaires humains.....	157
Figure 37	Appareil semi-automatique permettant la création de <i>microarrays</i> tissulaires	iv
Figure 38	Principaux avantages des <i>microarrays</i> tissulaires	v
Figure 39	Principaux inconvénients des <i>microarrays</i> tissulaires.....	vi
Figure 40	Microdissection sur le PixCell II	xv
Figure 41	Manifestations d'une distance film-tissu excessive en microdissection ..	xv
Figure 42	Résultats dans nos contrôles positifs d'immunohistochimi	xix

LISTE DES SIGLES ET DES ABRÉVIATIONS*

67LR :	récepteur de 67kDa de laminine
$\alpha 6$:	sous-unité d'intégrine alpha 6 (syn. CD49f)
α SMA :	alpha-actine du muscle lisse (angl. <i>alpha-smooth muscle actin</i>)
angl. :	en anglais
$\beta 1$:	sous-unité d'intégrine beta 1 (syn. CD29)
$\beta 2M$:	microglobuline beta-2
$\beta 4$:	sous-unité d'intégrine beta 4 (syn. CD104)
BP:	bourgeon(s) primaire(s) fœtal(aux)
CD10 :	syn. CALLA (angl. <i>common acute lymphoblastic leukaemia antigen</i>)
CE :	canal(aux) excréteur(s) du sein (extra-lobulaire(s))
CHUM :	Centre hospitalier de l'Université de Montréal
CLU :	cellule(s) luminale(s)
CLUM :	cellule(s) luminale(s) mammaire(s)
CME :	cellule(s) myoépithéliale(s)
CMEM :	cellule(s) myoépithéliale(s) mammaire(s)
CNN1 :	calponine
coll. :	collaborateur(s)
CollIV :	collagène de type IV
CollVII :	collagène de type VII
CRHSJ :	Centre de Recherche de l'Hôpital Sainte-Justine
CT :	canal(aux) terminal(aux)
Ctrl :	contrôle(s)
DAB :	3,5 - diaminobenzidine
ECM :	matrice extra-cellulaire (angl. <i>extracellular matrix</i>)
EMA :	antigène épithélial membranaire (angl. <i>epithelial membrane antigen</i>)
EMT :	transition épithéliale-à-mésenchymateuse (angl. <i>epithelial-mesenchymal transition</i>)
ePS :	extrémité(s) de projection secondaire mammaire foetale

* Cette section inclut les synonymes couramment utilisés pour certaines entités moléculaires.

équ-cell :	équivalents-cellules (unité d'approximation d'une quantité de matériel microdisséqué en nombre de cellules complètes)
ETOH :	éthanol
FI :	filament(s) intermédiaire(s)
γ ACT :	gamma-actine cytosquelettique
GFAP :	protéine gliale fibrillaire acide (angl. <i>glial fibrillary acid protein</i>)
h :	heure(s)
HD :	hémidesmosome(s)
HRP :	peroxydase du raifort (angl. <i>horseradish peroxydase</i>)
IHC :	immunohistochimie
kDa :	kilo Dalton
KRT14 :	kératine 14
KRT17 :	kératine 17
KRT19 :	kératine 19
LN5 :	laminine 5
LPF :	longueur du pied foetal
min :	minute(s)
MO :	microscopie optique
m-o :	four micro-ondes
pb :	paire(s) de bases
PCR :	réaction de polymérase en chaîne (angl. <i>polymerase chain reaction</i>)
PER :	peroxydase
PERe :	activité de peroxydases endogènes
PA :	phosphatase alcaline
PAe :	activité de phosphatases alcalines endogènes
PS :	projection(s) secondaire(s) mammaire(s) foetale(s)
réf. :	le lecteur peut se référer à
RF :	qualificatif de ce qui est exempt d'enzymes capables de digérer l'ARN (angl. <i>RNAse-free</i>)
ROES :	récepteurs d'oestrogènes
RP :	récepteurs de progestérone
RPM :	rotations par minutes (unité de vitesse en centrifugation)

RT-PCR :	réaction de transcription inverse suivie d'une réaction de polymérase en chaîne (angl. <i>reverse transcription – polymerase chain reaction</i>)
sec :	seconde(s)
S100A4 :	protéine S100 de type A4
S100 β :	protéine S100 de type bêta
syn. :	synonyme(s)
TDLU :	unité(s) canalo-lobulaire(s) terminale(s) du sein (angl. <i>terminal ductal-lobular unit(s)</i>)
tPS :	tige(s) de projection secondaire mammaire foetale

À mes parents affectueux
et à mes frère et sœur,
de chers complices

INTRODUCTION

La cellule myoépithéliale mammaire (CMEM) humaine occupe la base de l'épithélium du sein; elle présente des propriétés mixtes, épithéliales et musculaires. La CMEM ne synthétise pas les protéines du lait; elle faciliterait simplement l'éjection de ce dernier en se contractant. Elle ne donne que très rarement naissance à des carcinomes. L'ayant jugée accessoire, on l'a peu étudiée de sorte que plus d'un siècle après sa description, ses propriétés restent méconnues et controversées. Paradoxalement, la localisation par immunohistochimie (IHC) de la CMEM est une technique d'appoint fréquemment utilisée pour le diagnostic des lésions mammaires¹; depuis la fin des années 1980^{2,3}, l'alpha-actine du muscle lisse est le principal marqueur employé à cette fin. Ainsi, autour des foyers de carcinome, la disparition des CMEM « résiduelles » est considérée comme un indice probant de malignité. L'évaluation des CMEM a donc un impact très important sur le diagnostic posé et sur les suites du traitement.

En clinique, les cellules de carcinomes mammaires présentent rarement un phénotype basal/myoépithélial. Pourtant, un nombre grandissant d'études moléculaires proposent que des carcinomes du sein particulièrement agressifs tirent leur origine de CMEM^{4,5}, appuyant ainsi une minorité d'études d'IHC^{6,7,8,9,10,11,12,13}. Ceci remet en question la réputation « d'alliée de l'hôte » des CMEM face au cancer - soit le fondement de leur localisation à des fins de diagnostic en oncologie mammaire.

La suite de cette introduction replacera la CMEM humaine dans le cadre plus général de la glande mammaire normale et pathologique, soulignant certaines controverses liées à ce type cellulaire - et à l'organe qui l'abrite - avant de présenter notre hypothèse de recherche, les objectifs et le plan de nos travaux.

Revue de littérature

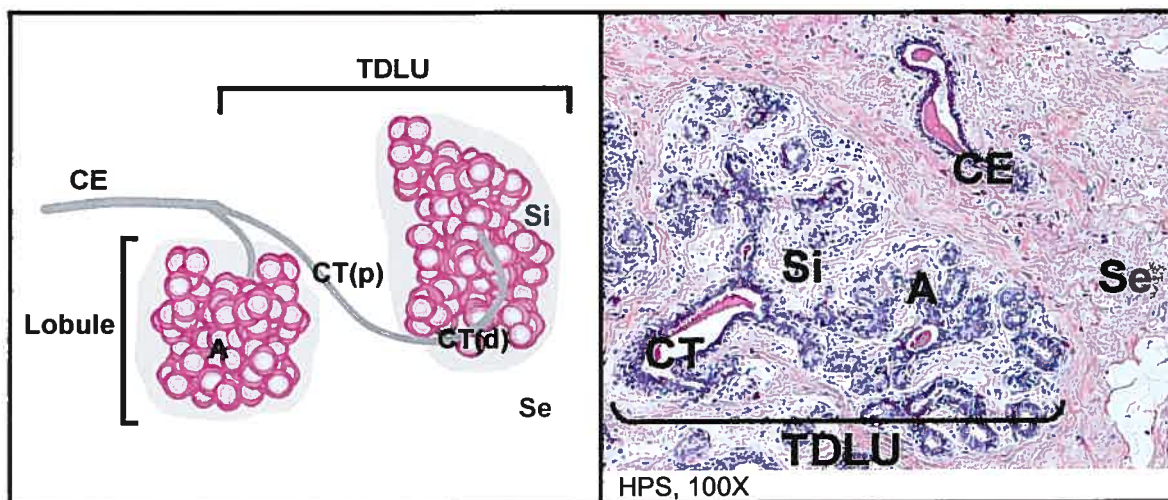
Tout comme les poils, les glandes mammaires sont des structures ectodermiques caractéristiques des Mammifères^{14,15,16}. Chez les marsupiaux, les régions lactifères contiennent des poils modifiés; chez les placentaires comme l'humain, l'identité de la structure ectodermique à l'origine des glandes mammaires ne fait pas encore l'unanimité^{17,18,19,20}. Les glandes mammaires présentent un développement maximal chez les femelles de chaque espèce; situées en position ventrale, de part et d'autre de la ligne médiane, ces glandes synthétisent des sécrétions nutritives (colostrum, lait) qui assurent la survie des nouveau-nés. Hormis ces traits communs, les glandes mammaires d'espèces distinctes présentent des différences majeures^{17,18} quant à : 1- leur nombre; 2- leur distribution dans l'axe rostro-caudal (cervicale, thoracique, abdominale et/ou inguinale); 3- la composition biochimique des sécrétions élaborées; 4- le niveau de développement glandulaire chez les femelles nullipares et les mâles; 5- la nature, l'incidence et la gravité des lésions qui les affectent. L'étude de ces variations^{21,22,23,24,25} suggère que les biais associés aux extrapolations inter-espèces pourraient être plus importants dans les études concernant les glandes mammaires que dans celles concernant d'autres organes phylogénétiquement moins récents (ex. l'oeil, un organe de présentation stable, commun à plus d'une classe de Vertébrés). Dans cette thèse, le terme « sein » désigne uniquement la glande mammaire humaine.

Le sein adulte normal au repos

Architecture sub-macroscopique

L'architecture sub-macroscopique du sein adulte au repos, très élaborée dans les trois dimensions, peut être difficile à apprécier sur coupes tissulaires^{26,27,28,29}; elle fait d'ailleurs l'objet de controverses, les résultats de certaines études étant reçus avec scepticisme (ex. description d'anastomoses entre territoires épithéliaux³⁰). Dans cette thèse, pour éviter toute confusion reliée à la nomenclature, nous utiliserons la terminologie de Wellings et coll.²⁶, illustrée à la Figure 1.

Figure 1 Terminologie décrivant l'architecture sub-macroscopique du sein



Légende : A, acini sécrétoires; CE, canal excréteur extra-lobulaire; CT, canal terminal; CT(d), portion distale de canal terminal; CT(p), portion proximale de canal terminal; Se, stroma extra-lobulaire; Si, stroma intra-lobulaire; TDLU, unité canalo-lobulaire terminale.

Les canaux excréteurs mammaires (CE) sont soutenus par un mésenchyme richement collagénisé et peu cellulaire appelé stroma «extra-lobulaire» (syn. stroma interlobulaire). Celui-ci contient d'importants amas graisseux; la fonction de ces amas reste incertaine^{31,32}. En surface, au pôle "proximal" de la glande, les CE s'ouvrent à la peau via les sinus lactifères du mamelon; en profondeur - soit au pôle «distal» ou «périphérique» de la glande, les CE se ramifient dichotomiquement à plusieurs reprises dans le stroma extra-lobulaire.

Les structures sécrétrices mammaires se retrouvent en périphérie de la glande. Chacune d'elle offre l'aspect d'une grappe dont les éléments constitutifs arrondis – les acini – déversent leurs sécrétions dans un canal unique qualifié de «terminal» (CT). Chaque regroupement d'acini est contenu dans un mésenchyme lâche, très cellulaire et richement vascularisé, appelé «stroma intra-lobulaire»; les portions proximale et distale de tout CT sont donc exposées à deux mésenchymes très différents. À cet égard, les fibroblastes intra- et extra-lobulaires représentent des types cellulaires distincts³³.

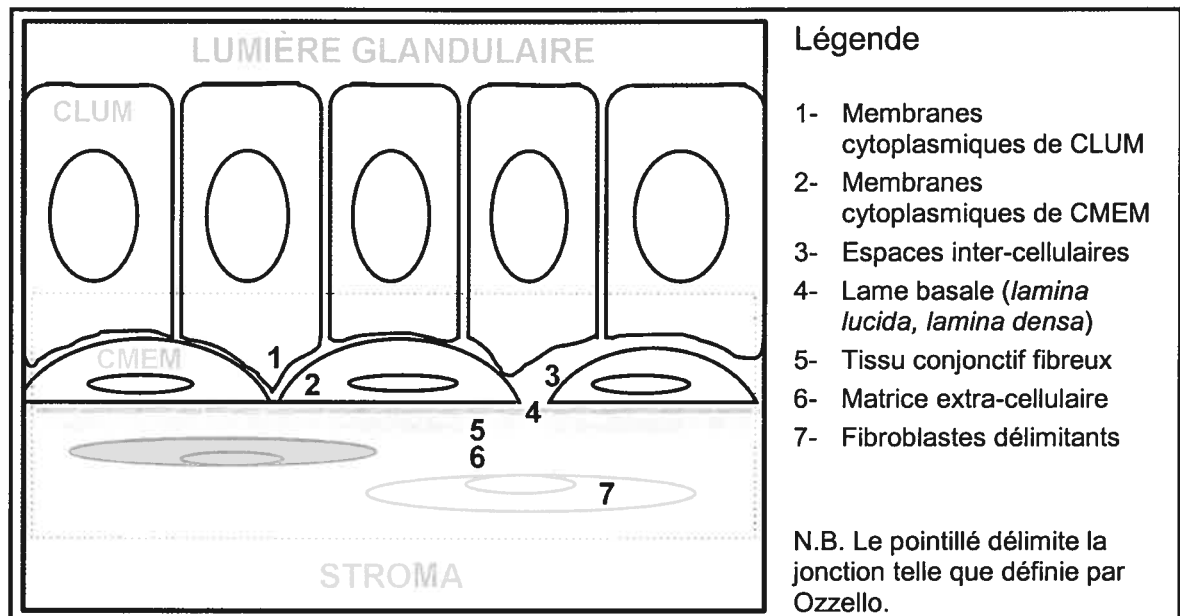
Le terme «lobule» désigne un groupe d'acini reliés et le stroma qui les entoure; le terme «unité canalo-lobulaire terminale» (TDLU) désigne quant à lui l'unité fonctionnelle

indépendante comprenant un lobule et son CT. Des TDLU reliés à des canaux principaux distincts peuvent être fonctionnellement autonomes bien qu'étroitement imbriqués.

La jonction épithélio-stromale mammaire

L'épithélium glandulaire mammaire est bi-stratifié. Les cellules lumorales mammaires (CLUM) qui bordent les lumières des CE et des TDLU forment le compartiment apical ou «luminal»; les CMEM qui les sous-tendent définissent le compartiment basal ou «myoépithélial». Cet épithélium contient aussi des progéniteurs dont la nature et la position restent incertains. L'épithélium est plus mince dans les CE que dans les TDLU; dans ces sous-divisions glandulaires, les CLUM et les CMEM présentent d'ailleurs des propriétés différentes, décrites plus loin. L'épithélium du sein repose sur une lame basale continue, soit une matrice extra-cellulaire (ECM) spécialisée à laquelle il adhère. Cette lame basale sépare l'épithélium du stroma extra-lobulaire au niveau des CE et du stroma intra-lobulaire au niveau des TDLU. La zone où l'épithélium du sein prend contact avec le stroma a été baptisée «jonction épithélio-stromale» par Ozzello³⁴.

Figure 2 Schéma de la jonction épithélio-stromale du sein au repos



Tel que schématisé à la Figure 2, cette unité anatomique fonctionnelle comprend : les membranes plasmiques des CLUM et des CMEM, les espaces intercellulaires, la lame basale mammaire (incluant la *lamina lucida* - vue comme un espace clair entre la lame basale et les membranes cellulaires basales - et la *lamina densa*), de même que le tissu conjonctif fibrillaire, les fibroblastes «délimitants» (terme proposé par Ozzello) et l'ECM

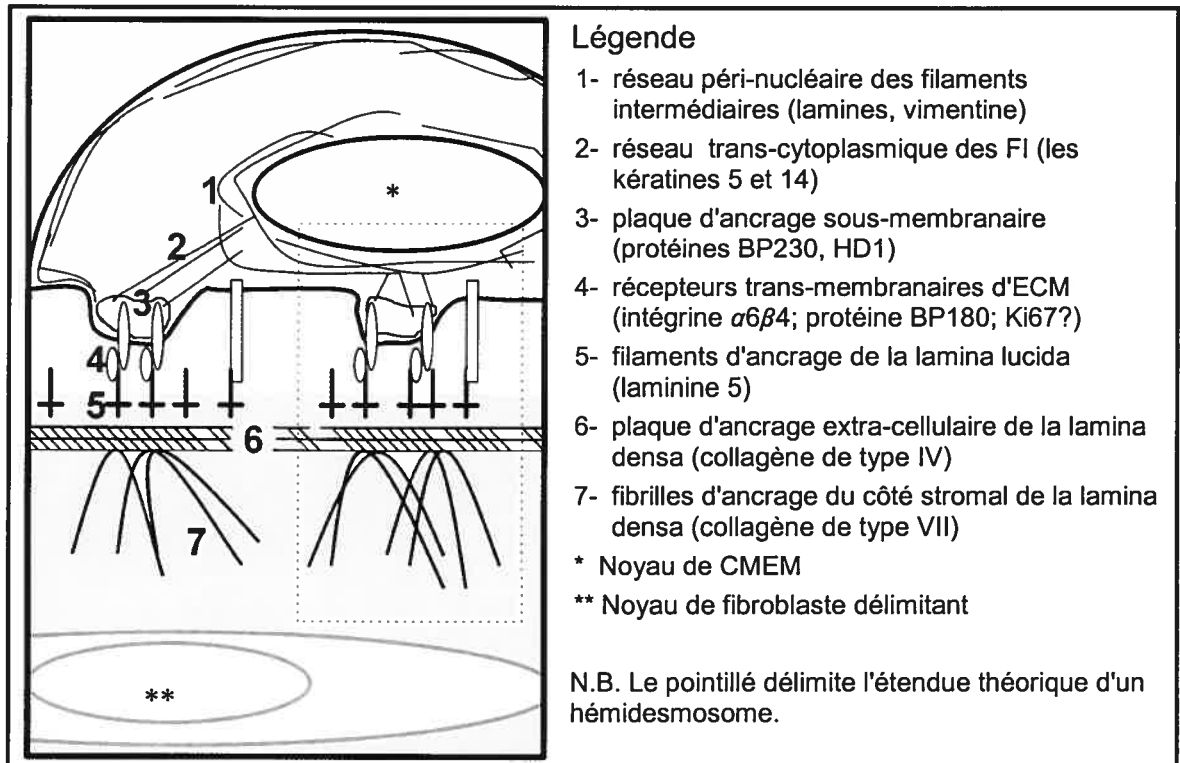
sous-jacents. La dynamique physiologique propre à cette unité demeure sous-documentée dans le sein. En revanche, des études réalisées sur les jonctions épithélio-stromales des glandes mammaires de rongeurs et de la peau humaine soulignent la complexité et l'importance des processus physiologique qui s'y déroulent. Le degré de détail du schéma de la Figure 2, inspiré de photographies prises en microscopie électronique (environ 1575X), est supérieur à celui possible en MO.

Lames basales, hémidesmosomes et interactions épithélio-stromales

Les lames basales sont des ECM macro-moléculairement très structurées³⁵ (le terme «lame basale» implique une polarisation tissulaire, contrairement au terme «lame limitante externe»). Elles ont longtemps été considérées comme des barrières mécaniques de perméabilité variable, élaborées plus ou moins conjointement par les tissus qu'elles «séparaient». L'étude de la peau, facile d'accès, a révélé que les lames basales sont bien plus que des frontières passives : outre la solidité qu'elles confèrent aux organes (point d'ancrage de tissus adjacents), elles donnent naissance et transmettent des informations physiologiquement cruciales pour les cellules - et les tissus - qui viennent à leur contact³⁶.

Pris dans leur ensemble, ces échanges d'informations sont désignés par le terme d'«interactions épithélio-stromales». Chez l'animal et l'humain, ces interactions sont critiques au cours du développement (contrôle de l'organogenèse), mais aussi à l'âge adulte (maintien de l'homéostasie tissulaire); beaucoup d'entre-elles s'établissent grâce aux hémidesmosomes de cellules épithéliales basales. Les hémidesmosomes sont des structures d'adhésion complexes^{36,37} qui permettent une intégration particulièrement efficace d'informations diverses issues de l'environnement local^{38,39,40,41,42}. La Figure 3 (page suivante) illustre leurs principales composantes. L'atteinte de telles structures conduit à des altérations pathologiques significatives (ex. lésions bulleuses en dermatologie⁴³).

Figure 3 Les composantes hémidesmosomales



N.B. Les constituants principaux de chaque composante figurent entre parenthèses (d'après la littérature citée dans le texte).

On étudie présentement les interactions épithélio-stromales du sein normal à l'aide de modèles tridimensionnels (xénogreffes chez la souris, cultures cellulaires à l'intérieur de gels). L'amélioration récente de ces techniques permet d'expliquer les succès mitigés obtenus auparavant par la culture de cellules sur gels conventionnels : la régulation de la physiologie cellulaire par l'ECM repose sur l'élaboration de signaux biochimiques, structuraux et mécaniques^{42,44,45,46,47,48}. L'architecture tissulaire semble déterminante vis-à-vis de la survie des cellules épithéliales du sein, par exemple. Ceci contribuerait notamment à expliquer le phénomène d'anoïkis^{49,50} (mort de cellules épithéliales privées de substrat d'attache), mais aussi le phénomène inverse, soit la capacité des cellules souches épithéliales d'échapper à l'apoptose sous certaines conditions^{51,52,53,54}.

L'état (complexe) de repos du sein

Le sein a beaucoup été étudié en relation avec la grossesse, l'allaitement et le développement d'anomalies mammaires, c'est-à-dire trois situations où le tissu glandulaire subit des modifications importantes. Les autres états fonctionnels du sein (ex. foetal, adulte

normal au repos, atrophique) sont peu étudiés. Sujet à de multiples influences régulatrices systémiques et locales, le sein à l'état «normal de repos» présente une hétérogénéité tissulaire importante. Son aspect varie de façon importante d'une patiente à l'autre malgré la stratification des cohortes pour l'âge, l'état menstruel, l'histoire reproductive et l'histoire médicale - et ce, chez une même patiente. Ces variations inter-patientes, intra-patiente et souvent même intra-TDLU ont longtemps été considérées comme artéfactuelles. Le «cycle mensuel mammaire», découvert tardivement, serait en partie responsable de l'hétérogénéité du parenchyme mammaire au repos.

Le cycle mensuel du sein

Décrit seulement au début des années 1970, le cycle mensuel mammaire rappelle vaguement le cycle mensuel ovarien/utérin. Les altérations associées au cycle mammaire s'observent essentiellement dans les TDLU; elles ont plus souvent fait l'objet d'études par MO^{55,56,57,58,59} et de cinétique^{55,60,61,62,63,64} que d'études ultrastructurales⁶⁵. Faute de mieux, le cycle menstruel est utilisé comme point de référence dans cette littérature. Le Tableau I et la Figure 4 des pages suivantes résument certaines observations propres aux différentes phases du cycle mammaire.

De concert avec l'activité sécrétoire, la vacuolisation de cellules épithéliales basales est un trait distinctif des phases lutéale tardive et menstruelle. La nature de ces cellules claires basales – CMEM ou cellules souches mammaires? – demeure incertaine. Les phases lutéale tardive et menstruelle de ce cycle présentent des pics d'activité mitotique et apoptotique apparemment espacés de trois jours (ex. jours 25 et 28 d'un cycle de 28 jours, respectivement; en rétrospective⁵⁹, une seule publication⁵⁶ rapporte un pic mitotique en phase folliculaire). Le pic d'activité mitotique révèle l'existence de poussées de croissance cycliques de l'épithélium des TDLU du sein adulte au repos^{66,67,68}. Chez l'humain, les altérations du stroma intra-lobulaire notées au cours du cycle mammaire seraient le reflet de poussées de croissance stromales concomitantes⁶⁶. Le fait que ces activités de croissance soient habituellement confinées aux TDLU de la femme adulte contribue sans doute à expliquer le constat de Wellings selon lequel la majorité des lésions prolifératives du sein ont pour origine les TDLU^{26,69}.

Tableau I Revue des principales altérations morphologiques des unités canalo-lobulaires terminales associées aux différentes phases du cycle mensuel mammaire humain*

	Phase folliculaire précoce (Jours 3-7)	Phase folliculaire tardive (Jours 8-14)	Phase lutéale précoce (Jours 15-20)	Phase lutéale tardive (Jours 21-27)	Phase menstruelle (Jours 28-2)
Épithélium (TDLU)					
Activité sécrétoire	Non	Non	Peu marquée	Marquée	Extensive
Lumières	Peu définies	Bien définies	Bien définies	Bien définies	Bien définies
Macrophages luminaux	Abondants	Fréquents	Peu fréquents	Peu fréquents	Peu fréquents
Distinction CLUM/CMEM	Difficile	Peu facile	Facile	Facile	Facile
Vacuolisation de cellules basales**	Fréquente; variable	Rare; minimale	Rare; minimale	Fréquente; importante	Généralisée; extensive
Mitoses	Occasionnelles	Rares	Occasionnelles	Très nombreuses	Nombreuses
Corps apoptotiques	Occasionnels	Rares	Rares	Nombreux	Très nombreux
Lame basale glandulaire	Irrégulière et mince	Uniforme et proéminente	Uniforme et amincie	Variable et très atténuée	Variable et mince
Stroma intra-lobulaire					
Quantité	Minimale	Modérée	Modérée	Importante	Modérée
Aspect général	Dense	Variable-dense	Variable-lâche	Lâche	Lâche
Oedème	Variable	Faible	Variable	Très important	Important
Métachromasie***	Minimale	Minimale	Minimale	Modérée	Très importante
Infiltrat (cellules de défense)	Important	Modéré	Modéré	Modéré	Très important

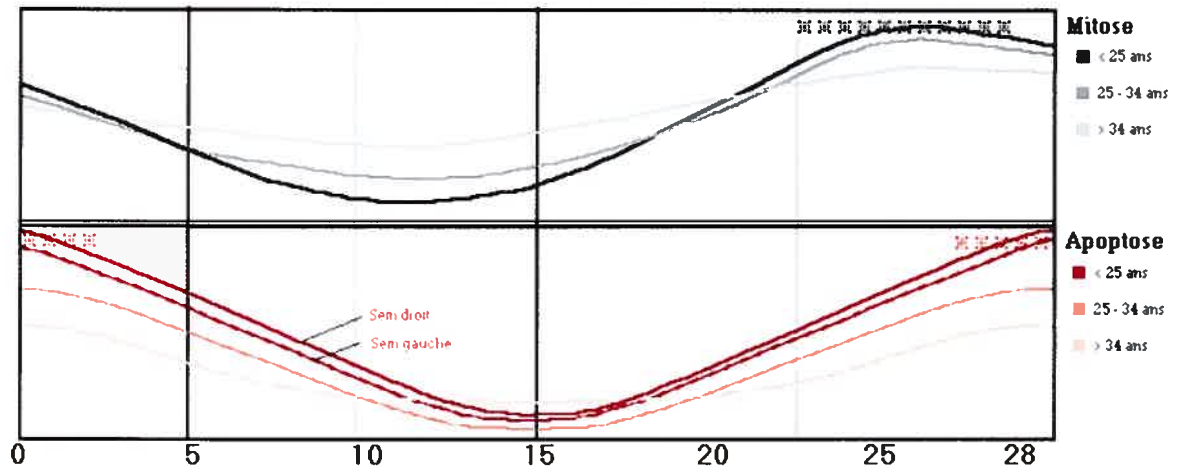
* D'après la littérature^{55,65,56,57,58,59,70}.

** D'un point de vue quantitatif et qualitatif, respectivement

*** Prise d'une couleur différente de celle du colorant. En présence de colorants basiques bleus, les granules de mastocytes adoptent une coloration pourpre; la dégranulation de mastocytes dans le stroma intra-lobulaire pourrait expliquer cette métachromasie.

Les études par IHC du cycle mammaire, auparavant rares, se sont multipliées suite à la description de variations cycliques de l'expression de bcl-2 dans l'endomètre et dans l'épithélium mammaire en 1994^{71,72}. La plupart ont ciblé: des produits d'oncogènes, des marqueurs d'apoptose/de prolifération cellulaire, ainsi que des récepteurs d'hormones stéroïdiennes et leurs co-activateurs^{73,74,75,76,77,78,79,80,81,82,83}. Les résultats de ces études sont souvent contradictoires (présence^{74,75,84} *versus* absence^{77,84} de variations dans le sein normal; présence⁸⁴ *versus* absence⁷⁴ de variations dans le sein pathologique), comme ceux des analyses de l'impact du moment du cycle menstruel où une patiente est opérée sur son risque de présenter des récurrences (impact^{77,85,86} *versus* absence d'impact^{74,87,88,89,90}).

Figure 4 Variations des activités mitotique et apoptotique dans l'épithélium pendant le cycle mensuel mammaire en fonction de l'âge et de la latéralité*



* D'après la revue de littérature de Feuerhake et coll. (2003)⁸³. Les «X» indiquent les intervalles de temps au cours desquels ces activités sont maximales.

Actuellement, le cycle mensuel mammaire demeure peu connu, possiblement parce que : 1- ce cycle n'est pas parfaitement synchronisé avec le cycle utérin; 2- les modifications histologiques qu'il entraîne sont irrégulières et parfois subtiles; 3- la signification biologique de la plupart des altérations observées reste inconnue; 4- ses implications demeurent controversées en clinique.

Ces insaisissables progéniteurs du sein adulte

La persistance de progéniteurs multipotents dans l'épithélium du sein adulte a longtemps été considérée avec scepticisme; toutefois, depuis la caractérisation de cellules souches adultes dans plusieurs organes, on en admet de plus en plus l'existence. Plusieurs avenues de recherche suggéraient plus ou moins clairement leur existence depuis quelques années, notamment celles relatives : 1- aux poussées de croissance épithéliale extensives péri-gestationnelles; 2- aux poussées de croissance reliées au cycle mammaire, modestes mais quantifiables; 3- aux nombreuses voies de différenciation empruntées par les cellules prolifératives de formes communes ou rares de carcinome du sein (métaplasie squameuse, apocrine, myoïde, adipeuse, osseuse, cartilagineuse, mélanocytaire, myéloïde^{20,91,92,93,94,95}); et plus récemment 4- au caractère monoclonal de larges plages épithéliales dans le sein adulte normal au repos^{96,97}. Par le passé, ces progéniteurs ont été provisoirement et tour à tour associés aux compartiments apical, sub-apical, supra-basal et basal de l'épithélium mammaire, tantôt décrits comme de grandes cellules épithéliales claires et/ou vacuolées⁹⁸,

tantôt comme de petites cellules épithéliales d'aspect monotone⁹⁹. Curieusement, malgré les efforts déployés pour les identifier formellement, leur identité et leur emplacement exacts demeurent encore incertains : position dans l'épithélium, nombre, attributs distinctifs, potentiel de prolifération, potentiel de différenciation et relations exactes entre les CLUM et les CMEM – autant d'inconnues qui alimentent encore de vifs et nombreux débats (résumés par Smalley et Ashworth en novembre 2003¹⁰⁰). L'altération plus ou moins précoce de ces progéniteurs (ex. mutation affectant le niveau d'expression d'un gène suppresseur de tumeur/oncogène, d'un gène *gatekeeper/caretaker*) pourrait expliquer le caractère souvent multi-focal et/ou multi-centrique des carcinomes du sein^{96,97,101,102,103,104,105}.

Des travaux récents concernant la peau et ses annexes pourraient permettre d'identifier, sous peu, les progéniteurs demeurés jusqu'ici insaisissables dans le sein adulte¹⁰⁰. Pendant plusieurs années, les efforts de caractérisation des progéniteurs pluripotents de la peau et des poils se sont tournés vers l'assise basale de la peau et la matrice pileuse (un groupe de cellules prolifératives, accolées à la papille dermique, capables de générer la médulla, le cortex, la cuticule, la gaine interne et la gaine externe de chaque poil). Récemment, on a découvert des progéniteurs multipotents de la peau adulte dans les poils, plus précisément dans un renflement latéral de leur gaine externe¹⁰⁶. Ces cellules font preuve d'une plasticité remarquable, servant aussi bien de précurseurs de la peau que des poils (voir l'article de revue de Fuchs et Raghavan¹⁰⁷). Les concepts et mécanismes moléculaires dévoilés par l'analyse de cellules pluripotentes et multipotentes de la peau, très accessibles, constituent des pistes de recherche intéressantes pour étudier la physiologie d'autres organes épithéliaux; ceci semblerait d'autant plus vrai pour le sein, vue l'origine évolutionnaire qu'on lui attribue (annexes de la peau).

Avant de poursuivre, soulignons que trois facteurs compliquent la réalisation de méta-analyses concernant l'état de repos du sein normal: 1- la multiplication intra- et inter-études des techniques de préparation et d'analyse des échantillons de sein, qui rend difficile ou empêche la comparaison de données (impossibilité de déterminer si les variations sont authentiques ou artéfactuelles); 2- le manque d'uniformité de la nomenclature utilisée pour décrire les portions de l'arbre glandulaire, ses populations cellulaires, les phases du cycle mammaire; 3- le doute entourant la normalité d'échantillons de «sein normal» analysés

dans plusieurs travaux publiés. En effet, bien que plusieurs études aient démontré que des tissus mammaires «d'apparence saine» peuvent présenter des altérations significatives même lorsque prélevés à une distance jugée «sûre» de lésions bénignes ou malignes (ex. prélèvements à quelques millimètres ou centimètres de la lésion, ou dans un quadrant non impliqué par celle-ci)^{34,108,109,110,111,112,113,114}, les propriétés de tissus mammaires péri-lésionnels sont encore souvent présentées comme celles du parenchyme du sein adulte normal au repos. Ces trois facteurs contribuent à déformer notre perception de la «normalité du sein adulte au repos» et donc du point de référence de beaucoup de recherches en sénologie.

La cellule myoépithéliale du sein adulte au repos

Les propriétés de la CMEM du sein adulte normal sont résumées (parfois mises en opposition avec celles de la CLUM) aux Tableaux II à V des pages suivantes.

Tableau II Attributs morphologiques myoépithéliaux et luminaux dans le sein adulte*

	CMEM	CLUM
Apparence	À la fois musculaire et épithéliale	Typiquement épithéliale
Taille	Petite (CE); importante (TDLU)	Modérée (CE); importante (TDLU)
Forme	Aplatie et fusiforme (CE); étoilée ou arrondie (TDLU)	Cubique/cylindrique (CE); cylindrique/polyhédrique (TDLU)
Orientation	Parallèle à la lame basale (CE); très variable (TDLU)	Perpendiculaire à la lame basale (CE, TDLU)
Membranes	Membranes apico-latérales riches en desmosomes; <u>incertitude</u> : cils se projetant vers la lumière? Membrane basale très riche en hémidesmosomes; <u>controverse</u> : exclusivité des CMEM vis-à-vis de contacts avec la lame basale?; <u>controverse</u> : hémidesmosomes spécifiques ou non aux CMEM?; prolongements de membrane basale ramifiés fréquents, normalement entourés de lame basale, parfois très développés (association avec repliements et duplications de la lame basale)	Membrane apicale plus ou moins lisse; vésicules de sécrétion (TDLU) Membranes baso-latérales riches en desmosomes
Cytoplasme	Cytoplasme infra-nucléaire dense en MO, d'aspect filamenteux, présentant parfois des vésicules Cytoplasme supra-nucléaire peu dense, granulaire, dépourvu de vésicules Cytoplasme parfois distendu par une vacuole unique Organelles très peu nombreuses, rudimentaires	Cytoplasme uniformément clair Organelles peu nombreuses, inégalement développées
Noyau	Petit, irrégulier (indentations), très dense; amas importants d'hétérochromatine - nucléole rarement visible	Moyen, ovale, peu dense; nucléole évident

* Non exhaustif. D'après, notamment^{34,56,65,98,99,115,116,117,118,119,120,121,122,28}.

Tableau III Propriétés antigéniques myoépithéliales et lumorales distinctives* dans le sein adulte

	CMEM	CLUM
Membranes plasmiques	CD10	Mucine 1/EMA (angl. <i>epithelial membrane antigen</i>)
Cytoplasme	α -actine du muscle lisse Chaînes lourdes de myosine Calponine Kératines basales 5, 10, 14 Vimentine Protéine S100	Kératines apicales 8, 18, 19
Noyau	p63	Récepteurs d'oestrogènes α Récepteurs de progestérone

* Base des distinctions CLUM/CMEM faites en clinique. D'après^{1,95,123,124}.

Tableau IV Profil antigénique* myoépithélial putatif dans le sein adulte

CMEM			
Membranes plasmiques	$\alpha 6\beta 1$	CD44v6	Récepteur du facteur de croissance épidermique
	$\alpha 6\beta 4$	Récepteur de 67kD de la laminine	Récepteur de l'oxytocine
	Sous-unité d'intégrine $\beta 4$		Récepteur de l'activine de type II
	$\alpha 3\beta 1$	P-cadhérine	
	CD10	Connexine 43	
Cytoplasme	α -actine du muscle lisse	Cortactine	Protéine gliale fibrillaire acide
	Actine totale	Gelsoline	
	Chaînes lourdes de myosine	Kératines basales 1, 5, 10, 14, 17	Protéine S100
	Calponine	Vimentine	Protéine S100 β
			Protéine S100A4
Noyau	p63		
	Maspine		

* Non exhaustif. D'après, notamment^{1,95,123,125,126,127,128,129,130,131,132,133,134,135,136,137,138,139,140,141,142,143,144}.

Tableau V Propriétés myoépithéliales et lumorales additionnelles dans le sein adulte

	CMEM	CLUM
Activité mitotique	Faible, absente	Cycliquement élevée, sinon faible
Activité apoptotique	Cycliquement importante, sinon faible	Cycliquement élevée, sinon faible
Activité de phosphatase alcaline endogène	Oui	Non
Fonctions admises	Facilitation de l'éjection des sécrétions lactées (contraction dans le cadre d'un réflexe neuro-endocrinien déclenché par la stimulation du mamelon par le nourrisson); <u>controverses</u> : contraction effective malgré l'effacement en période de lactation, sans hausse d'expression de récepteurs d'oxytocine? Synthèse/remodelage de la lame basale	Synthèse de protéines de sécrétions lactées (de lait, en période de gestation et d'allaitement)

D'après, notamment^{55,60,61,62,63,64,95,145,146}. D'après^{14,16,95,147,148}.

Par ses complexes d'adhésion nombreux et variés, la CMEM contribue à assurer la solidité mécanique du parenchyme mammaire. Au moment de l'allaitement, elle est la cible d'un arc-réflexe neuro-endocrinien qui en provoque la contraction, facilitant l'éjection du lait. La séquence proposée est la suivante :

succion du mamelon ou autre stimulus > stimulation nerveuse des aires hypothalamiques > hausse de sécrétion d'oxytocine par l'hypophyse > fixation de l'oxytocine plasmatique aux récepteurs de l'oxytocine de la CMEM > contraction de la CMEM.

L'importance de la contribution myoépithéliale à l'éjection du lait ne fait pas l'unanimité. Dans de nombreux ouvrages de référence, cette contribution est présentée comme nécessaire^{14,149}; en effet: 1- aucune couche musculaire n'est visible autour des structures épithéliales mammaires qui permettrait d'acheminer les sécrétions depuis les TDLU jusqu'aux sinus lactifères; 2- la force de succion développée au mamelon par le nourrisson apparaît insuffisante pour vaincre la résistance engendrée dans le long réseau de canaux mammaires finement ramifiés. D'autres considèrent cet arc-réflexe comme un vestige évolutif, suggérant plutôt que la hausse graduelle des niveaux plasmatiques d'oxytocine favorise simplement la différenciation myoépithéliale^{148,150,151}. Plusieurs notent que si la CMEM a pour rôle premier de favoriser l'expulsion du lait, il est curieux : 1- que les CMEM renferment fréquemment moins de myofilaments dans les CE que dans les TDLU^{116,152,153}; 2- que les CMEM des TDLU deviennent imperceptibles pendant la gestation et la période d'allaitement, c'est-à-dire au moment où elles seraient théoriquement le plus sollicitées^{16,20,154}; 3- que les niveaux d'expression des récepteurs d'oxytocine des CMEM varient peu pendant la gestation et l'allaitement¹⁴⁸; et 4- que ces récepteurs semblent relativement peu abondants à la surface de CMEM bien différenciées pendant la lactation comme à l'état de repos¹⁴⁸ (sauf celles des CT). Malgré tout, cette fonction myoépithéliale est généralement acceptée et souvent invoquée.

En revanche, on oublie souvent de mentionner la capacité de synthèse et de remodelage de lame basale de la CMEM : synthèse et accumulation de collagènes et de laminines, production de maspine et de protéinases, etc. Pourtant, chez d'autres espèces, cette capacité a suscité un vif intérêt : elle suggère que les CMEM modulent les interactions épithélio-stromales mammaires^{155,156,157}, participant ainsi à la régulation du développement mammaire *in utero* et de l'équilibre homéostatique dans la glande mature. Quelques articles suggèrent que l'importance physiologique de la CMEM humaine est grandement sous-estimée dans le sein normal et pathologique^{158,159,160}.

Le sein foetal

Pour des considérations d'ordre éthique évidentes, très peu d'études récentes décrivent le développement mammaire humain *in utero*. Avant l'adoption généralisée de codes d'éthique destinés à contrôler plus adéquatement l'expérimentation sur des tissus foetaux humains, quelques études ont documenté les attributs morphologiques

macroscopiques, microscopiques et ultrastructuraux du sein foetal. Deux publications majeures datant de cette époque demeurent toujours d'actualité. La première, de Hughes (1949)¹⁷, fournit une description macroscopique et microscopique minutieuse du sein foetal basée sur une cohorte impressionnante : 70 spécimens représentatifs des trois trimestres de la gestation. La seconde publication, de Tobon et Salazar (1974)¹¹⁷, comprend une description microscopique et ultrastructurale minutieuse de sept spécimens âgés de 13 à 40 semaines de gestation. Les paragraphes suivants résument l'état actuel des connaissances sur le sein foetal (selon ces publications et des articles complémentaires^{67,118,161,162,163}).

Morphogenèse *in utero*

D'après la littérature, des renflements ectodermiques initialement dorso-latéraux génèrent des lignes médio-latérales ventrales, les «lignes de lait», avant la 6^e semaine du développement. Ces dernières sont peu larges (2 à 4 cellules) et reposent sur un stroma richement vascularisé. Vers la 6^e semaine, ces lignes mesurent de 4 à 6 cellules de largeur et reposent sur un mésenchyme plus condensé. Bientôt, la portion thoracique de chaque ligne s'épaissit alors que les autres portions s'atténuent; la persistance anormale de la ligne serait à l'origine des mamelons et glandes mammaires sur-numéraires ectopiques (retrouvés relativement fréquemment, surtout en position médio-latérale ventrale^{14,164}). Vers la 8^e semaine, le tissu mammaire se compose d'un petit regroupement de cellules ectodermiques délimité par une lame basale et de cellules mésenchymateuses étroitement associées à celle-ci.

De la 8^e à la 12^e semaine, cet ensemble s'enfonce et croît dans le derme immature; le mésenchyme de soutien se vascularise rapidement. Entre la 12^e et la 16^e semaine, un primordium arrondi occupe l'emplacement futur du sein; dans la littérature, il est tantôt qualifié de primordium mamelonaire^{17,117,118}, tantôt de primordium mammaire¹⁶⁵. La région axillaire de certains foetus présente des structures similaires, quoique beaucoup plus petites («corps de Hugo Schmidt»¹⁷); ces dernières sont probablement à l'origine du tissu mammaire retrouvé, chez certains adultes, au-delà des limites habituelles de la «queue axillaire» du sein. Entre la 16^e et la 28^e semaine de gestation – on note des discordances et des lacunes importantes dans la littérature - cette structure arrondie présente des irrégularités basales qui donnent éventuellement naissance à des excroissances solides. Les

ébauches des poils, des glandes sudoripares et des glandes sébacées se forment à ce moment.

Les excroissances mammaires foetales traversent plusieurs couches distinctes de mésenchyme avant d'atteindre celle où leurs extrémités se ramifient; il y a peu de publications mentionnant ou illustrant la période comprise entre l'émergence de ces excroissances du primordium mammaire/mamelonaire et le moment où elles se ramifient. La formation des lumières glandulaires débute pendant le troisième trimestre du développement; le moment précis et l'endroit où apparaissent les lacunes initiales restent controversés, tout comme les mécanismes de leur formation. Certains observent les premières lumières dans les canaux principaux (suggérant une ouverture proximo-distale), d'autres dans les renflements terminaux des canaux en croissance (suggérant, à l'inverse, une ouverture rétrograde). Selon les études disponibles, l'ouverture des lumières mammaires résulterait d'une desquamation¹⁶⁶(cité par¹⁶²) et/ou d'une lyse cellulaire/apoptose¹⁶⁷(cité par¹⁶¹). La plupart des auteurs s'entendent au moins pour dire que ce processus de canalisation prend fin au 8^e mois de la grossesse.

Soumis à l'influence des hormones maternelles, le sein foetal (masculin ou féminin) présente une activité sécrétoire au cours du troisième trimestre de gestation. L'importance de cette activité est très variable d'un individu à l'autre, ce qui explique que des écoulements mammaires ne soient présents que chez certains nouveau-nés (angl. *witches' milk*). En général, ce phénomène s'estompe dans les jours suivant la naissance.

À la naissance, les glandes mammaires de foetus distincts (masculins ou féminins) présentent des niveaux de développement très inégaux; en période périnatale, les développements morphologique et physiologique de la glande sont typiquement déphasés^{168,169,170}. Contrairement à la glande mammaire de plusieurs rongeurs, le sein ne présente pas de dimorphisme sexuel *in utero*. En effet, les souris et les rats mâles sont souvent dépourvus de tissu mammaire, y compris de mamelons (agénésie du primordium mammaire, un phénomène précoce et androgènes-dépendant initié par le mésenchyme associé^{18,171}).

L'IHC a pris son essor à une époque où les possibilités ouvertes par la science nécessitaient déjà de réglementer plus strictement l'expérimentation sur des tissus foetaux humains. Le sein foetal a donc fait l'objet d'un nombre très limité d'études immunohistochimiques, ses attributs antigéniques demeurant méconnus.

Les précurseurs myoépithéliaux du sein foetal

L'épithélium du sein foetal renferme des CLUM et des CMEM immatures clairement identifiables à partir du deuxième trimestre gestationnel¹¹⁷. Les caractéristiques morphologiques distinctives des précurseurs myoépithéliaux incluent : une position périphérique, une taille inférieure et une densité supérieures à celles des précurseurs luminaux. Les précurseurs myoépithéliaux se démarqueraient aussi des précurseurs luminaux par leur forme et leur orientation «déterminées», ces attributs différant cependant selon la source consultée (ex. cellules fusiformes au grand axe parallèle à la lame basale *versus* cellules cylindriques au grand axe perpendiculaire à la lame basale). Le Tableau VI présente les propriétés antigéniques des précurseurs foetaux de CMEM telles que décrites avant la publication de nos résultats¹⁷².

Tableau VI Profil antigénique de précurseurs foetaux de la cellule myoépithéliale du sein selon la littérature

	2 ^e trimestre gestationnel	3 ^e trimestre gestationnel
Membranes plasmiques	Sous-unité d'intégrine $\alpha 2$ + ¹⁷³	CD10 - ¹⁷⁴
	Sous-unité d'intégrine $\alpha 6$ + ¹⁷³	Thrombospondine + ¹⁷⁵
	Sous-unité d'intégrine $\beta 1$ + ¹⁷³	
	Sous-unité d'intégrine $\beta 4$ + ¹⁷³	
	CD10 - ¹⁷⁴	
	Thrombospondine + ¹⁷⁵	
Cytoplasme	α -actine du muscle lisse - ¹⁶⁹	α -actine du muscle lisse + ^{163,176}
	Kératine 14 - ¹⁶⁹	Kératine 14 + ¹⁶³
	Vimentine - ¹⁶⁹	neu + (cytopl.) ¹⁷⁷
Noyau	bcl-2 + ¹⁷⁸	bcl-2 + ^{176,178}

Légende : + , positif ; - , négatif.

N.B. Gould et coll.¹⁷⁹ décrivent des précurseurs positifs pour les sous-unités d'intégrine $\alpha 6$ et $\beta 1$ pour quatre spécimens foetaux d'âges non précisés. Osin et coll.¹⁷⁰ rapportent que de 10 à 22% des cellules épithéliales mammaires sont positives pour le Ki67 au deuxième trimestre de gestation, mais ils ne précisent pas la position des cellules réactives et ne les illustrent pas.

Le sein pathologique

Cette section renferme certaines notions de base en pathologie mammaire; elle revoit, à l'intention de ceux qui seraient moins familiers avec le domaine, quelques problèmes auxquels les pathologistes se butent depuis des décennies^{180,181,182 20,93,95}. L'état actuel des connaissances sur les propriétés des CMEM résiduelles et pathologiques fait ensuite l'objet d'un bref résumé.

Les lésions non néoplasiques du sein comportent souvent une prolifération cellulaire double (comportant des CLUM et des CMEM) ou principalement myoépithéliale. Au contraire, dans la majorité des carcinomes (*in situ* et invasifs), les cellules altérées affichent des attributs morphologiques et antigéniques suggérant une origine luminale. Les zones de prolifération *in situ* sont bordées par des CMEM dites «résiduelles» qui disparaissent autour des foyers d'invasion.

Chez l'humain, les néoplasmes mammaires bénins les plus fréquents sont les fibroadénomes. Ils comprennent une composante stromale importante, associée à des éléments glandulaires d'aspect normal ou refoulé (présentations dites «péri-canaliculaire» et «intra-canaliculaire»; les raisons biologiques de cette différence ne sont pas claires). Des études d'IHC indiquent que les fibroadénomes dérivent habituellement du stroma intra-lobulaire^{33,183,184}. En comparaison, les néoplasmes mammaires malins les plus fréquents dérivent de l'épithélium mammaire. De façon très sommaire, les carcinomes *in situ* (non invasifs) sont classifiés en variantes canalaire ou lobulaires; les carcinomes invasifs sont classifiés comme canalaire spécifiques (plusieurs types), lobulaires, canalo-lobulaires, ou canalaire de type non spécifié. Jusqu'à 80% des cancers mammaires appartiennent à cette dernière catégorie¹⁸².

Les carcinomes «myoépithéliaux» sont, quant à eux, rarissimes (moins de 0,5% des diagnostics posés). Les adénomyoépithéliomes présentent une double différenciation (CLUM et CMEM pathologiques) et sont plus fréquents que les myoépithéliomes «purs» (ex. forme maligne : neuf cas publiés^{185,186,187,188,189,190,191,192,193} avant le nôtre¹⁹⁴). Dans plus de 50% des cas répertoriés de myoépithéliome malin du sein^{154,195}, on observe : des récurrences multiples, une résistance aux traitements, une survie écourtée.

De bénignité à malignité : une progression?

Les biopsies mammaires examinées en clinique, y compris celles de seins normaux, contiennent souvent des foyers plus ou moins étendus d'altérations non néoplasiques. Typiquement regroupées sous le vocable «changements fibrokystiques», ces altérations incluent des kystes généralement accompagnés de fibrose stromale, diverses formes d'hyperplasie épithéliale et de l'adénose (augmentation du nombre de structures épithéliales retrouvées par TDLU). Une forme d'adénose associée à une fibrose stromale importante, l'adénose «sclérosante», peut parfois ressembler aux carcinomes en MO; ses nombreuses CMEM permettent cependant de l'en distinguer par IHC, évitant ainsi un diagnostic erroné lourd de conséquences (ex. traitements adjuvants et chirurgie mutilante non justifiés).

Les liens susceptibles de relier diverses lésions non néoplasiques entre elles et leur potentiel «pré-néoplasique» respectif, soit la possibilité qu'elles prédisposent au développement de carcinomes, ont fait couler beaucoup d'encre^{20,26,93,95,180,181,182,196,197,198}. La publication de résultats contradictoires explique pourquoi les avis demeurent encore partagés sur ces questions. Deux courants de pensée émergent de la littérature : dans le premier cas, la plupart des lésions non néoplasiques du sein ferait partie d'un continuum d'altérations menant éventuellement à l'apparition de carcinomes; la progression proposée est la suivante :

atteintes de la cellule épithéliale normale > hyperplasie sans atypie > hyperplasie atypique > carcinome *in situ* > carcinome invasif > carcinome invasif avec métastases.

Dans le second cas, on refuse d'attribuer systématiquement un statut pré-néoplasique à ces entités et on les considère plutôt comme des facteurs de risque. À l'heure actuelle, l'étiologie de ces entités non néoplasiques demeurant incertaine et les arguments de chaque camp nombreux, il n'a pas été possible de récuser formellement l'une ou l'autre de ces propositions (ex. tel que revu par Rosen¹⁹⁹). Les deux camps s'accordent pour attribuer une importance particulière aux foyers d'hyperplasie épithéliale dite «atypique».

Outils complémentaires de diagnostic des lésions mammaires

En clinique, le caractère discontinu de la lame basale discontinue et la disparition des CMEM résiduelles autour des cellules néoplasiques sont considérées comme des

indices sérieux d'invasion. De même, une lame basale continue et de nombreuses CMEM permettent de reconnaître la bénignité de certaines lésions qui ressemblent à des cancers, évitant ainsi un sur-diagnostic fâcheux. Depuis vingt ans, la recherche des lames basales et des CMEM résiduelles par IHC exerce donc un impact important sur la vie des femmes atteintes de cancer du sein (influence sur le diagnostic posé, donc sur la nature et la sévérité des traitements préconisés).

Localisation de la lame basale

On met généralement en évidence les lames basales par IHC à l'aide d'anticorps dirigés contre le collagène de type IV (CollIV) et/ou des laminines. Cette pratique repose largement sur la notion voulant que ces ECM spécialisées s'opposent à l'invasion en tant que barrières physiques, leur intégrité (continuité) étant perçue comme un signe favorable. Le dynamisme nouvellement reconnu des lames basales et l'existence de discontinuités dans ces structures à l'état normal²⁰⁰ laissent donc planer un doute sur le bien-fondé de cette pratique.

Localisation de cellules myoépithéliales résiduelles

On considère les protéines du muscle lisse comme des cibles particulièrement fiables pour localiser les CMEM résiduelles; une isoforme de l'actine du muscle lisse, l' α SMA, est utilisée à cette fin depuis deux décennies^{2,3} malgré un manque de spécificité reconnu (ex. vaisseaux sanguins et myofibroblastes marqués mépris pour des CMEM résiduelles). Des marqueurs de différenciation musculaire possiblement plus spécifiques¹ ont été proposés (ex. calponine), mais ils sont encore peu utilisés en pratique. Le contenu des CMEM en filaments intermédiaires (FI) étant perçu comme moins stable, la vimentine (VIM) et les kératines basales sont ciblées à titre complémentaire (emploi de *cocktails* d'anti-kératines d'efficacité contestée^{194,201}).

Les résultats d'études immunohistochimiques et moléculaires par l'équipe de Barsky^{202,203,204,205,206,207} et de chercheurs indépendants²⁰⁸ sont récemment venus étayer la réputation «d'alliée de l'hôte» de la CMEM humaine. Ces auteurs ont proposé plusieurs arguments en faveur du rôle de défenseur naturel de la CMEM : 1- sa position stratégique, la CMEM séparant la CLUM, source de cancers, de la lame basale et du stroma; 2- ses activités de synthèse et d'entretien de la lame basale; 3- sa capacité de promouvoir la

différenciation des CLUM; 4- son association à des lésions bénignes et non à des lésions malignes; 5- son apparente résistance à la transformation (allusion à la rareté des carcinomes myoépithéliaux); 6- le caractère bénin de la majorité des lésions à composante myoépithéliale; 7- le fait que des CMEM lésées accumulent de l'ECM, ces chercheurs impliquant que les lésions myoépithéliales «se contiendraient» d'elles-mêmes; 8- le fait que la CMEM produirait davantage d'inhibiteurs d'enzymes de dégradation des lames basales que de protéases; et 9- la capacité qu'ont des lignées myoépithéliales humaines à freiner l'invasion et d'inhiber l'angiogenèse *in vitro*.

Pourtant, en 2000, les résultats de recherches réalisées par hybridation génomique comparative¹⁵⁴ et par *microarrays* d'ADN complémentaires⁴ sont venus ébranler ce statut nouvellement affirmé. Reproduits depuis^{5,209}, ces résultats démontrent qu'une proportion importante de carcinomes du sein particulièrement agressifs présentent, de façon inattendue, un profil plus basal qu'apical. Des hypothèses oubliées refont ainsi surface^{153,210,211,212}. Tel que mentionné plus tôt, ces données récentes supportent les conclusions d'études d'IHC préalablement marginalisées. Leurs résultats avaient été reçus avec scepticisme ou rejetés, les marqueurs employés étant rapidement jugés trop peu fiables (ex. FI^{6,7,8,9,10,11,12,13,201}). Pourtant, devant les preuves qui s'accumulent^{213,214,215,216,217}, les dictats voulant que la majorité des carcinomes du sein dérivent de CLUM et que la CMEM soit une alliée «perdue au combat» semblent chanceler.

Hétérogénéité pathologique et systèmes de classification

Le développement de lésions peut estomper localement l'hétérogénéité normale du tissu mammaire ou «la remplacer», beaucoup de lésions étant elles-mêmes hétérogènes. Ainsi, la plupart des carcinomes comprennent plus d'une population cellulaire altérée. Dans un carcinome donné, ces populations cancéreuses peuvent être physiquement isolées (formation de foyers distincts) ou étroitement associées. Dans ce dernier cas, certaines coexistent alors que d'autres semblent faire collusion et se fusionner. Bien que leurs propriétés antigéniques soient variables, les cellules de ces populations ont la particularité de réagir presque exclusivement avec des marqueurs luminaux – d'où la notion selon laquelle la majorité des cancers du sein tirent leur origine de CLUM. On croit qu'en raison de divers stimuli délétères, des CLUM pathologiques établissent des relations chaotiques entre elles et avec les cellules de l'hôte (ex. CMEM et CLUM résiduelles, myofibroblastes);

ceci expliquerait la distribution hétérogène de certains marqueurs dont l'utilité semble considérablement réduite (ex. les intégrines²¹⁸). À l'inverse, l'émergence de clones de CLUM bénéficiant d'avantages particuliers de croissance expliquerait la distribution anormalement extensive et uniforme de certains marqueurs dans des cas de carcinomes agressifs.

Du fait de cette hétérogénéité constitutive, chaque carcinome du sein semble unique. Cette variabilité rend la classification de ces entités ardue. En pratique, chaque pathologiste a donc la responsabilité de pallier, au meilleur de ses connaissances, les limites des classifications actuelles (ex. quel diagnostic poser en présence d'un carcinome «intermédiaire» entre deux classes d'entités aux implications thérapeutiques dissimilaires?). En recherche, le degré de concordance entre la réalité et la théorie influence souvent fortement l'étape de sélection des spécimens : les cas dont le diagnostic semble difficilement contestable par des pairs (cas dits «de *textbook*») seront habituellement préférés aux lésions «intermédiaires», pourtant les plus fréquentes et les plus difficiles à classer en clinique.

Sources de confusion en pathologie mammaire

Les différents vocables utilisés pour désigner les sous-divisions glandulaires et les types cellulaires épithéliaux ou mésenchymateux du sein génèrent des malentendus en pathologie comme en physiologie mammaire. La lecture d'ouvrages de référence^{20,93,95,180,181} indique qu'à ces sources de confusion, il faut ajouter : 1- l'utilisation de terminologies différentes pour décrire les altérations de ces sous-divisions et types cellulaires; 2- l'application de critères de diagnostic différents; 3- la coexistence de systèmes distincts d'évaluation du grade des lésions prolifératives mammaires (plusieurs dérivent par contre du système de Bloom et Richardson²¹⁹, évaluant la préservation d'une capacité de formation de tubules, le polymorphisme nucléaire et l'index mitotique des tumeurs; ex. système Scarf-Bloom-Richardson-Elston-Ellis²²⁰ ou «SBR-EE»); 4- le côté subjectif de l'application de critères de diagnostic et d'évaluation de grade tumoral; 5- la coexistence/co-utilisation de multiples termes pour désigner un même type de lésion; 6- le regroupement d'entités parfois peu similaires, dont les mécanismes de pathogenèse restent inconnus, sous un vocable unique; et 7- l'utilisation persistante de termes conceptuellement désuets ou inexacts (ex. l'utilisation des termes «carcinome canalaire» et «carcinome

lobulaire» pour différencier des entités pathologiques distinctes, pourtant toutes généralement issues de lobules/TDLU⁶⁹).

Cellule myoépithéliale humaine résiduelle, altérée, ou pathologique

En pathologie mammaire, le terme «CMEM résiduelle» désigne toute CMEM associée aux foyers d'un carcinome qui n'est pas un carcinome myoépithélial reconnu. Cette désignation commune masque une réalité rarement décrite, dont l'ampleur est difficile à saisir : le fait que les propriétés des CMEM ne sont pas uniformes. Souvent mentionnées à titre d'anecdotes, les variations inter- et intra-individuelles de propriétés et de distribution des CMEM résiduelles tardent à être documentées (ex. absence d'études d'IHC systématiques et nombreux biais de la littérature limitant la réalisation de méta-analyses sur ce sujet).

Tel que mentionné plus tôt, beaucoup de lésions non néoplasiques du sein présentent un important contingent de CMEM. Un petit nombre d'études employant quelques marqueurs myoépithéliaux^{1,20,95} (souvent un seul, l' α SMA; parfois quelques-uns, en combinaisons variables impliquant typiquement des protéines de muscle, la vimentine et la protéine S100) suggèrent que le «profil antigénique» de ces CMEM altérées différerait peu de celui de CMEM normales. Au-delà de leurs rares attributs exploités à des fins de diagnostic, les propriétés restent méconnues.

Le diagnostic des carcinomes myoépithéliaux repose sur la mise en évidence de CMEM pathologiques; ceci requiert la démonstration d'une coexpression de protéines musculaires (myofilaments) et de kératines (tonofilaments) au niveau cellulaire par microscopie électronique. Cette technique nécessite un échantillonnage spécial des tissus qui n'est pas toujours fait d'emblée puisque ces carcinomes ressemblent souvent, à s'y méprendre, à des proliférations stromales bénignes.

Dans cette thèse, nous utiliserons : 1- le terme «CMEM normales» pour désigner les CMEM de seins exempts de néoplasmes; 2- le terme «CMEM péri-lésionnelles» pour désigner les CMEM de structures glandulaires d'aspect relativement normal, situées à proximité de néoplasmes; 3- le terme «CMEM résiduelles» pour désigner les CMEM qui délimitent des foyers de néoplasmes non myoépithéliaux; et 4- le terme «CMEM

pathologiques» pour désigner les CMEM de néoplasmes impliquant une composante myoépithéliale.

Hypothèse de recherche

Nous avons émis l'hypothèse que l'évaluation des CMEM humaines pourrait être inadéquate en raison du nombre insuffisant et du choix des marqueurs myoépithéliaux utilisés pour fins de diagnostic en milieu hospitalier et pour fins de recherche dans divers centres d'étude sur le sein. À notre avis, de par sa position tissulaire et plusieurs de ses propriétés méconnues, la CMEM serait physiologiquement cruciale – et non accessoire – dans le sein normal et pathologique.

Objectifs

Notre objectif principal était de contribuer à la caractérisation de la CMEM humaine, notamment: 1- pour optimiser la recherche par IHC de la CMEM humaine à des fins diagnostiques; 2- pour documenter des aspects de la biologie de la CMEM qui font l'objet d'incertitudes et de controverses, y compris les fondements d'utilisations actuelles de marqueurs de différenciation myoépithéliale en pathologie mammaire. Outre ces objectifs généraux, nos travaux visaient aussi, plus spécifiquement: 1- la corroboration de données éparses d'une littérature très fragmentaire sur les CMEM du sein fœtal, du sein adulte normal au repos et du sein pathologique; 2- la comparaison d'efficacité de marqueurs reconnus et putatifs de CMEM en pathologie pour préciser leur(s) contexte(s) d'utilisation respectif(s), en clinique et/ou en recherche.

Plan de l'étude

Une revue extensive de la littérature disponible sur la CMEM humaine nous a amenés à privilégier un devis de caractérisation de la CMEM humaine comportant trois volets inter-reliés : 1- la caractérisation de CMEM immatures normales; 2- la caractérisation de CMEM «matures» normales; 3- la caractérisation de CMEM résiduelles/altérées/pathologiques. Dans notre premier volet, nous avons caractérisé les précurseurs foetaux normaux de la CMEM au cours du deuxième trimestre gestationnel, c'est-à-dire au moment de leur apparition, selon la littérature. Cette portion de l'étude devait nous permettre de vérifier si les marqueurs de CMEM utilisés en clinique sont des marqueurs précoces ou tardifs de sa différenciation normale; ceci nous permettrait

d'évaluer leur sensibilité vis-à-vis de CMEM incomplètement différenciées, soit de cellules potentiellement moins efficaces comme «alliées de l'hôte», par exemple. Parce que l'étude d'états pathologiques nécessite une connaissance préalable de l'état normal dont ils s'écartent, la documentation de CMEM les plus «normales» possible était essentielle. Notre second volet a été entièrement réalisé sur des tissus issus de chirurgies mammaires esthétiques (réductions et redrapages mammaires chez des femmes sans antécédents ni diagnostic de lésions au sein). Enfin, des échantillons de sein pathologique ont été étudiés afin d'établir le degré de variabilité des propriétés des CMEM résiduelles et/ou altérées associées à diverses lésions mammaires (incluant des échantillons de carcinomes mammaires invasifs particulièrement agressifs et de rarissimes carcinomes myoépithéliaux malins du sein).

Dans un premier temps, avec l'approbation des comités d'éthique de la recherche locaux, nous avons entrepris de caractériser par microscopie optique (MO) et par IHC les propriétés de CMEM humaines d'échantillons de sein normal et pathologique; leur immunophénotype a été étudié de manière systématique et uniforme afin de compléter, de confirmer ou d'infirmier les données disponibles sur ce type cellulaire. Dans un second temps, nous nous sommes assurés de la reproductibilité de nos résultats préliminaires (sur spécimens initiaux et additionnels) et pour approfondir des résultats préliminaires jugés particulièrement dignes d'intérêt, nous avons : 1- optimisé nos protocoles existants d'IHC; 2- mis au point de nouveaux protocoles d'IHC; 3- mis au point et employé des techniques additionnelles (colorations enzymatiques, réaction de polymérase en chaîne - RT-PCR - sur du matériel enrichi en CMEM microdisséquées par capture au laser). Pour l'IHC, les conditions expérimentales retenues reproduisaient le plus fidèlement possible le contexte de travail en milieu hospitalier afin d'accroître, tel que le demandaient nos objectifs, la pertinence clinique des données générées (ex. travail sur des tissus humains et choix d'une technique accessible aux cliniciens; utilisation de réactifs – en particulier d'anticorps primaires - disponibles commercialement seulement; voir la section Matériel et méthodes).

MATÉRIEL ET MÉTHODES

La présente section détaille les principaux aspects de notre devis expérimental d'un point de vue plus technique que conceptuel; par souci de concision, certains protocoles et des réflexions d'ordre technique font l'objet d'annexes distinctes à la fin de cette thèse.

Nos travaux ont reçu l'approbation des comités d'éthique de la recherche du CHUM et de l'Hôpital Sainte-Justine; ils ont été réalisés dans le département de pathologie de deux hôpitaux du CHUM (pavillons Notre-Dame et Hôtel-Dieu) et au Centre de recherche de l'Hôpital Sainte-Justine (laboratoire du Dr Hugo Soudeyns).

Matériel

Les CMEM et les voies d'interactions épithélio-stromales mammaires présentent des différences inter-espèces marquées^{23,25,221,222}, d'où notre recours à du matériel humain. Parce que les CME humaines présentent des différences inter-organes importantes^{145,223,224,225,226}, il nous semblait préférable d'étudier des CME mammaires plutôt que salivaires ou sudoripares (longtemps utilisées comme modèles d'étude de la CMEM). Nous avons par ailleurs choisi de travailler sur des tissus et non sur des cultures cellulaires pour deux raisons : premièrement, les CMEM humaines mises en culture présentent systématiquement des altérations phénotypiques (malgré le recours aux xélogreffes ou aux gels de culture tridimensionnels); deuxièmement, à l'heure actuelle, les milieux de culture dits «fonctionnels» ne sont pas entièrement représentatifs du micro-environnement naturel de la CMEM humaine⁴⁶: tout perfectionnés qu'ils soient, ils ne permettent pas encore de recréer le contexte physiologique de l'organisme entier de manière fidèle et reproductible⁴⁷. L'importance du micro-environnement récemment dévoilée par ces systèmes est précisément la raison pour laquelle l'étude descriptive de tissus humains - même fixés - leur semblait préférable.

Échantillons de sein foetal

Les échantillons présentés au Tableau VII ont été obtenus et analysés avec le consentement écrit des patientes. Pour fins de comparaison avec la littérature, le degré de développement foetal est exprimé en termes d'âge gestationnel et de longueur du pied foetal (LPF); bien que cette dernière mesure soit plus précise, l'âge gestationnel a été davantage

utilisé dans la littérature récente et le sera donc aussi dans cette thèse, pour fins de comparaison.

Tableau VII Échantillons de sein foetal

Code	État	Sexe	Âge gestationnel	Longueur du pied foetal
F1	TFP	ND	15 semaines	18 mm
F2	TFC	ND	16 semaines	21 mm
F3	TFC	M	18 semaines	28 mm
F4	TFP	F	18 semaines	32 mm
F5	TFC	F	18 semaines	32 mm
F6	TFP	F	20 semaines	33 mm
F7	TFC	F	20 semaines	33 mm
F8	TFP	F	20 semaines	36 mm
F9	TFP	F	21 semaines	32 mm
F10	TFC	F	21 semaines	32 mm
F11	TFP	M	24 semaines	45 mm
F12	TFC	M	24 semaines	45 mm

Légende : F, foetus féminin; M, foetus masculin; N/D, non disponible; TFC, tissu prélevé à l'état frais et congelé; TFP, tissu prélevé à l'état frais et fixé/enrobé en paraffine.

Brièvement, une infirmière distribuait le formulaire d'information et de consentement relatif au projet de recherche (Annexe I) dans le cadre des visites préparatoires précédant toute interruption volontaire de grossesse à motif social. Le projet n'a donc été abordé qu'avec les patientes dont la décision concernant l'avortement était ferme, après l'évaluation – professionnelle, par un tiers - de l'état de détresse personnel associé à cette décision. Nous avons rencontré les patientes quelques heures avant la chirurgie. Une forte proportion d'entre elles étant mineures, leur participation au projet de recherche impliquait d'obtenir leur assentiment, mais aussi le consentement écrit des parents/tuteurs légaux.

Nous avons ainsi eu accès à des débris feto-placentaires résultant d'interruptions volontaires de grossesse par aspiration-curetage, très rarement à des foetus complets. Les spécimens, obtenus à l'état frais, étaient mis sur glace ou conservés à 4°C jusqu'au prélèvement des échantillons (autant que possible, dans les minutes suivant la chirurgie). Pour fins de confidentialité, nous avons attribué des codes alpha-numériques aux échantillons tissulaires dès leur prélèvement.

Macroscopiquement, de 15 à 24 semaines de gestation, les seins foetaux ont l'apparence de petites sphères translucides à blanchâtres; ils ont un diamètre inférieur au millimètre et font légèrement saillie à la peau. Ces structures occupent une position thoracique presque latérale avant 18 semaines et une position thoracique antérieure avoisinant la ligne médio-latérale à partir de 18 semaines. Le derme péri-mammaire est intensément vascularisé (souvent le seul point de repère morphologique disponible pour localiser les structures d'intérêt parmi les débris de curetage).

Échantillons de sein adulte normal au repos

Macroscopiquement, les pièces reçues étaient des segments de tissu mammaire surmontés d'ellipses cutanées; nous avons effectué les prélèvements à l'opposé de ces dernières, dans de fines travées blanchâtres sillonnant les amas adipeux, i.e. des zones plus susceptibles de contenir des éléments glandulaires.

Tableau VIII Spécimens de sein adulte normal au repos

Code	État	Sexe	Âge	JCMA/28	Chx	Diagnostic
N1	TFC, TFP	F	41 ans	2	RDP	PMN, CFK légers, HSA
N2	TFC, TFP	F	41 ans	4	RMB	PMN
N3	TFC, TFP	F	37 ans	6	RMB	PMN
N4	TFC, TFP	F	20 ans	12	RMB	PMN
N5	TFC, TFP	F	25 ans	14	RMB	PMN
N6	TFC, TFP	F	42 ans	14*	RMB	PMN
N7	TFC, TFP	F	18 ans	15	RMU	PMN
N8	TFC, TFP	F	21 ans	20	RMB	PMN
N9	TFC, TFP	F	39 ans	20	RMB	PMN, CFK légers
N10	TFC, TFP	F	43 ans	23	RMB	PMN, CFK légers, HSA
N11	TFC, TFP	F	25 ans	28	RMB	PMN
N12	TFC, TFP	F	40 ans	28	RMB	PMN, CFK légers
N13	TFC, TFP	F	43 ans	ND**	RMB	PMN

Légende : CFK, changements fibro-kystiques; HSA, hyperplasie sans atypie; JCMA/28, jour du cycle menstruel de la patiente où avait lieu la chirurgie, ajusté à un cycle de 28 jours (voir le texte); PMN, parenchyme mammaire normal; RDP, redrapage mammaire; RMB, réduction mammaire bilatérale; RMU, réduction mammaire unilatérale (compensation d'hypoplasie); TFC, tissu prélevé à l'état frais et congelé; TFP, tissu prélevé à l'état frais et fixé/enrobé en paraffine.

* Cycle s'étant révélé anovulatoire.

** La patiente a subi une hystérectomie plusieurs années auparavant.

Le Tableau VIII résume les principales caractéristiques de nos spécimens de sein adulte normal au repos. Brièvement, les plasticiens collaborant au projet ont remis un

formulaire d'information et de consentement (Annexe II) et un court questionnaire à des patientes les consultant pour une réduction mammaire bilatérale ou un redrapage mammaire (femmes adultes, en bonne santé générale, sans antécédents de lésions mammaires). Avec leur accord, des échantillons ont été prélevés à l'état frais et ce, le plus tôt possible après la chirurgie. En cas de délai (ex. transport au département hospitalier d'un spécimen de chirurgie effectuée en bureau privé), les tissus ont été réfrigérés à 4°C.

Pour fins d'uniformisation des données relatives au cycle mammaire, nous avons utilisé l'équation proposée par Ramakrishnan et coll.⁵⁹ :

$$\text{JCMA}/28 = \frac{14 \times (\text{jour du cycle de la patiente au moment de la chirurgie})}{(\text{durée moyenne des cycles menstruels de la patiente}) - 14}$$

où JCMA/28 est le jour du cycle menstruel où a lieu la chirurgie ajusté sur un cycle théorique de 28 jours et le dénominateur représente la durée moyenne des phases folliculaires de chaque patiente (en considérant que la durée de la phase lutéale, soit 14 jours, varie peu d'une femme à l'autre).

Échantillons de sein pathologique

L'utilisation des échantillons tissulaires présentés au Tableau IX a fait l'objet de consentements écrits de la part des patientes. Les diagnostics inscrits sont ceux qui figuraient aux dossiers des patientes (diagnostics rendus par des pathologistes d'expérience).

Tissus de contrôle

Nos tissus de contrôle positif d'IHC ont été prélevés à l'état frais (moelle épinière, œsophage, peau, intestin grêle, prostate, rein), ou mis à notre disposition par le département de pathologie d'accueil sous la forme de blocs de paraffine récemment archivés (amygdale, côlon, thymus). À l'instar de nos échantillons mammaires, tous ces tissus de contrôle ont été préparés selon le protocole standard des départements de pathologie d'accueil du CHUM. Nous avons utilisé des coupes de ces tissus comme contrôles positifs conventionnels d'IHC. Ces tissus ont aussi servi à construire quelques *microarrays* tissulaires à l'aide d'un appareil à opération manuelle prévu à cet effet (MTA-1, Beecher Instruments Inc., Sun Prairie,

Wisconsin). Pour ces travaux, nous avons utilisé des microarrays «de contrôle d'IHC» et non «échantillonnage», un choix discuté à l'Annexe III. L'Annexe III présente aussi une description de la fabrication de nos microarrays tissulaires, une liste des avantages/inconvénients liés à leur utilisation et une courte réflexion sur les avantages potentiels d'introduire cette technologie en milieu hospitalier.

Tableau IX Spécimens de sein pathologique

Code	État	Sexe	Âge	Chx	Diagnostic
T1	TFC, TFP	F	12 ans	RMB	LPEF (hyperplasie mammaire bilatérale floride)
T2	TFC, TFP	F	20 ans	RMB	LPEF (hyperplasie mammaire bilatérale floride)
T3	TFC, TFP	M	14 ans	RMB	LPEF (gynécomastie juvénile)
T4	TAP	F	44 ans	TUM	LPEF (fibroadénome), adénose sclérosante, métaplasie apocrine
T5	TAP	F	43 ans	TUM	Cicatrice radiaire, rares foyers de DCIS (10%)
T6	TAP	F	59 ans	BTR	CCI tubulaire de bas grade (0/5 ganglions +)
T7	TFC, TFP	F	64 ans	MASt	CCI de haut grade (3/8 ganglions +)
T8	TFC, TFP	F	72 ans	MASp	CCI de bas grade (1/3 ganglions +)
T9	TFC, TFP	F	45 ans	TUM	CCI/CLI de grade intermédiaire (13/14 ganglions +)
T10	TFC, TFP	F	53 ans	MASt	CCI de haut grade (0/25 ganglions +)
T11	TFC, TFP	F	36 ans	TUM	CCI grade intermédiaire (0/12 ganglions +)
T12	TFC, TFP	F	74 ans	MASp	CLI de haut grade, foyers de LCIS (2/11 ganglions +)
T13	TAP	F	27 ans	TUM	AMYOE (douteux); DCIS, CFK sévères
T14	TAP	F	48 ans	MASp	AMYOE malin (1/10 ganglions +)
T15	TAP	F	62 ans	BTR	LPEF, microcalcifications
T16	TAP	F	62 ans	TUM	MYOE malin (0/18 ganglions +)

Légende : (## ganglions +), nombre de ganglions présentant des cellules métastatiques sur le total de ganglions axillaires prélevés; AMYOE, adénomyoépithéliome; BTR, biopsie au trocart; CCI, carcinome canalaire infiltrant; CFK, changements fibro-kystiques; Chx, type de chirurgie; CLI, carcinome lobulaire infiltrant; DCIS, carcinome canalaire *in situ*; LCIS, carcinome lobulaire *in situ*; LPEF, lésion proliférative fibro-épithéliale; MASp, mastectomie partielle; MASt, mastectomie totale; MYOE, myoépithéliome; RMB, réduction mammaire bilatérale; TAP, tissu archivé fixé/enrobé en paraffine; TFC, tissu prélevé à l'état frais et congelé; TFP, tissu prélevé à l'état frais et fixé/enrobé en paraffine; TUM, tumorectomie.

N.B. Les échantillons T15 et T16 provenaient de la même patiente.

Méthodes

Préparation des spécimens

Échantillons de sein foetal

Nous avons recouvert environ 25% des glandes immatures des spécimens se présentant sous forme de débris feto-placentaires et 100% des glandes de foetus complets. Chaque prélèvement, centré sur un mamelon, mesurait environ 1cm X 1cm X 0,5cm. Certains échantillons ont été déposés dans un médium de congélation (OCT Compound, Tissue Tek, SakuraFinetek U.S.A. Inc, Torrance, CA), congelés immédiatement (sur isopentane refroidi à l'azote liquide) puis conservés à -80°C jusqu'au moment de leur coupe. Les autres ont été immergés pendant 24h dans un volume adéquat (au moins 20 fois le volume de chaque échantillon) du fixateur TissuFix #2 (Chaptec, Montréal, PQ) puis ils ont été enrobés en paraffine de manière conventionnelle (circulation automatisée sur Tissue-Tek VIP, Miles Scientific/Bayer Inc., Toronto, ON). Le TissuFix#2, utilisé en pratique courante au CHUM, est une solution commerciale de formaldéhyde tamponnée modifiée (composition complète non divulguée; comprend notamment de la formaldéhyde, du méthanol, de l'acide trichloroacétique); son efficacité s'est avérée similaire – et parfois supérieure – à celle de «solutions-maison» de formaldéhyde tamponnée²²⁷ pour la réalisation d'études extensives d'IHC conventionnelle. Nous l'avons aussi utilisé à l'Hôpital Sainte-Justine pour uniformiser la préparation de tous nos spécimens récoltés *de novo* et celle de certains tissus archivés mis à notre disposition au CHUM. Nous avons préparé des coupes tissulaires de $3\mu\text{m}$ (Leica Cryocut 1800 pour les tissus congelés, Leica RM2145 pour les tissus fixés, enrobés en paraffine; Leica, Deerfield, IL) pour l'analyse de ces spécimens par MO et IHC. Pour des analyses par RT-PCR de matériel microdisséqué, nous avons aussi préparé des coupes de tissus congelés de $5\mu\text{m}$ en conditions dites «RF» (angl. *RNAse-free*; ex. port de gants, utilisation de matériaux neufs); ces conditions limitent la présence et l'activité d'enzymes qui digèrent l'ARN.

Échantillons de sein adulte normal au repos

Pour chaque sein, nous avons prélevé quatre échantillons mesurant environ 1cm X 1cm X 0,5cm pour la congélation; quatre échantillons d'environ 1,5cm X 1cm X 0,5cm ont été fixés et inclus en paraffine tel que décrit ci-dessus. Ces derniers étant légèrement plus

volumineux et plus riches en graisse que nos échantillons foetaux, la durée de fixation moyenne a été augmentée à 30h; aucun autre changement n'a été apporté aux conditions de préparation décrites pour nos spécimens foetaux.

Échantillons de sein pathologique

Nous avons analysé certains cas à la demande de cliniciens dans le cadre d'investigations complémentaires au diagnostic (matériel dès lors limité à des blocs de réserve – parfois à seulement quelques coupes – de tissus inclus en paraffine). Les échantillons reçus à l'état frais ont été préparés comme nos échantillons de sein adulte normal.

Tissus de contrôle

Lorsque reçus à l'état frais, nos tissus de contrôle ont été préparés à l'instar de nos échantillons de sein adulte normal.

Microscopie optique (MO)

Autant que possible, nous avons coloré des coupes de chaque spécimen à l'HPS ou à l'H&E (HPS : coloration automatisée sur DRS-601 Sakura Diversified Stainer – Sakura Finetek U.S.A. Inc., Torrance, CA – des coupes de spécimens en paraffine; H&E : coloration manuelle des coupes de spécimens congelés).

Immunohistochimie (IHC)

Notre technique d'étude principale a été l'IHC *in situ*, une technique utilisée en pathologie depuis plus de vingt ans. Bien connue des cliniciens, elle contribue de manière significative au diagnostic et à l'évaluation des lésions tissulaires²²⁸. Unissant certains aspects de l'histologie traditionnelle et de la biologie moléculaire, les renseignements fournis par l'immunohistochimie établissent un pont entre les informations fournies par ces deux autres approches. Cette technique a bénéficié de nombreuses mises au point au fil des années, ce qui lui confère des avantages indéniables^{229,230} (ex. réseau de fournisseurs en équipements/réactifs bien établi; réactifs de qualité constante disponibles commercialement; documentation préalable de nombreuses sources de biais permettant de prévoir et de limiter leur impact).

Nous nous sommes abstenu d'utiliser l'immunofluorescence pour deux raisons. Premièrement, l'impact de la conservation sur les marquages en fluorescence, autrefois labiles, reste peu documenté. Deuxièmement, contrairement à l'immunofluorescence, l'IHC conventionnelle «enzymatique» permet d'apprécier les éléments tissulaires non marqués. À notre avis, il s'agit d'un avantage non négligeable pour l'interprétation de résultats dans un organe aussi complexe que le sein et pour la documentation d'échantillons tissulaires rares.

Pour permettre la comparaison des échantillons de sein fœtal, adulte normal et pathologique à l'étude, l'uniformité du traitement des tissus a fait l'objet d'une attention spéciale. Nous avons préparé tous nos tissus dans le même département, en utilisant les mêmes équipements pour chacune des étapes : circulation, inclusion, coupe, colorations de routine, etc.. Toutes les fois qu'il était possible de le faire et afin de faciliter l'interprétation de comparaisons inter-spécimens de nos résultats, nous nous sommes assurés :

- 1- d'effectuer des prélèvements tissulaires de taille similaire et de les fixer uniformément (nature du fixateur, durée de la fixation);
- 2- d'utiliser des coupes de tissu sériées adjacentes pour faciliter le repérage de structures glandulaires données;
- 3- d'utiliser des coupes de tissu d'épaisseur constante (3 μ m);
- 4- d'effectuer chaque marquage sur plusieurs spécimens des trois volets du devis;
- 5- d'automatiser le marquage immunohistochimique le plus souvent possible; autrement, nous avons confié nos séries plus importantes à une technicienne d'expérience (technique manuelle plus uniforme).

Le Tableau X des pages suivantes résume nos antigènes-cibles; ils ont été sélectionnés parce qu'ils étaient :

- 1- des marqueurs de CMEM reconnus ou putatifs (inconnus ou peu utilisés en clinique);
- 2- des composantes d'hémidesmosomes, ces complexes médiateurs d'interactions épithélio-stromales;
- 3- des marqueurs reconnus ou putatifs d'agressivité dans les carcinomes mammaires de haut grade (non myoépithéliaux)
- 4- et/ou des composantes du micro-environnement de la CMEM, possédant des liens physiologiques reconnus avec elle (au moins chez le rongeur).

Notre ensemble initial d'anticorps comprenait également trois marqueurs de lames basales et deux marqueurs de CLUM. Les deux derniers antigènes mentionnés dans le Tableau X n'ont pas été utilisés sur l'ensemble de nos spécimens (ciblage de Ki67 et CEA pour vérifier certains points du modèle présenté dans le cadre de notre discussion). D'après la littérature, les entités répondant aux critères 1 et 3 sont nombreuses; elles ne se limitent pas à celles mentionnées dans le Tableau X (ex. thrombospondine²³¹, connexine 43¹⁴⁰, EGFR²⁰¹, synthase de l'oxide nitrique²³²).

Tableau X Antigènes-cibles (première partie)

Cible*	Site**	Statut	HD	Ca***
67LR (angl. <i>67-kD laminin receptor</i>); LAMR1 (angl. <i>laminin receptor 1</i>); RPSA (angl. <i>ribosomal protein SA</i>). Récepteur cellulaire de laminines contenues dans les lames basales épithéliales et autres.	M	CMEM: CSD	(-)	Oui ^{142,233,234}
α6 pour sous-unité d'intégrine alpha 6 ou ITGA6 (angl. <i>integrin, alpha 6</i>); CD49f. Récepteur cellulaire de laminines sous forme hétérodimérique (ex. α6β1, α6β4).	M	CMEM: CSD	Oui	Oui ^{136,235,236}
β1 pour sous-unité d'intégrine bêta 1 ou ITGB1 (angl. <i>integrin, beta 1</i>); CD29; FNRB (angl. <i>fibronectin receptor, beta subunit</i>); VLA-β (angl. <i>very late activation protein, beta polypeptide</i>). Récepteur cellulaire de laminines sous forme hétérodimérique (ex. α6β1).	M	CMEM: (-)/ CSD	Oui	Oui ²³⁷
β4 pour sous-unité d'intégrine bêta 4 ou ITGB4 (angl. <i>integrin, beta 4</i>); CD104. Récepteur cellulaire de laminines sous forme hétérodimérique (ex. α6β4).	M	CMEM: CSD	Oui	Oui ^{235,236}
CD10 ; MME (angl. <i>membrane metallo-endopeptidase</i>); CALLA (angl. <i>common acute lymphocytic leukemia antigen</i>); néprilysine; NEP (angl. <i>membrane-associated neutral endopeptidase</i>); enképhalinase. Enzyme au domaine catalytique extra-cellulaire; sa fonction de dégradation de peptides est connue mais ses substrats restent incertains.	M	CMEM: RSU	(-)	Oui ²³⁸
CD44v6 ; variante 6 de l'antigène Hermès, de la P-glycoprotéine 1 ou Pgp1. Récepteur cellulaire de l'acide hyaluronique des ECM, impliqué notamment dans les phénomènes de migration lymphocytaire dirigée.	M	CMEM: CSD/ RSU	(-)	Oui ^{239,240 241}
KRT14 pour kératine 14; cytokératine 14 ou CK14; kératine de type I (acide) de 50 kD (bas poids moléculaire). Composante cytosquelettique du réseau des FI; typique des dérivés de l'ectoderme. Indice de stratification épithéliale.	C	CMEM: CSD/ RSU	Oui	Oui ^{201,5,242,243}

Légende : C, cytoplasme; Ca, présence rapportée dans les cellules de carcinomes autres que «myoépithéliaux classiques»; CSD, controversé et/ou sous-documenté; CMEM, marqueur de CMEM selon la littérature; HD, composante d'hémidesmosome; FI, filaments intermédiaires; LB, lame basale; M, membrane(s) plasmique(s); N, noyau; RUV, reconnu, utilisé et validé en clinique; RSU, reconnu, sous-utilisé; UD, encore utilisé bien que généralement considéré comme désuet; (-) ne s'applique pas, ou non rapporté.

* La première désignation de chaque cible est celle qui sera utilisée dans cette thèse. D'après le site internet <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/LocusLink> (février 2004), Lackie et Dow²⁴⁴, O'Guin et coll.²⁴⁵. Voir page suivante.

** À l'échelle cellulaire.

*** Liste non exhaustive.

Tableau X Antigènes-cibles (deuxième partie)

KRT17 pour kératine 17; cytokératine 17 ou CK17; kératine de type I (acide) de 46 kD (bas poids moléculaire). Composante cytosquelettique du réseau des FI; typique des dérivés de l'ectoderme. Indice de prolifération épithéliale.	C	CMEM: CSD	(-)	Oui ^{125,201,242}
VIM pour vimentine. Composante cytosquelettique du réseau des FI; bien que plus typique des dérivés du mésenchyme, les cellules épithéliales l'expriment transitoirement au début de leur différenciation. Indice d'immaturité épithéliale.	C	CMEM: UD	Peut-être	Oui ^{7,10,11,126,246,247}
GFAP (angl. <i>glial fibrillary acidic protein</i>). Composante cytosquelettique du réseau des FI; typique de dérivés non neuronaux du neuro-ectoderme.	C	CMEM: (-)/ CSD	(-)	Oui ^{126,131}
αSMA pour alpha-actine du muscle lisse (angl. <i>alpha smooth-muscle actin</i>); ACTA2 (angl. <i>actin, alpha 2</i>); ACTSA (angl. <i>actin alpha, smooth muscle/aortic</i>); angl. <i>vascular smooth muscle actin</i> . Composante cytosquelettique principale du réseau actinien.	C	CMEM: RUV	(-)	Oui ^{5,201,243,248}
CNN1 pour calponine (angl. <i>calponin 1</i>); SMCC (angl. <i>smooth muscle-cell calponin</i>). Composante cytosquelettique du réseau actinien.	C	CMEM: RSU/ RUV	(-)	(-)
S100β ou S100B pour protéine S100 bêta (angl. <i>S100 calcium binding protein, beta - neural</i>) Composante cytosquelettique pouvant se lier au p53.	C	CMEM: CSD	(-)	Oui ²⁴⁹
S100A4 pour protéine S100A4 (angl. <i>S100 calcium binding protein A4</i>); CAPL (angl. <i>calcium placental protein</i>); métastatine-1 ou mts-1; calvasculine; FSP1 (angl. <i>fibroblast-specific protein-1</i>). Composante cytosquelettique de fonction imprécise (ex. initiation de transition épithéliale-à-mésenchymateuse).	C	CMEM: (-)/ CSD	(-)	Oui ^{141,249,250}
p63 ; CKAP4 (angl. <i>cytoskeleton-associated protein 4</i>). Composante cytosquelettique qui permet d'initier la stratification épithéliale; aussi un marqueur de pluripotence épithéliale.	N	CMEM: RSU/ RUV	(-)	Oui ^{251,252}

Légende : C, cytoplasme; Ca, présence rapportée dans les cellules de carcinomes autres que «myoépithéliaux classiques»; CSD, controversé et/ou sous-documenté; CMEM, marqueur de CMEM selon la littérature; HD, composante d'hémidesmosome; FI, filaments intermédiaires; LB, lame basale; M, membrane(s) plasmique(s); N, noyau; RUV, reconnu, utilisé et validé en clinique; RSU, reconnu, sous-utilisé; UD, encore utilisé bien que généralement considéré comme désuet; (-) ne s'applique pas, ou non rapporté.

* La première désignation de chaque cible est celle qui sera utilisée dans cette thèse. D'après le site internet <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/LocusLink> (mars 2004), Lackie et Dow²⁴⁴, O'Guin et coll.²⁴⁵. Voir page suivante.

** À l'échelle cellulaire.

*** Liste non exhaustive.

Tableau X Antigènes-cibles (troisième partie)

Cible*	Site**	Statut	HD	Ca***
ColIIV pour collagène de type IV (angl. <i>type IV collagen</i>). Composante majeure des lames basales épithéliales et autres.	LB	CMEM: CSD	Oui	(-)
ColVII pour collagène de type VII (angl. <i>type VII collagen</i>); angl. <i>long-chain collagen</i> . Composante des lames basales épithéliales seulement.	LB	CMEM: CSD	Oui	(-)
LN5 pour laminine 5 (angl. <i>laminin 5</i>); épiligrine. Composante importante des lames basales; influence la physiologie des cellules qui la touchent.	LB	CMEM: CSD	Oui	(-)
EMA (angl. <i>epithelial membrane antigen</i>); MUC1 (angl. <i>mucin 1</i>); PUM (angl. <i>peanut-reactive urinary mucin</i>); PEM (angl. <i>polymorphic epithelial mucin</i>). Marqueur associé à la sécrétion ; la fonction des entités porteuses de l'épitope reconnu est incertaine.	M	CLUM	(-)	Oui ¹
KRT19 pour kératine 19; cytotkératine 19 ou CK19; kératine de type I (acide) de 40 kD (bas poids moléculaire). Composante cytosquelettique du réseau des FI; jugé typique des dérivés de l'ectoderme.	C	CLUM	(-)	Oui ¹
CD34 ; HPCA CD34 (angl. <i>hematopoietic progenitor cell antigen CD34</i>); HPCA1 (désuet, angl. <i>hematopoietic progenitor cell antigen 1</i>). Récepteur cellulaire typique – mais non exclusif - des cellules souches hématopoïétiques.	M	FIBi	(-)	(-)
Ki67 Marqueur de prolifération cellulaire.	N	CC	(-)	Oui ¹
CEA (angl. <i>carcinoembryonic antigen</i>) Marqueur de tissus foetaux et tumoraux particuliers (signification biologique inconnue).	M	OncoF	(-)	Oui ¹

Légende : C, cytoplasme; CC, marqueur de cycle cellulaire en cours; Ca, présence rapportée dans les cellules de carcinomes autres que «myoépithéliaux classiques»; CLUM, marqueur de cellules luminales; CSD, controversé et/ou sous-documenté; CMEM, marqueur de CMEM selon la littérature; FIBi, marqueur de fibroblastes intra-lobulaires; HD, composante d'hémidesmosome; LB, lame basale; M, membrane(s) plasmique(s); N, noyau; OncoF, retrouvé chez le fœtus et dans certains carcinomes indifférenciés; RUV, reconnu, utilisé et validé en clinique; RSU, reconnu, sous-utilisé; UD, encore utilisé bien que généralement considéré comme désuet; (-) ne s'applique pas, ou non rapporté.

* La première désignation de chaque cible est celle utilisée dans cette thèse.

** À l'échelle cellulaire.

*** Liste non exhaustive.

L'ordre d'application des anticorps primaires (i.e. l'assignation des coupes tissulaires) a fait l'objet d'une attention spéciale. Dans un premier temps, soit pour notre étape de vérification de la littérature, nous avons respecté un ordre précis pour tous les cas analysés. Des lames intercalées non marquées, dites «blanches», ont été conservées au cas où une coupe aurait été perdue pendant la technique ou pour tester un marqueur autre que ceux envisagés initialement (ex. le p63, décrit après le début de nos travaux). Nous avons, par exemple, utilisé des coupes consécutives pour localiser :

- 1- des paires d'antigènes-cibles incluant un marqueur de CMEM reconnu et un marqueur de CMEM putatif jugé particulièrement prometteur par certains chercheurs (ex. α SMA et S100A4);
- 2- des entités moléculaires physiquement ou fonctionnellement liées (ex. les sous-unités d'intégrine α 6 et β 4).

Notre batterie immunohistochimique initiale figure au Tableau XI. Parce que les coupes de tissus enrobés en paraffine ont une durée de vie «sans altérations» limitée^{253,254}, nous avons attendu d'avoir une cohorte relativement complète – représentation des volets foetal, adulte normal et pathologique - avant de commencer à couper nos échantillons pour la première étape de caractérisation.

Tableau XI Batterie immunohistochimique initiale de caractérisation

Coupes de tissu congelé	Coupes de tissu fixé, inclus en paraffine		
1- C. routine	1- C. routine	8- C. routine	15- KRT19
2- ColIVII	2- S100β	9- ColIIIIV	16- lame blanche
3- LN5	3- S100A4	10- 67LR	attribuée au p63
4- α 6	4- αSMA	11- LN1 α 1	17- (lame blanche*)
5- β 4	5- EMA	12- CD29	
6- CD10	6- GFAP	13- KRT14	
7- (lame blanche*)	7- VIM	14- KRT17	

N.B. En raison de leur pertinence et/ou de la possibilité de les cibler sur paraffine, les entités qui apparaissent en caractères gras - et le CD34, ajouté récemment - ont été conservées après notre étape initiale de corroboration de la littérature.

* Le terme «lame blanche» désigne une coupe tissulaire réservée pour utilisation ultérieure.

Nous avons systématiquement utilisé des lames de verre pré-traitées (Micro Slides Snowcoat X-tra, Surgipath, Winnipeg, MAN) puisqu'elles minimisent le décollement des tissus en cours de technique.

Selon le matériel disponible et à l'aide d'un protocole d'IHC conventionnel (Annexe IV), des coupes de chaque spécimen ont été marquées pour certains ou pour la plupart des antigènes-cibles (Tableau X). Les anticorps employés à cette fin sont présentés au Tableau XII : les antigènes-cibles y sont regroupés verticalement en fonction de leur distribution théorique, comme au Tableau X. Cet ordre sera conservé au moment d'illustrer nos résultats. Nos résultats pour la KRT14 ont été reproduits à l'aide d'anticorps anti-KRT14 de fournisseurs distincts dans le sein foetal, adulte normal et pathologique.

Chaque série de coupes s'accompagnait de contrôles positifs et négatifs appropriés (outre les contrôles internes disponibles pour plusieurs antigènes ciblés, comme les vaisseaux sanguins péri-mammaires pour l' α SMA). Pour chaque antigène-cible, le traitement simultané de coupes de spécimens représentatifs des trois volets de l'étude a fourni de multiples contrôles externes tout en accroissant l'uniformité de traitement des cas. Pour certains anticorps (anticorps utilisables sans pré-traitement sur coupes en paraffine), nous avons eu recours à une version automatisée de notre protocole d'IHC (Dako Autostainer – Universal Staining System, modèle 3400; Dakocytomation, Mississauga, ON).

Deux techniques de double-marquage immunohistochimique ont été employées. Un kit commercial Histostain-DS (Zymed, San Francisco, CA) a permis de réaliser des doubles-marquages α SMA (BCIP/NBT, chromogène violet)/KRT14 (AEC, chromogène rouge). Notre technique personnelle, compatible avec les protocoles standards d'IHC utilisés dans les centres hospitaliers affiliés à l'Université de Montréal (CHUM), a permis de réaliser des doubles-marquages en brun (DAB; Sigma Chemical Co., St-Louis, MO) et bleu (Vector Blue de Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA; BCIP/NBT de Zymed, San Francisco, CA), en brun (DAB) et rouge (Fast Red de Dakocytomation, Carpinteria, CA), ou en brun (DAB) et violet (BCIP/NBT). Ces techniques sont décrites à l'Annexe IV.

Tableau XII Caractéristiques et conditions d'utilisation des anticorps primaires employés

Cibles	Clone	Type	Fabricant	Dilution	Détail
67LR	MLuC5	So; IgM	Neomarkers Inc. (Fremont, CA)	1 : 25	P; EZ, EnV
$\alpha 6$	BQ16	So; IgG1 κ	Dakocytomation (Mississauga, ON)	1 : 5	C; EnV
$\beta 1$	4B7R	So; IgG1 κ	Neomarkers Inc.	1 : 100	P; EZ, EnV
$\beta 4$	450-9D	So; IgG1	Serotec Ltd (Oxford, Angleterre)	1 : 100	C; EnV
CD10	SS2/36	So; IgG1 κ	Dakocytomation	1 : 400	C*; EnV
CD44v6	VFF-7	So; IgG1	Serotec Ltd	1 : 300	P; MO, EnV
KRT14	LL002	So; IgG3	Serotec Ltd	1 : 10	P; MO, LSAB2
KRT14	NCL-L- LL002	So; IgG3	Novocastra Laboratories Ltd	1 : 20	P; MO, LSAB2
KRT17	E3	So; IgG2b κ	Dakocytomation	1 : 20	P; MO, LSAB2
VIM	V9	So; IgG1 κ	Dakocytomation	1 : 100	P; MO, EnV
GFAP	6F2	So; IgG1 κ	Dakocytomation	1 : 100	P; EnV
α SMA	1A4	So; IgG2a κ	Dakocytomation	1 : 500	P; EnV
CNN1	CALP	So; IgG1 κ	Dakocytomation	1 : 30	P; EZ, EnV
S100 β	DAK- S100b/2	So; IgG1 κ	Dakocytomation	1 : 400	P; MO, EnV
S100A4	A5114	La; PolyC	Dakocytomation	1 : 400	P; MO, EnV
p63	4A4	So; IgG2a κ	Neomarkers Inc.	1 : 50	P; EnV
ColIII	CIV22	So; IgG1 κ	Dakocytomation	1 : 25	P; EZ, EnV
ColVII	LH7.2	So; IgG1	Serotec Ltd	1 : 5	C; EnV
LN5	P3H9-2	So; IgG1	Chemicon International Inc. (Temecula, CA)	1 : 50	C; EnV
EMA	E29	So; IgG2a κ	Dakocytomation	1 : 500	P; EnV
KRT19	RCK108	So; IgG1 κ	Dakocytomation	1 : 100	P; EZ, EnV
CD34	QBend/10	So; IgG1	Neomarkers Inc.	1 : 1000	P; EnV
Ki67	MIB-1	So; IgG1 κ	Dakocytomation	1 : 100	P; MO, EnV
CEA	CEA	La; PolyC	Dakocytomation	1 : 700	P; EnV

Légende : C, tissu congelé; EnV, kit EnVision (Dakocytomation); EZ, pré-traitement enzymatique (pronase); MO, pré-traitement au four micro-ondes (tampon citrate, pH 6.0); La, lapin; LSAB+, kit LSAB+ (Dakocytomation); LSAB2, kit LSAB2 (Dakocytomation); So, souris.

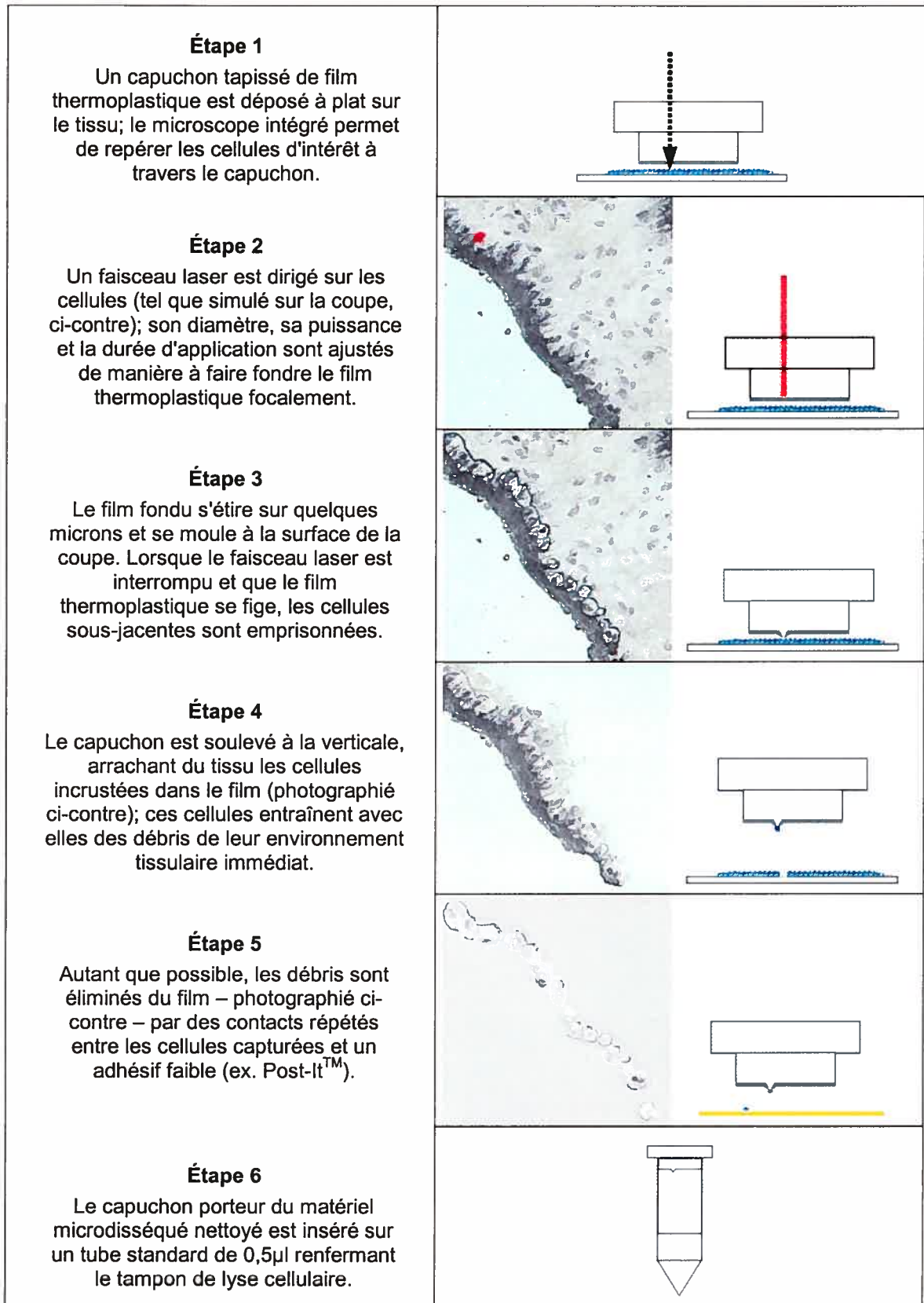
* Bien que des anticorps commerciaux anti-CD10 soient maintenant disponibles pour IHC sur tissus fixés/enrobés en paraffine, ils n'ont pas été retenus en raison de doutes émis sur leur spécificité par leurs fabricants.

Des colorations «enzymatiques» simples ont été occasionnellement réalisées à titre de contrôles de technique, mais aussi pour corroborer des données de la littérature moins récente (activités enzymatiques endogènes de distribution préférentiellement myoépithéliale dans le sein). Du DAB et du BCIP/NBT ont été employés pour visualiser la PERe et la PAe, respectivement, sur tissus congelés.

Microdissection par capture au laser sur coupes de sein adulte normal au repos

Nous avons utilisé un appareil PixCell II de microdissection au laser (Arcturus, Mountain View, CA) afin d'isoler des CMEM de CE *versus* de TDLU dans le sein adulte normal au repos – en conditions RF. Le procédé de capture exploité, décrit et illustré à la Figure 5, ne permet par contre pas d'obtenir des échantillons cellulaires parfaitement purs (débris d'arrachement). Nous avons tenté de contourner cet obstacle en ayant recours à un appareil de microdissection par découpage laser (Leica AS LMD, Leica Microsystems, Wetzlar, Allemagne), mais cette approche présentait d'autres inconvénients, incompatibles avec nos objectifs (ex. perte plus fréquente du matériel microdisséqué, impossibilité de nettoyer le matériel récupéré). Nous avons donc opté pour le PixCell II et soigneusement nettoyé les cellules microdisséquées; l'Annexe V renferme le protocole de préparation de nos échantillons tissulaires et une description plus détaillée, d'un point de vue technique, du procédé de microdissection par capture au laser sur cet appareil.

Figure 5 Microdissection au laser par capture sur film thermoplastique



Photographies de tissus contre-colorés à l'hématoxyline; 100X.

L'optimisation de nos techniques moléculaires nous a permis de limiter la taille de nos échantillons à 50-60 profils cellulaires sur coupes de 5µm. L'unité «équivalent-cellule» (équ-cell) donne une approximation de la quantité de matériel microdisséqué en termes de cellules complètes. Pour un diamètre cellulaire théorique fixé à 15µm, nos prélèvements comptaient donc 20 équ-cell de matériel enrichi en CMEM de CE et de TDLU. Une panne de congélateur a limité notre cohorte fiable (pour analyse d'ARN) aux cas N3, N5 et N12. Des cellules luminales ont aussi été microdisséquées (contrôle de spécificité de capture).

Techniques de biologie moléculaire (sein adulte normal au repos)

Les techniques employées étaient basées sur des protocoles développés par le Dr Claire Landry (Département d'immunologie, Université de Montréal) ou fournis par les fabricants des réactifs utilisés. Nous disposions de tissu adéquat pour trois de nos spécimens (N3, N5 et N12) au moment d'effectuer ces manipulations. Ces techniques ont été optimisées à l'aide d'échantillons de contrôle - peau de sein adulte - produits de manière standard, soit par extraction de l'ARN de coupes entières au TRIzol suivie d'une transcription inverse avec l'enzyme MMLV (réactifs de Gibco BRL, Life Technologies, Grand Island, NY; utilisés selon les directives du fabricant). Un dixième de chaque échantillon de microdissection a été utilisé pour chaque expérience (détection d'ARNm de 2 équ-cell par réaction de RT-PCR).

Extraction d'ARN total de matériel microdisséqué

Un kit d'extraction d'ARN total (Purescript RNA Isolation Kit, Gentra Systems, Minneapolis, MN) a été utilisé en conditions RF, selon les directives du fabricant, dans le cadre d'un protocole d'extraction d'ARN total pour petits échantillons (moins de 5000 cellules).

En résumé, immédiatement après la microdissection, le capuchon porteur de matériel était apposé sur un tube de 0,5ml renfermant 100µl de tampon de lyse cellulaire Gentra. L'ensemble était vortexé à l'envers pendant 30 sec puis centrifugé avant d'être mis en réserve à -80°C. Les tubes étaient dégelés à température ambiante pour la précipitation des protéines/de l'ADN (Protein-DNA Precipitation Solution du Purescript RNA Isolation Kit, Gentra Systems); l'ARN total, demeuré en solution, était ensuite précipité (isopropanol/glycogène à -20°C). Une première centrifugation permettait le lavage du culot

d'ARN à l'ETOH 70% à froid, une deuxième centrifugation permettait le retrait de cet éthanol. Le culot d'ARN, invisible à l'œil nu, était finalement réhydraté (RNA Hydratation Solution du Purescript RNA Isolation Kit, Gentra Systems) et mis sur glace en attendant l'étape de transcription inverse.

Réaction de transcription inverse (RT)

La RT de nos échantillons d'ARN et d'un contrôle (eau RF) a été réalisée à l'aide du kit de Qiagen (Valencia, CA) incluant l'enzyme Sensiscript Reverse Transcriptase, son tampon et des déoxynucléotides. La composition de notre mélange de RT est fournie à l'Annexe VI. L'incubation était de 60 min à 37°C, dans un volume final de 20µl. Un tube témoin contenant de l'eau RF était inclus pour chaque manipulation (contrôle de qualité de la technique de RT à l'étape de PCR). Après centrifugation, les tubes de produit (ADNc) étaient identifiés de manière appropriée et mis sur glace (pour technique de PCR immédiate) ou rangés à -70°C.

Réaction de polymérase en chaîne (PCR)

Nous avons initialement analysé nos échantillons d'ADNc pour notre cible d'intérêt, la KRT14, et pour la bêta-2 microglobuline (β 2M). De distribution vaste (considérée comme le produit d'un gène de maintien cellulaire ou «housekeeping gene»), la β 2M est souvent utilisée comme contrôle de la qualité de techniques d'extraction d'ARN et de RT-PCR notamment en oncologie mammaire^{255,256,257}. Toutefois, notre choix de la β 2M semble avoir été sous-optimal : quoique des études d'IHC qualifient sa distribution épithéliale mammaire d'uniforme^{255,258,259}, elle pourrait n'être exprimée qu'irrégulièrement dans l'épithélium du sein normal comme dans celui de l'intestin²⁶⁰. Ainsi, bien qu'elle nous ait semblé adéquate lors de nos mises au point de PCR sur ADNc de coupes de peau entières, la β 2M ne l'aurait pas été comme contrôle de la qualité de techniques d'extraction lors de l'analyse de nos spécimens; cette réflexion découle de données présentées dans la section des Résultats et discutées ensuite (ambiguïté d'interprétation de résultats reproductibles, négatifs pour l'ADNc de la KRT14 dans des échantillons également négatifs pour l'ADNc de la β 2M : matériel inadéquat ou cellules n'exprimant ni la KRT14 ni la β 2M?). Avant d'aboutir à cette constatation, devant certains résultats préliminaires, nous avons mis en doute notre technique et répété quelques fois nos manipulations. Nous avons tenté de cibler

la gamma-actine cytosquelettique (γ ACT) trop tard: presque épuisés, nos échantillons d'ADNc avaient déjà été dégelés et re-congelés plusieurs fois.

Nous avons réalisé nos PCR à l'aide d'un *kit* Taq DNA Polymerase d'Invitrogen (Burlington, ON), sur un appareil Biometra T3 Thermocycler (Biometra, Göttingen, Allemagne). La composition de notre mélange de PCR est fournie à l'Annexe VI. Chaque manipulation incluait un contrôle positif (ADNc de coupes de peau) et un contrôle négatif (eau de l'étape de RT); le volume final de réaction était de 25 μ l, ceci incluant 2 μ l d'ADNc - soit 1/10 du produit de RT d'un échantillon de 20 équ-cell ou du contrôle d'eau RF.

Le Tableau XIII identifie les cibles visées par nos PCR, les séquences des amorces employées de même que la taille du produit attendu pour chaque cible; les conditions de PCR résumées dans ce tableau sont détaillées à l'Annexe VI. Nous avons chargé les produits de PCR sur gels d'agarose (1,7%) contenant du bromure d'éthidium (Sigma Aldrich Co., St-Louis, MO) pour des migrations de 45-60 min à 100mV; une échelle commerciale de 100pb (Amersham Pharmacia Biotech Inc., Arlington Heights, IL) a permis d'évaluer la taille des fragments obtenus. Nous avons eu recours à un système de documentation et d'analyse AlphaImager 1220 (cabinet d'exposition aux ultra-violets MultiImage Light Cabinet couplé à un système informatique de Alpha Innotech Corporation, San Leandro, CA) pour visualiser ces résultats.

Tableau XIII Amorces de PCR

Cibles	Description de l'amorce	Référence	Taille du produit	Résumé des conditions
KRT14	S 5' TCC TCC TCC CAG TTC TCC TCT 3'	F. Jolicoeur	295pb	42 ou 45 c, 56°C
	AS 5' ATG CAA CTC AGA TAA TGA AGC TGT 3'			
β2M	S 5' TGA AGC TGA CA G CAT TCG 3'	Benitez et coll. ²⁶¹	409pb	42 c, 57°C
	AS 5' ATC TTC AAA CCT CCA TGA TG 3'			
γACT	S 5' GAC ACC AGG GC G TCA TGG TG 3'	Dubuis et coll. ²⁶²	612pb	42 c, 72°C
	AS 5' GCA GCT CGT AGC TCT TCT CC 3'			

Légende : AS, amorce anti-sens; c, cycles de PCR; pb, paires de base; S, amorce sens.

Documentation visuelle des résultats

Nous avons photographié nos résultats de MO, d'IHC et de techniques enzymatiques à l'aide d'un système d'imagerie digitale AxioPlan 2/Axiocam (Carl Zeiss, Göttingen, Allemagne) et assemblé ces images avec le logiciel Corel PHOTO-PAINT9 (Corel Corporation, Ottawa, ON).

Nous avons visualisé et enregistré nos résultats de RT-PCR grâce au système AlphaImager 1220 mentionné ci-dessus.

RÉSULTATS

Étant donné le peu d'études disponibles sur le sein foetal, nous détaillerons davantage nos résultats de MO dans ces échantillons. Par le biais de figures et tableaux de synthèse, nous résumerons ensuite nos principaux résultats d'IHC, de colorations enzymatiques et de RT-PCR sur matériel microdisséqué (sein adulte normal au repos). Certains des résultats présentés ont fait l'objet de publications (résultats préliminaires sur le sein foetal¹⁷²; documentation d'un cas excessivement rare de myoépithéliome malin naissant¹⁹⁴).

Microscopie optique (MO)

Sein foetal (deuxième trimestre de gestation)

Nos spécimens de sein foetal ne présentent pas de dimorphisme sexuel évident en MO. L'aspect des structures occupant la région mammaire varie par contre avec l'âge foetal.

Structures épithéliales

À 15 et 16 semaines de gestation, une petite masse ectodermique arrondie, avec un collet marqué, s'invagine dans le mésenchyme de la région mammaire (structure illustrée ultérieurement avec nos résultats d'IHC, à la Figure 11). Elle présente deux catégories plus ou moins distinctes de cellules : des cellules centrales aux aspects variés et des cellules basales plus uniformes. La transition entre la peau et ce «bourgeon primaire» (BP) est très graduelle; en effet, les cellules apicales et basales de l'épiderme immature semblent être en parfaite continuité avec les cellules centrales et basales du BP. Les cellules centrales du BP présentent un cytoplasme vacuolé ou peu coloré. Leur forme et leur orientation ressemblent à celles des cellules épidermiques en surface, mais deviennent indéfinies en-deçà du collet du BP. À cet endroit, la forme et les limites des cellules centrales deviennent difficiles à apprécier; leurs petits noyaux denses semblent suspendus dans un réseau filamenteux. Les cellules périphériques du BP, difficilement perceptibles à son collet, adoptent une forme cylindrique à sa base.

Dans nos spécimens âgés de 18 à 20 semaines, le primordium mammaire est légèrement plus volumineux; l'aspect basal du BP est déformé par de nombreuses protubérances, tel qu'illustré à la Figure 6. Contrairement aux cellules centrales, de forme et

d'orientation peu définies, les cellules basales du BP adoptent une forme cubique à cylindrique, une orientation rigoureusement perpendiculaire à celle de la lame basale sous-jacente et forment une monocouche plutôt régulière (pseudo-stratification occasionnelle, à la base du BP). Elles se distinguent aussi des cellules centrales par leur ratio nucléoplasmique élevé.

Figure 6 Primordium mammaire humain à 20 semaines de gestation (microscopie optique)

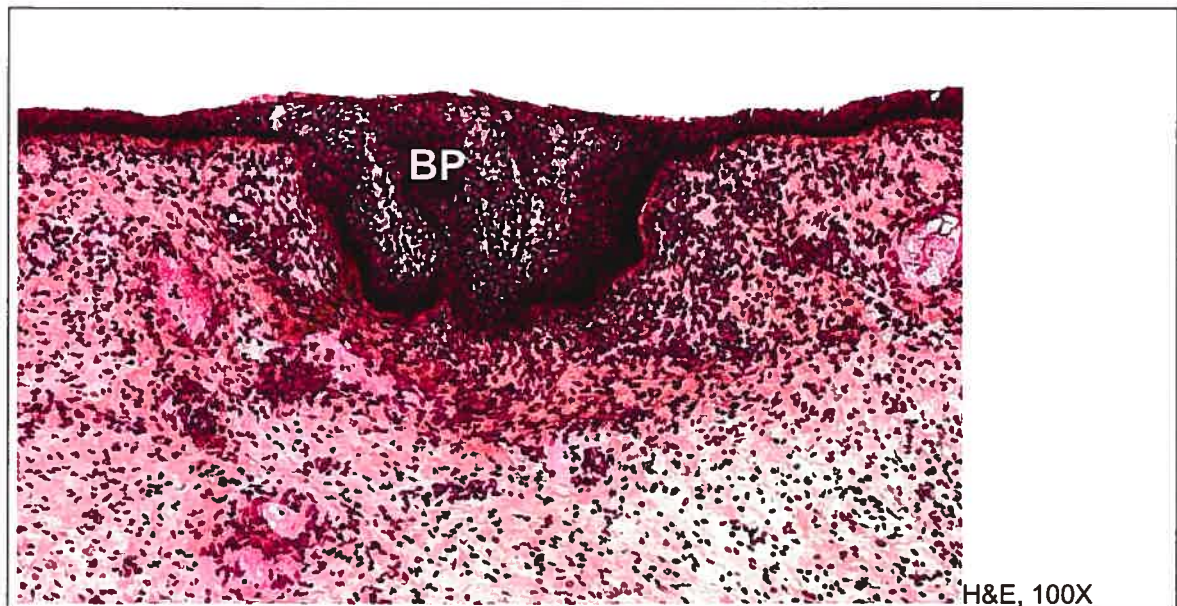


Illustration et identification de la structure appelée bourgeon primaire (BP) dans le texte.

De 21 à 24 semaines, le primordium est plus volumineux. L'aspect basolatéral du BP donne naissance à des projections secondaires (PS) aux tiges étroites et longues (tPS), terminées par des extrémités bulbueuses (ePS) souvent ramifiées (Figure 7). Dans le BP, des condensations de cellules supra-basales sont associées à l'origine de certaines tPS; ces condensations sont particulièrement évidentes sur certaines coupes réservées pour l'IHC (ex. base de BP à la Figure 13 en A et B). Les PS s'enfoncent profondément dans le mésenchyme de soutien et renferment quatre populations cellulaires distinctes les unes des autres (cellules centrales et basales des tPS; cellules centrales et basales des ePS), mais aussi des cellules centrales et basales du BP. Les propriétés des cellules centrales et basales de ces BP sont quasi-identiques à celles des BP de spécimens plus jeunes. Une fusion entre populations centrales et basales s'observe à chaque jonction BP-PS, mais non à la jonction peau-BP. La Figure 8 illustre les populations centrales et basales d'un BP et d'une tPS à 21 semaines de gestation.

Figure 7 Primordium mammaire humain à 21 semaines de gestation (microscopie optique)

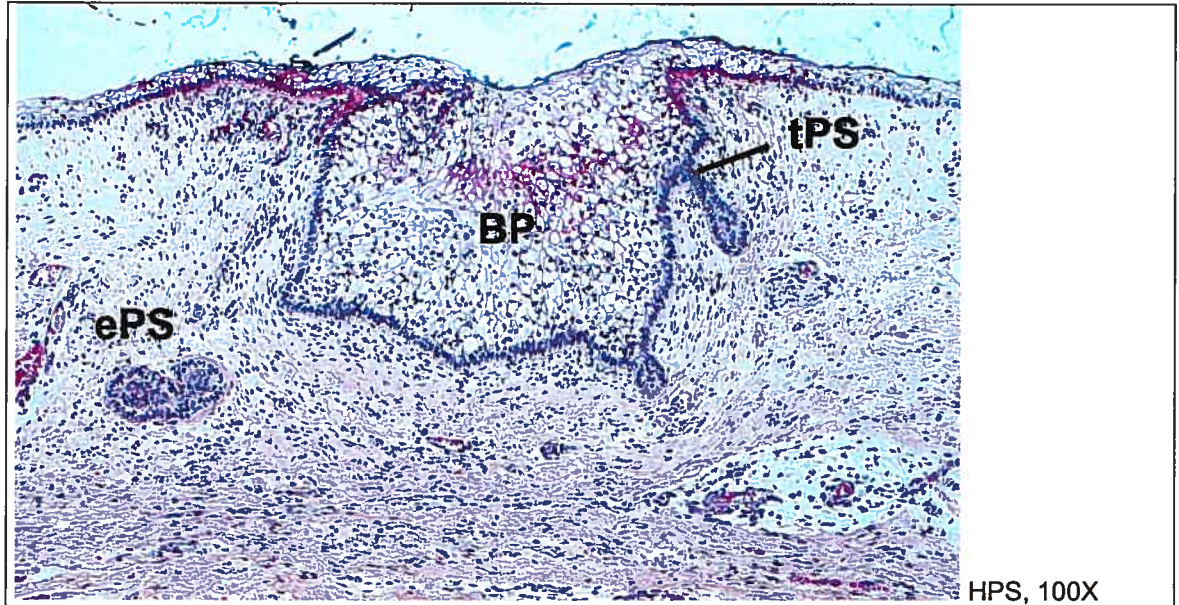
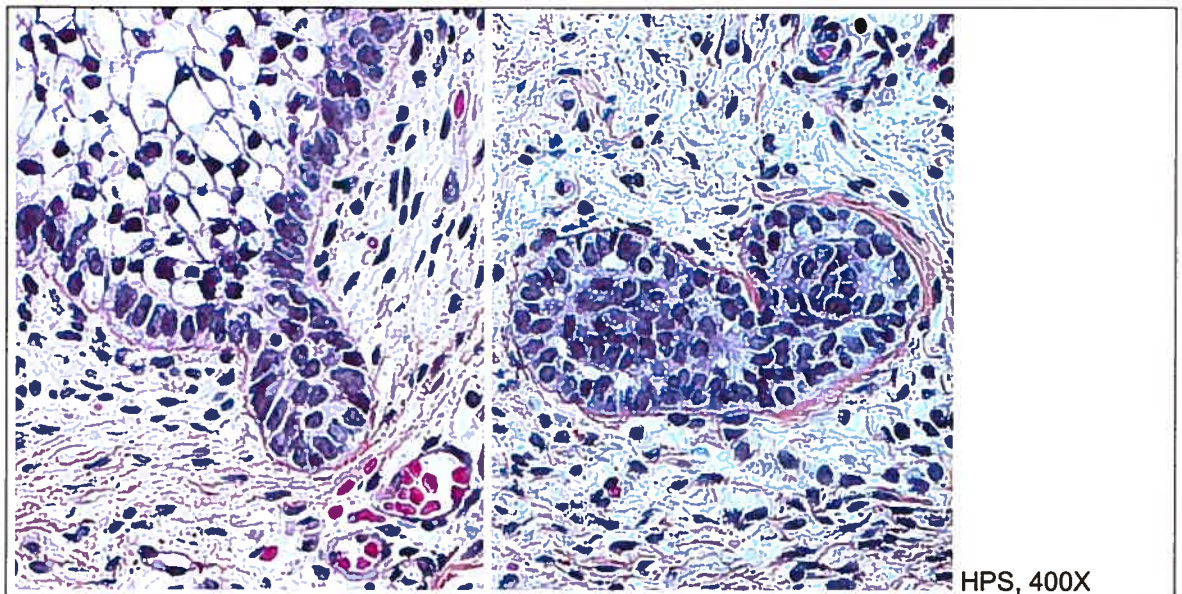


Illustration du primordium avec identification de ses composantes : bourgeon primaire (BP), tige de projection secondaire (tPS) et extrémité de projection secondaire (ePS). Les coupes présentant des projections secondaires (PS) plus complètes ont été réservées pour l'IHC et sont illustrées plus loin.

Figure 8 Populations cellulaires du bourgeon primaire et des projections secondaires du sein foetal à 21 semaines (microscopie optique)



Illustration, à plus fort grossissement, d'une portion de tPS (à gauche) et d'une ePS (à droite) du primordium présenté à la Figure 7.

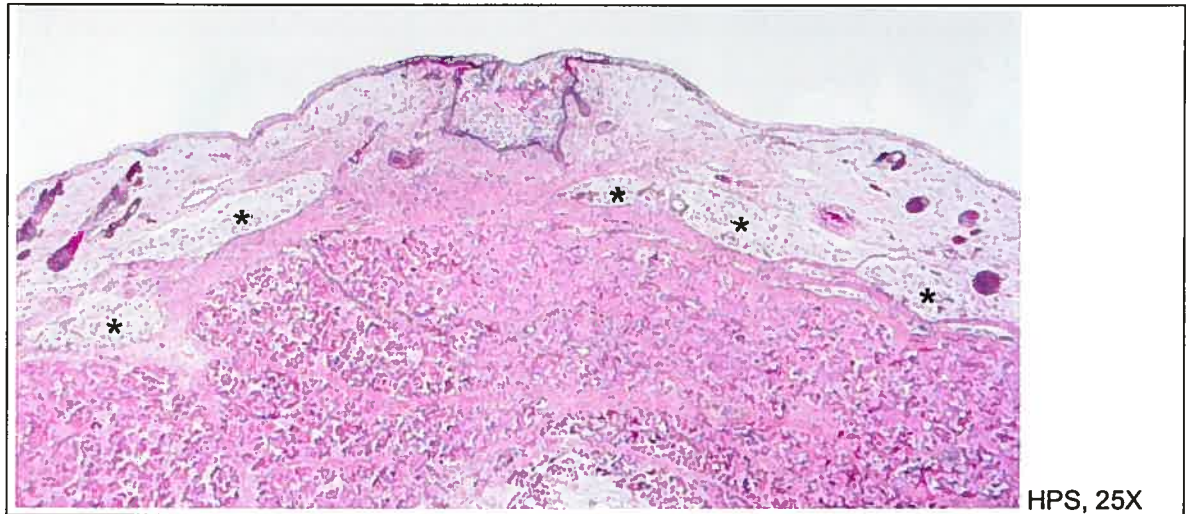
De taille moyenne, les cellules centrales des tPS sont fusiformes et orientées parallèlement à l'axe de ces structures; elles forment un cordon cellulaire unique ou double, parfois interrompu par de petites lacunes irrégulières. Elles présentent des noyaux ovales de taille et de densité moyennes, ainsi qu'un cytoplasme modérément abondant (ratio nucléoplasmique intermédiaire). Les cellules basales des tPS, plus petites et cubiques, forment une monocouche serrée. Leurs petits noyaux ovales, plus denses que ceux des cellules centrales, sont orientés perpendiculairement à la lame basale - d'où l'aspect en palissade.

Dans les ePS, les cellules centrales forment des agrégats plutôt denses; leur taille et leur forme sont donc difficiles à évaluer. Leurs noyaux sont de forme et d'orientation variables. Des lacunes séparent parfois ces regroupements cellulaires centraux des cellules basales sous-jacentes. Les cellules basales des ePS, de taille moyenne et de forme plus ou moins cubique, forment une assise basale peu régulière; elles sont disposées en monocouche grossière (nombreuses superpositions). Leur orientation est souvent mal définie. La limite entre les compartiments central et basal des ePS est parfois floue.

Mésenchyme de soutien

Dans les spécimens de moins de 20 semaines, le mésenchyme de la région mammaire présente au moins deux zones distinctes, disposées de manière concentrique. La lame basale des BP repose sur un mésenchyme de soutien peu abondant, très cellulaire et assez peu vascularisé. Ce premier mésenchyme est entouré par une couche plus épaisse de mésenchyme moins cellulaire, richement vascularisé; celle-ci s'étend jusqu'aux muscles immatures sous-jacents, où elle adopte un aspect plus fibreux. Dans les spécimens de plus de 20 semaines, la première zone est à peine élargie (mésenchyme très cellulaire, inégalement vascularisé); elle suit la lame basale des BP, mais non celles des PS. Elle repose sur un anneau concentrique étroit de mésenchyme très richement vascularisé; ce mésenchyme est lui-même entouré d'un anneau concentrique plus large de mésenchyme moins cellulaire et moins vasculaire. Une quatrième zone de mésenchyme, nettement plus fibreux, s'interpose entre l'aspect basal de la couche précédente et le muscle en développement. Les tPS traversent les trois premières zones de mésenchyme, les ePS ramifiées se situant dans la quatrième. Le mésenchyme de soutien est normalement dénué de follicules pileux et d'îlots graisseux immatures; tel qu'illustré à la Figure 9, il contraste singulièrement avec le mésenchyme sous-cutané environnant.

Figure 9 Mésoenchyme de soutien mammaire humain à 21 semaines de gestation (microscopie optique)



Coupe sur paraffine des abords d'un bourgeon primaire; la région mammaire est située en haut, au centre. Le mésoenchyme de soutien mammaire est normalement dénué de poils (structures foncées dans l'épiderme immature adjacent) et d'îlots graisseux (astérisques dans le derme profond adjacent).

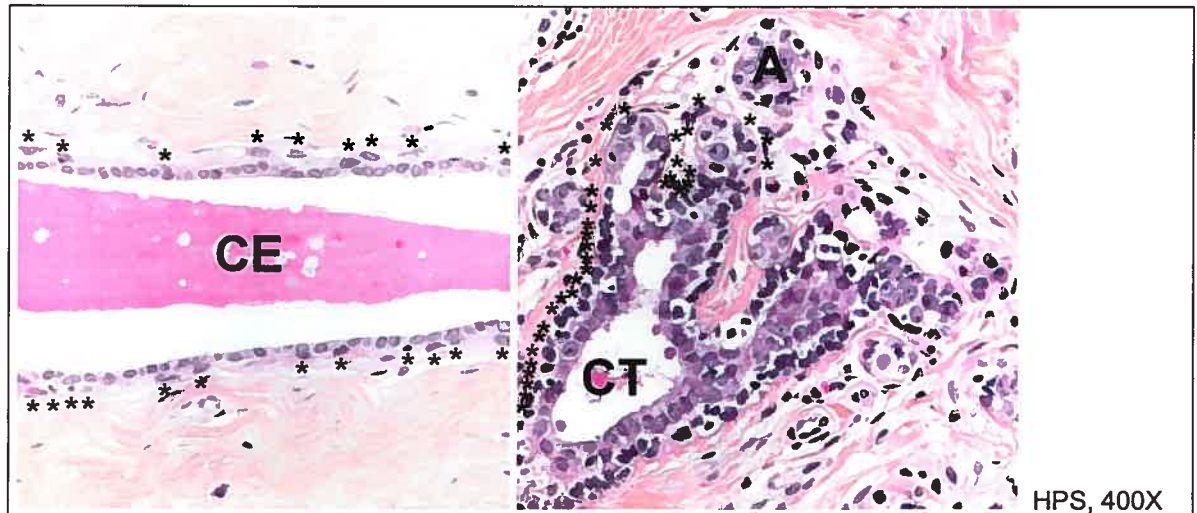
Sein adulte normal au repos

Nos observations de MO correspondent aux diagnostics posés pour ces échantillons. Sur les coupes colorées à l'HPS et à l'H&E, l'épithélium mammaire des CE de gros calibre est mince et clairement bi-stratifié; sous une couche unique et continue de CLUM cubiques et claires, des petites CMEM très aplaties et foncées forment une mono-couche d'aspect discontinu. Les CLUM et les CMEM sont plus volumineuses et plus souvent superposées dans les CE de plus faible calibre; les CMEM plus arrondies de ces canaux repoussent souvent la lame basale sous-jacente vers le stroma, d'où l'aspect festonné de petits CE coupés transversalement. La majorité des CE possèdent une lame basale continue d'épaisseur intermédiaire. Le stroma extra-lobulaire environnant est typiquement paucicellulaire, richement collagénisé, rarement oedémateux et généralement dépourvu d'infiltrats inflammatoires. Des filets de stroma plus cellulaire, pauvre en collagène, ajouré et enrichi en capillaires s'interposent parfois entre la lame basale de CE et le stroma extra-lobulaire (position «péri-canalair»).

Plutôt uniformes dans les CE, les attributs morphologiques des CLUM et des CMEM sont très hétérogènes au niveau des TDLU. Les CMEM lobulaires, en particulier, présentent des variations inter-spécimens, intra-spécimen et même intra-TDLU de taille, de forme, d'orientation cellulaire, d'affinités tinctoriales et de degré de vacuolisation

cytoplasmique. La Figure 10 permet d'apprécier la variabilité morphologique des CMEM d'un TDLU dans un spécimen représentatif de la phase menstruelle du cycle mammaire (cas N1).

Figure 10 Variabilité morphologique des cellules myoépithéliales du sein adulte normal au repos (microscopie optique)



À gauche : couche difficilement perceptible de CMEM aplaties (vis-à-vis des astérisques) dans un CE de grand diamètre rempli de sécrétions. À droite : CMEM présentant des divers degrés de vacuolisation et des orientations variables dans un TDLU (astérisques vis-à-vis des CMEM d'une portion seulement du TDLU, pour fins de clarté). Ce TDLU revêt des attributs typiques de la phase menstruelle du cycle mammaire : une vacuolisation inégale des CMEM, l'œdème atténué du stroma intra-lobulaire, une distinction CMEM/CLUM impossible dans certains éléments glandulaires sans lumières et une activité sécrétoire au ralenti.

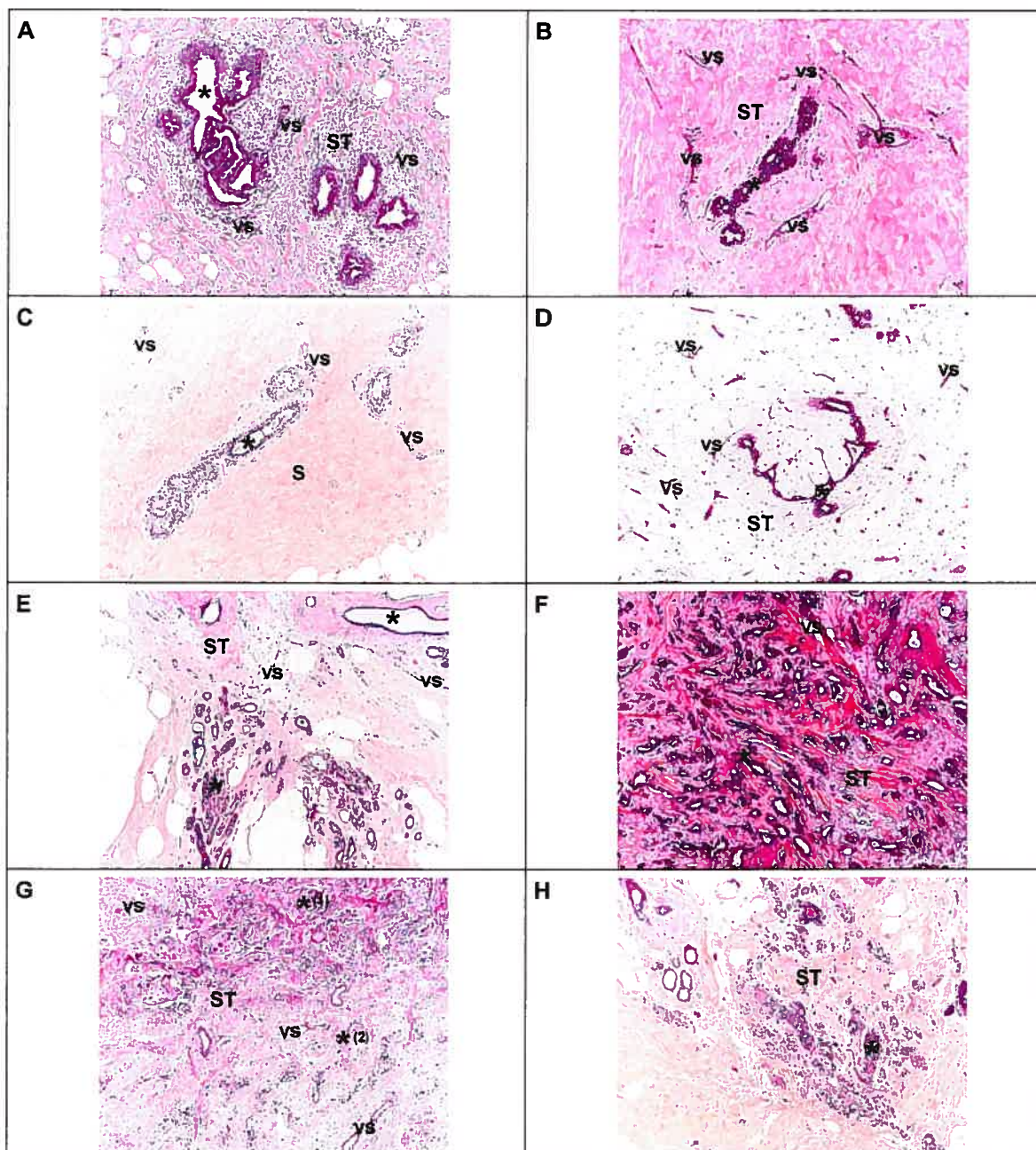
Dans les TDLU, la lame basale mammaire et le stroma environnant montrent des variations morphologiques importantes; la distinction CLUM/CMEM, aisée dans les CE, s'y avère souvent impossible – en particulier dans les TDLU d'échantillons obtenus en phase folliculaire précoce. En MO, l'aspect du parenchyme mammaire adulte normal au repos varie en fonction des phases du cycle mammaire mais très peu en fonction de l'âge des patientes (incidence de changements fibro-kystiques légers à peine plus élevée chez les patientes plus âgées de la cohorte).

Sein pathologique

Nos observations de MO correspondent aux diagnostics posés pour ces échantillons et s'accordent avec la littérature. Une région typique de chaque spécimen est illustrée à la Figure 10.5. L'extrême variabilité de présentation des CMEM résiduelles et péri-

lésionnelles des échantillons ne permet pas de les décrire pour chacun d'entre eux. Des résultats additionnels de MO seront présentés avec les résultats d'IHC pour deux cas (cas T13 et T15, Figures 25 et 26) vu la rareté des carcinomes myoépithéliaux malins du sein.

Figure 10.5 Lésions du sein à l'étude en microscopie optique (première partie)

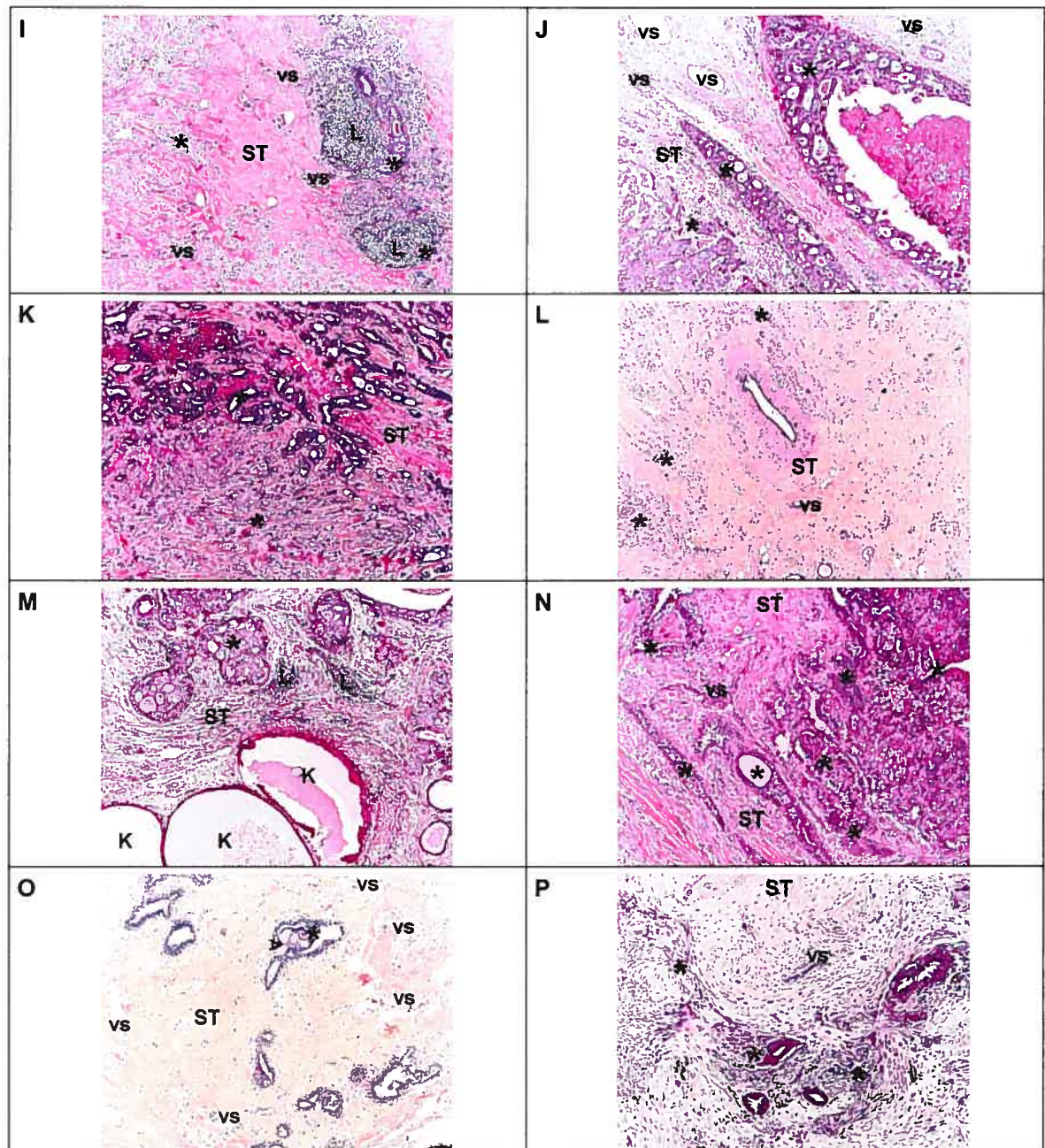


Légende: *: composante épithéliale mammaire lésée/pathologique; ST : stroma; vs, vaisseau sanguin.

A. Spécimen T1, hyperplasie mammaire bilatérale floride; B. Spécimen T2, hyperplasie mammaire bilatérale floride; C. Spécimen T3, gynécomastie juvénile; D. Spécimen T4, fibroadénome; E. Spécimen T5, cicatrice radiaire; F. Spécimen T6, carcinome canalaire infiltrant de bas grade comportant des foyers de cellules géantes (1) ou très petites (2); G. Spécimen T7, carcinome canalaire infiltrant de haut grade; H. Spécimen T8, carcinome canalaire infiltrant de bas grade. Voir la page suivante.

HPS, 100X.

Figure 10.5 Lésions du sein à l'étude en microscopie optique (deuxième partie)



Légende: *: composante épithéliale mammaire lésée/pathologique; K : kyste ; L : foyer de lymphocytes ; ST : stroma; vs, vaisseau sanguin.

I. Spécimen T9, carcinome canalaire/lobulaire infiltrant de grade intermédiaire; J. Spécimen T10, carcinome canalaire infiltrant de haut grade; K. Spécimen T11, carcinome canalaire infiltrant de grade intermédiaire; L. Spécimen T12, carcinome lobulaire infiltrant de haut grade (région d'invasion «en cible»); M. Spécimen T13, carcinome canalaire *in situ* avec changements fibro-kystiques sévères (absence de foyers confirmant le diagnostic initial d'adénomyoépithéliome); N. Spécimen T14, adénomyoépithéliome malin du sein; O. Spécimen T15, nodule bénin associé à un myoépithéliome malin du sein, avec microcalcifications et autres inclusions intra-épithéliales (têtes de flèche); P. Spécimen T16, myoépithéliome malin du sein.

HPS, 100X.

Immunohistochimie (IHC)

Nos résultats figurent sous forme de tableaux et d'illustrations aux pages suivantes, dans l'ordre mentionné ci-dessous. Nos travaux d'IHC ont permis d'apporter des modifications aux protocoles utilisés dans les départements de pathologie d'accueil (ex. adoption d'un réactif qui accroît l'uniformité des marquages d'IHC; réduction de la quantité d'anticorps primaire requise par l'introduction d'un pré-traitement). Des résultats adéquats ont été obtenus dans les contrôles appropriés pour chaque antigène ciblé. Les résultats obtenus pour nos contrôles positifs sont illustrés à l'Annexe VII. Dans le cas de figures qui s'étalent sur plus d'une page, les légendes courtes sont répétées intégralement; les mentions «Voir la page suivante» et «Suite» indiquent qu'une légende se poursuit d'une page à l'autre.

Dans le sein foetal (deuxième trimestre de gestation), les populations centrales et basales distinctes de BP, de tPS et d'ePS présentent des profils immunohistochimiques distincts; les précurseurs de la CMEM de nos échantillons de sein foetal présentent donc des variations non aléatoires, «topographiques» d'immunophénotype. Ces données immunohistochimiques sont illustrées aux Figures 11 à 13; le Tableau XIV résume les propriétés antigéniques des cellules basales de nos spécimens âgés de plus de 20 semaines seulement; les raisons de ce choix seront expliquées dans la première partie de notre discussion.

Des variations non aléatoires de l'immunophénotype myoépithélial sont également présentes dans le sein adulte normal au repos : les CMEM de CE et de TDLU, par exemple, présentent des profils systématiquement distincts. Ces données sont illustrées à la Figure 14 et résumées au Tableau XV. Nous reviendrons sur les résultats variés de la Figure 15 dans la discussion.

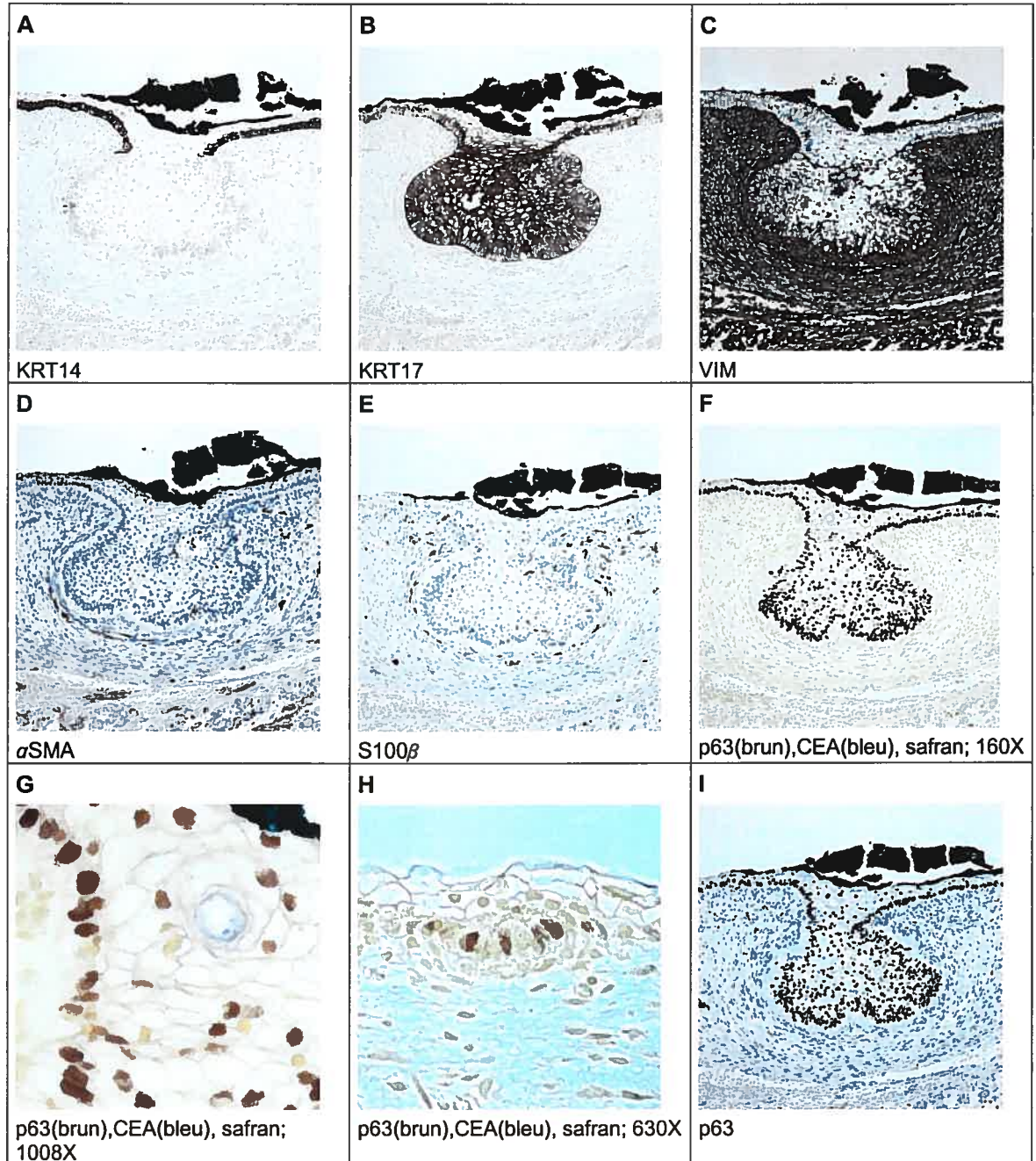
La variété et l'aspect typiquement hétérogène des lésions étudiées expliquent pourquoi ces résultats ne font pas l'objet de tableaux de synthèse²³⁰ et ne peuvent être détaillés au même titre que les résultats des deux autres volets de l'étude. Les Figures 16 à 24 présentent nos résultats pour des lésions autres que des carcinomes myoépithéliaux

«classiques». Les résultats obtenus pour les foyers carcinomateux des cas T5, T8, T9 et T11 ont été omis pour fins de concision; ils sont similaires aux résultats obtenus et illustrés pour les cas T13 (Figure 24), T6 (Figure 20; foyers non encadrés), T10/T12 (Figures 22 et 23; foyers d'infiltration) et T10 (Figure 22; foyer central, aux propriétés intermédiaires), respectivement.

Les Figures 25 et 26 présentent les données de MO et d'IHC relatives à un cas rare d'adénomyoépithéliome malin du sein et à un cas rarissime de myoépithéliome malin. Les CMEM pathologiques du premier montrent une variabilité morphologique et antigénique impressionnante.

La Figure 27 présente des résultats supplémentaires obtenus avec le CD34; nous justifierons l'importance accordée à ce marqueur mésenchymateux dans notre discussion. Enfin, quoique normalement envisagée comme un contrôle de technique d'IHC, la localisation de PAe – mais non celle de PERe - a été à l'origine de résultats additionnels; ils sont illustrés à la Figure 28.

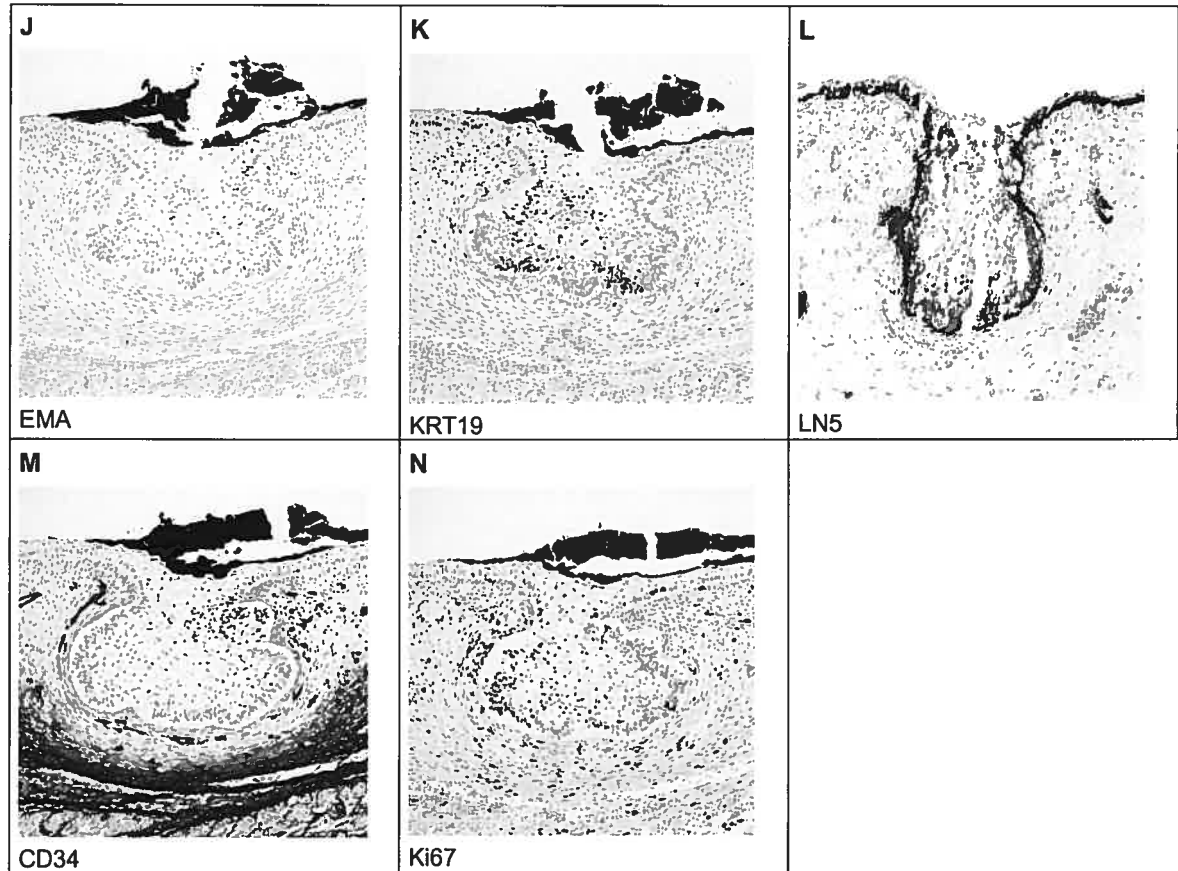
Figure 11 Immunohistochimie, "sein" foetal à 15/16 semaines de gestation (première partie)



Spécimens F1 et F2 (région mammaire foetale): **A.** la jonction entre l'épiderme et le collet du BP est associée à un changement brusque de réactivité pour la KRT14; **B.** les cellules du BP réagissent extensivement pour la KRT17; **C.** les cellules basales/supra-basales de la base du BP réagissent aussi fortement pour la VIM que les cellules du mésenchyme; **D.** les cellules du BP sont négatives pour l'αSMA; **E.** des cellules isolées du BP, aux longs prolongements grêles, sont positives pour la S100β; **F.** les noyaux des cellules du BP sont positifs pour le p63; **G.** de nombreuses cellules sont négatives pour le p63 au collet du BP; la surface de l'épiderme est positive pour le CEA; **H.** certaines cellules d'un poil naissant sont positives pour le p63; **I.** distribution identique du p63 localisé individuellement. Voir la page suivante.

Hématoxyline, 160X (à moins de précision autre).

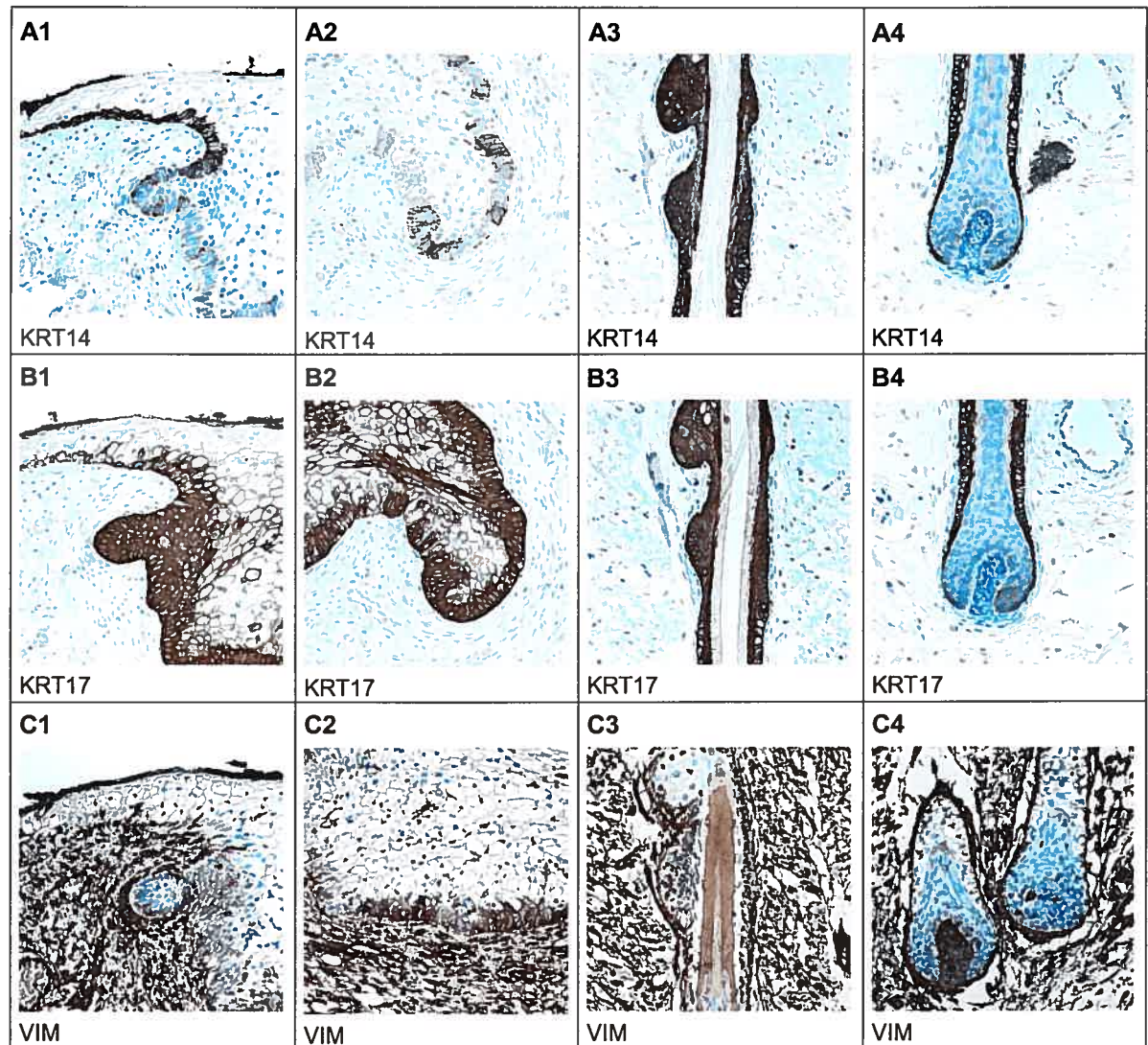
Figure 11 Immunohistochimie, "sein" foetal à 15/16 semaines de gestation (deuxième partie)



Suite. Spécimens F1 et F2 (région mammaire foetale): **J.** les assises apicales de la peau réagissent faiblement pour l'EMA; les cellules du BP sont négatives; **K.** les cellules centrales et supra-basales de la portion inférieure du BP et quelques cellules basales de la peau sont faiblement marquées pour la KRT19; **L.** la lame basale qui sous-tend la peau et celle qui entoure le BP semblent en parfaite continuité et réagissent fortement pour la LN5; une petite protubérance arrondie est associée à une accentuation du marquage le long du flanc gauche du BP; **M.** le marquage pour le CD34 met en évidence les différentes couches du mésenchyme de soutien du BP: le marquage est pratiquement confiné à des éléments vasculaires à proximité du BP (faible marquage retrouvé dans le cytoplasme de cellules stromales étroitement accolées au BP, à l'intérieur de "l'anneau vasculaire"); au-delà d'une zone de mésenchyme apparemment dépourvue de vaisseaux, une couche de mésenchyme dense s'étend jusqu'au muscle (et semble continue avec les cloisons conjonctives du muscle en développement). Cette dernière couche du mésenchyme de soutien, la plus profonde, contient de nombreux vaisseaux sanguins et fibroblastes (fibrocytes?) fortement positifs pour le CD34; **N.** un petit nombre de cellules basales du BP sont positives pour le Ki67; elles sont plus nombreuses là où la paroi du BP présente de petites protubérances.

Hématoxyline, 160X.

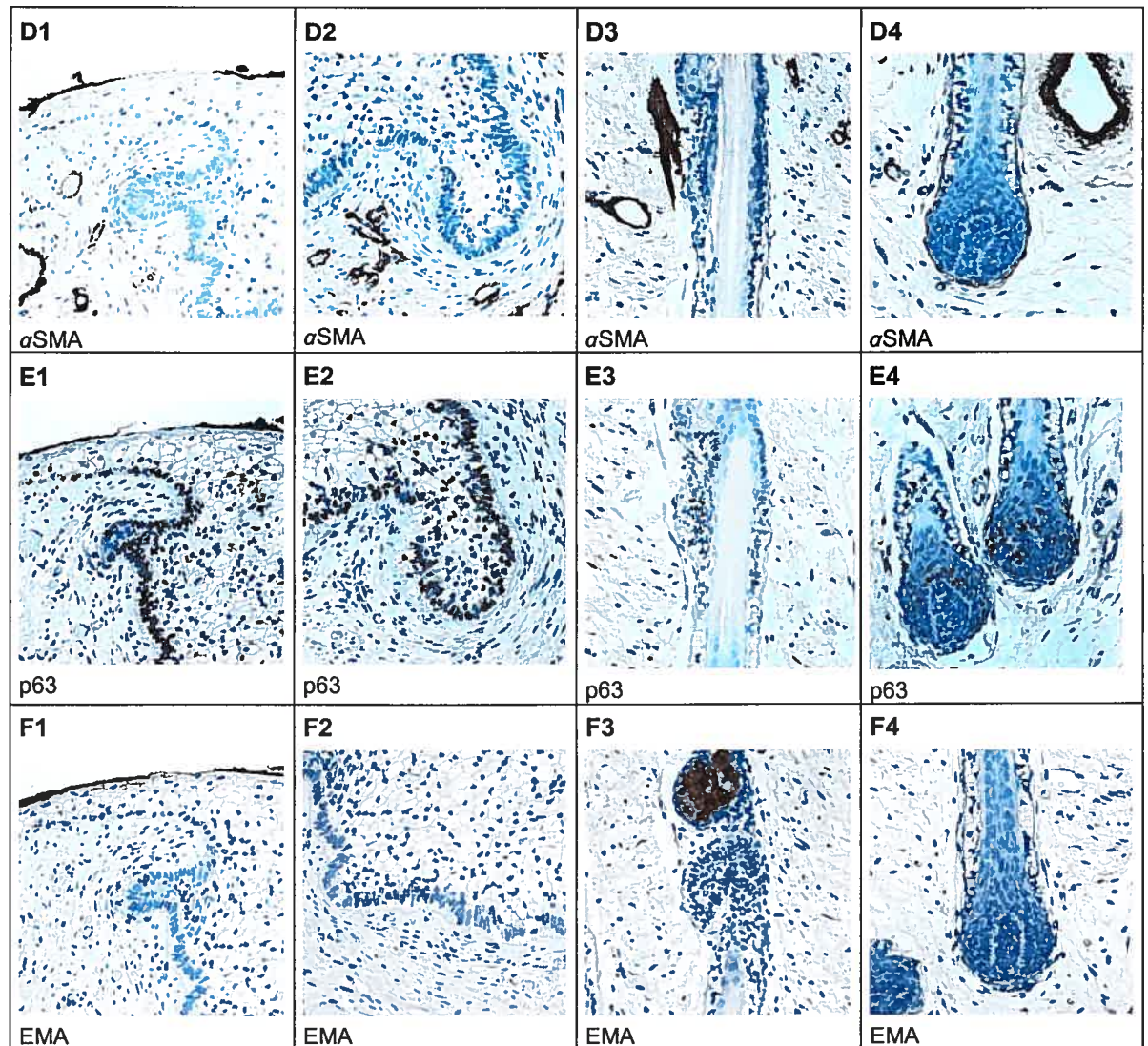
Figure 12 Immunohistochimie, sein foetal et poils à 20 semaines de gestation (première partie)



Spécimen F6 (sein et poils foetaux): résultats obtenus au niveau de la jonction peau-BP (1) qui présente une PS naissante, de la base du BP (2), du renflement pileux latéral contenant des progéniteurs multipotents de la peau et de ses annexes (3), et de l'extrémité pileuse contenant des cellules prolifératives – les cellules de la matrice (4), près de la jonction de stromas distincts (papille dermique-derme); **A.** le marquage pour la KRT14 s'estompe brusquement à la jonction peau-BP, de même qu'à la jonction entre le derme immature et la papille dermique; **B.** le marquage pour la KRT17 s'intensifie brusquement à la jonction peau-BP; il s'estompe à la jonction entre le derme immature et la papille dermique; **C.** la distribution de la VIM est similaire au niveau d'une PS naissante (de contour externe convexe) et de son mésenchyme de soutien d'une part, et au niveau de la matrice d'un poil (de contour externe concave) et de sa papille dermique d'autre part; des cellules de petites protubérances de la base du BP et du renflement contenant les progéniteurs des poils affichent un marquage nucléaire faible à modéré pour la VIM. Voir la page suivante.

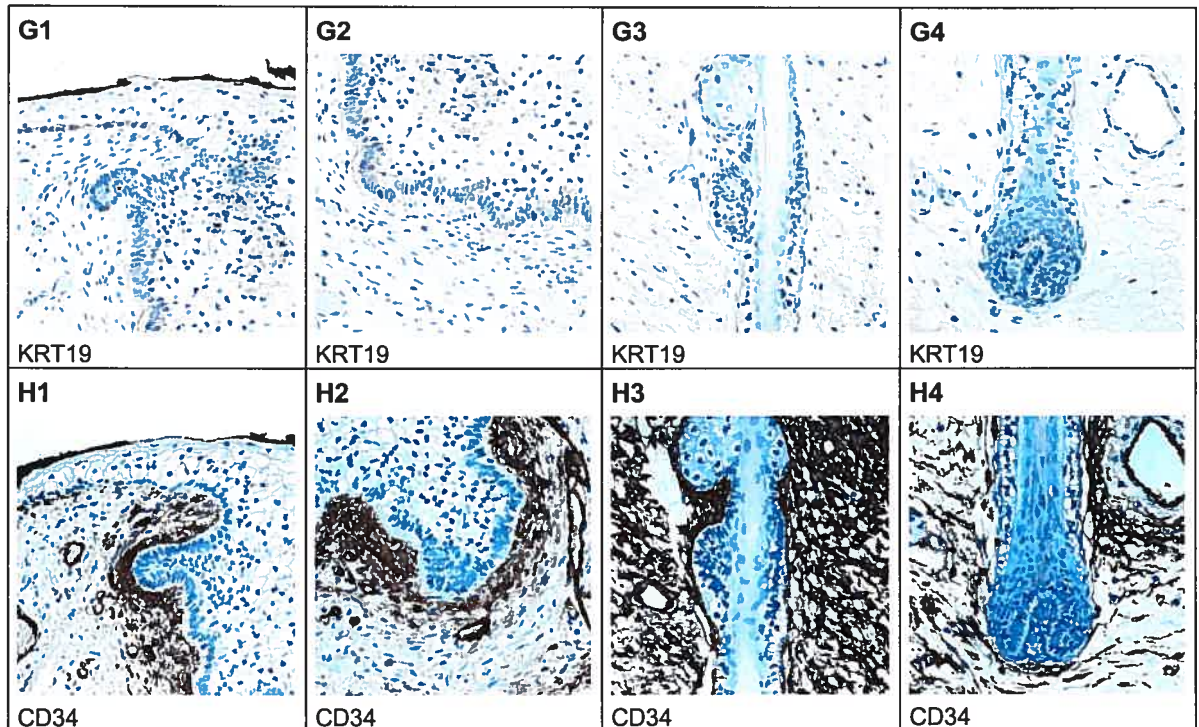
Hématoxyline, 400X.

Figure 12 Immunohistochimie, sein foetal et poils à 20 semaines de gestation (deuxième partie)



Suite. Spécimen F6 (sein et poils foetaux): résultats obtenus au niveau de la jonction peau-BP (1) qui présente une PS naissante, de la base du BP (2), du renflement pileux latéral contenant des progéniteurs multipotents de la peau et de ses annexes (3), et de l'extrémité pileuse contenant des cellules prolifératives – les cellules de la matrice (4), près de la jonction de stromas distincts (papille dermique-derme); D. les cellules du BP, de la PS naissante, du renflement de progéniteurs et de la matrice des poils sont négatives pour l' α SMA; un filet de positivité est cependant noté le long des flancs des poils; E. peu de cellules basales de la PS naissante sont positives pour le p63 (sauf une, très évidente parce qu'isolée à son extrémité) et ce, contrairement aux cellules basales de la peau et du BP; peu de cellules du renflement des progéniteurs de poil sont positives pour le p63 bien que la plupart des cellules basales le soient au niveau de la constriction sus-jacente; F. les cellules basales des quatre régions mentionnées ci-dessus sont négatives pour l'EMA (F3 : les cellules positives ne sont pas celles du renflement pileux latéral mais de la glande sébacée associée au poil) . Voir la page suivante. Hématoxyline, 400X.

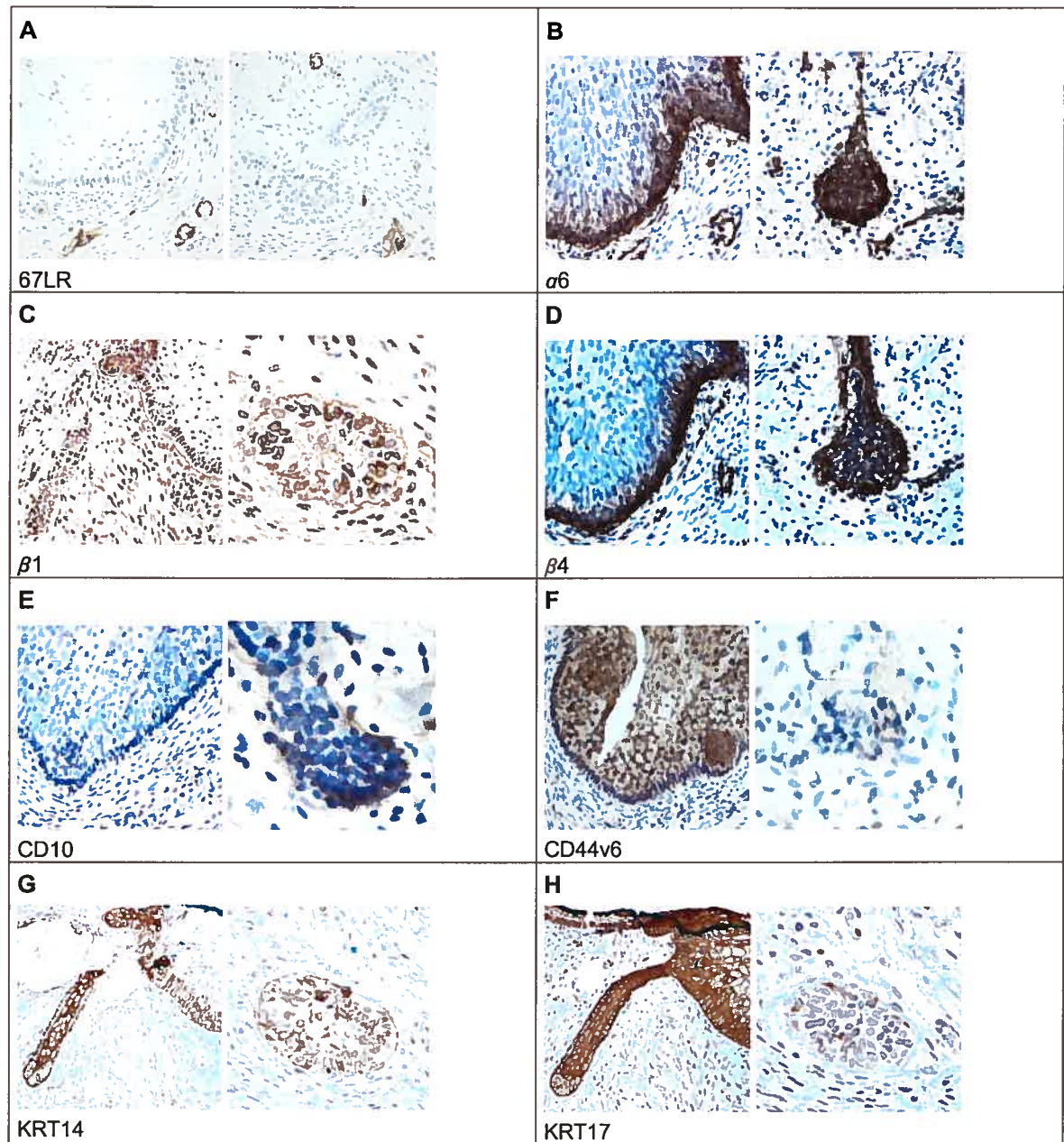
Figure 12 Immunohistochimie, sein foetal et poils à 20 semaines de gestation (troisième partie)



Suite. Spécimen F6 (sein et poils foetaux): résultats obtenus au niveau de la jonction peau-BP (1) qui présente une PS naissante, de la base du BP (2), du renflement pileux latéral contenant des progéniteurs multipotents de la peau et de ses annexes (3), et de l'extrémité pileuse contenant des cellules prolifératives – les cellules de la matrice (4), près de la jonction de stromas distincts (papille dermique-derme); G. contrairement aux cellules basales des autres structures de la région mammaire, les cellules basales de la PS naissante ne présentent pas de marquage cytoplasmique faible pour la KRT19; les cellules du renflement de progéniteurs et de la matrice des poils sont négatives pour la KRT19; H. le marquage pour le CD34 est particulièrement intense dans le mésenchyme associé à l'extrémité de la PS naissante; le mésenchyme qui chapeaute le renflement des progéniteurs de poils est très fortement positif pour le CD34; des mésenchymes modérément positifs pour le CD34 sont observés à la base du BP et sous l'extrémité des poils.

Hématoxyline, 400X.

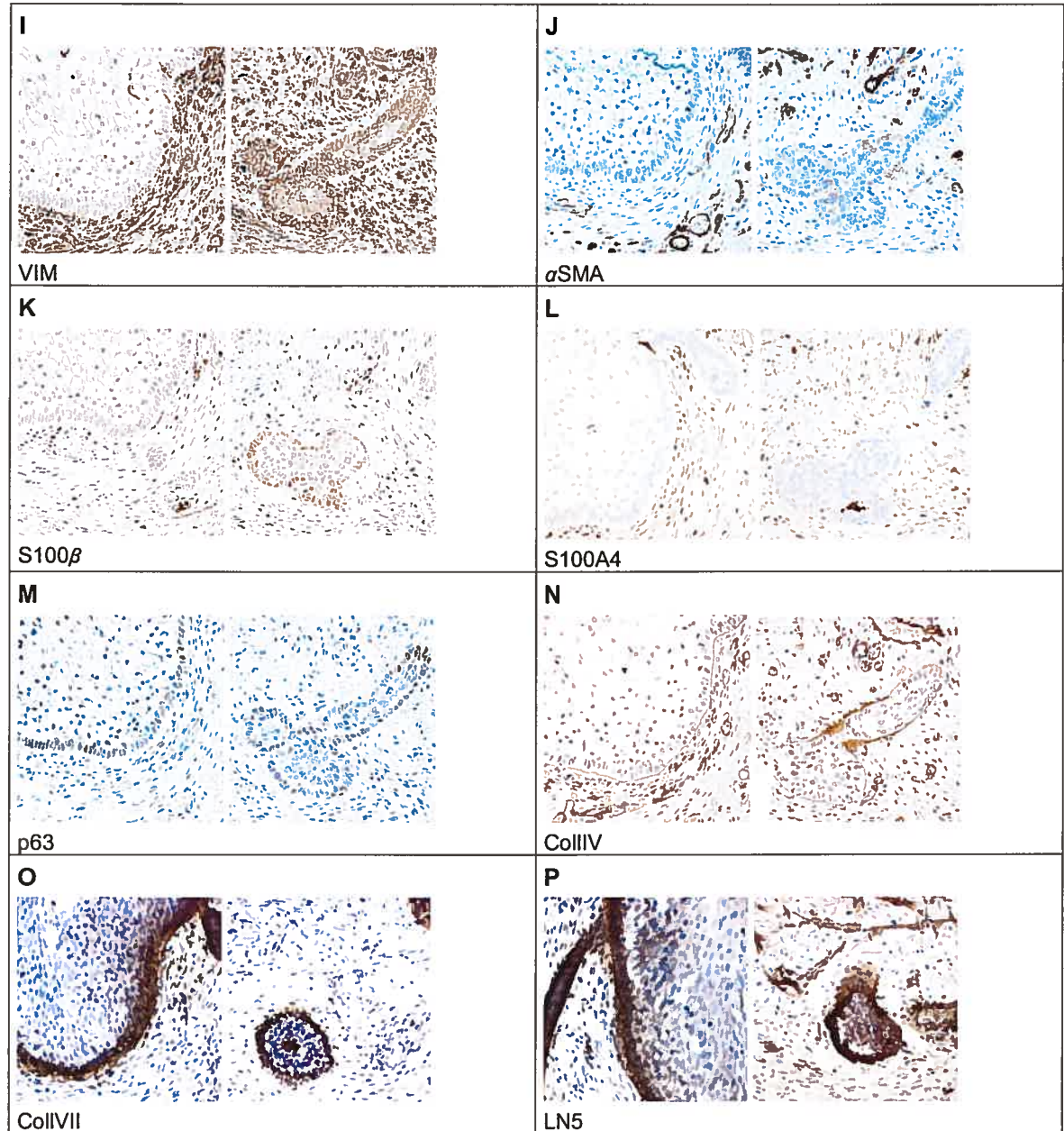
Figure 13 Immunohistochimie, sein foetal à 21/24 semaines de gestation (première partie)



Spécimens F9 et F12 (sein foetal); A.-U. à gauche: résultats obtenus dans le BP et à l'origine de tPS; A.-U. à droite: résultats obtenus dans les portions distales des tPS et dans les ePS. Ces résultats sont résumés au Tableau 14 qui suit cette figure.

Hématoxyline, 400X (à moins de précision autre).

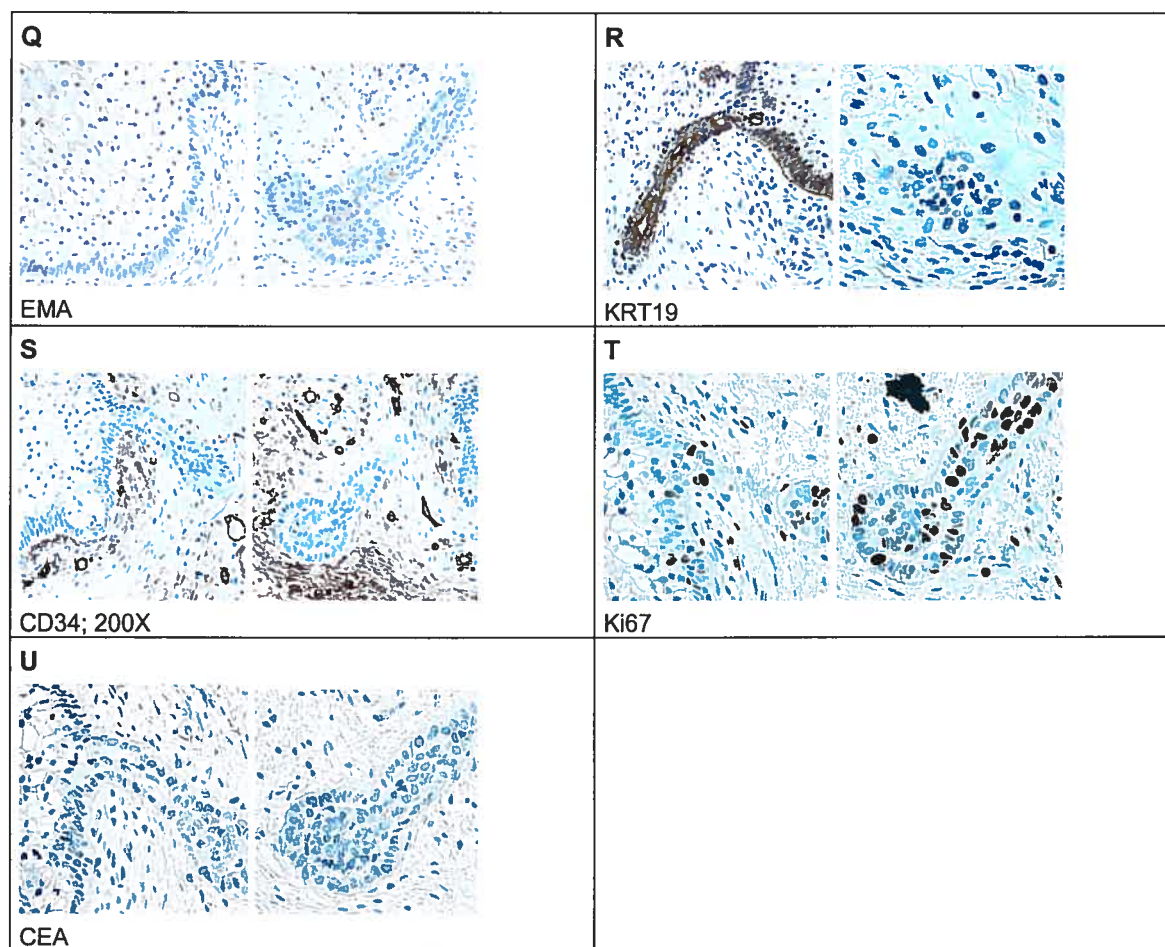
Figure 13 Immunohistochimie, sein foetal à 21/24 semaines de gestation (deuxième partie)



Spécimens F9 et F12 (sein foetal); A.-U. à gauche: résultats obtenus dans le BP et à l'origine de tPS; A.-U. à droite: résultats obtenus dans les portions distales des tPS et dans les ePS. Ces résultats sont résumés au Tableau 14 qui suit cette figure.

Hématoxyline, 400X (à moins de précision autre).

Figure 13 Immunohistochimie, sein foetal à 21/24 semaines de gestation (troisième partie)



Spécimens F9 et F12 (sein foetal); A.-U. à gauche: résultats obtenus dans le BP et à l'origine de tPS; A.-U. à droite: résultats obtenus dans les portions distales des tPS et dans les ePS. Ces résultats sont résumés au Tableau 14 qui suit cette figure.

Hématoxyline, 400X (à moins de précision autre).

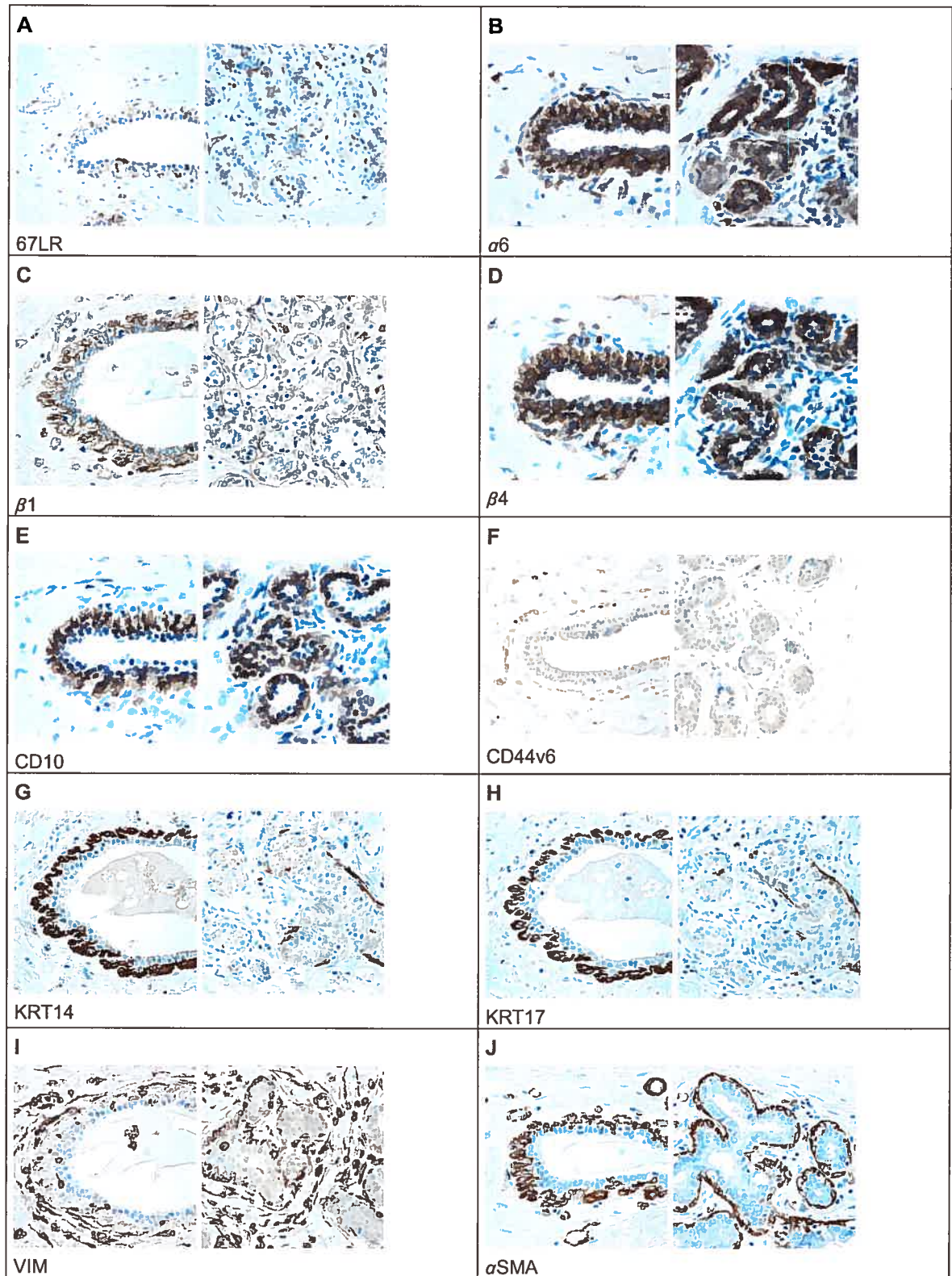
Tableau XIV Propriétés antigéniques des cellules épithéliales basales de seins foetaux entre 20 et 24 semaines de gestation

Cibles	BP		tPS		ePS	
67LR [4]	-		-		-	
α 6 [5]	+++	Mb, C	+++	M, C	+++	M, C
β 1 [2]	++	Mb	++	M, C	+	M, C
β 4 [5]	+++	Mb, C	+++	M, C	+++	M, C
CD10 [5]	-		- ou +	M, C	- ou +	M, C
CD44v6 [4]	- / +	C	- / +	C	- / +	C
KRT14 [3] ^d	++	C	+++	C, Cb	- / + / ++	C
KRT17 [3] ^d	+++	Mb, C	+++	Mb, C	- / +	C
VIM [6] ^d	- ou - / +	C	++	C	++	C
GFAP [2]	-		-		-	
α SMA [6] ^d	-		- / + ou + / ++	C	- / + ou + / ++	C
S100 β [2] ^d	-		-		(+) / ++	(C), N
S100A4 [2]	-		-		-	
p63 [3] ^d	- / + / ++	(C), N	- / +	(C), N	- / +	(C), N
ColIIV [1]	+	Mb*	++	Mb*	+	Mb*
ColIIVII [5]	+++	Mb*, Cb*	+++	Mb*, Cb*	+++	Mb*, Cb*
LN5 [6] ^d	+++	Mb, Cb	+++	Mb, Cb	++	Mb, Cb
EMA [4] ^d	-		-		-	
KRT19 [3] ^d	++	Mb, C	- / + / ++	C	- / +	C
CD34 [3] ^d	-		-		-	
Ki67 [3] ^d	- / (+++)	N	- / (+++)	N	- / +++	N
CEA [3] ^d	-		-		-	

Intensité : -, nulle; +, faible; ++, modérée; +++, forte. Distribution à l'échelle cellulaire : **b**, polarisation basale; **C**, cytoplasmique; **M**, membranaire; **N**, nucléaire. Autres : * , nature artéfactuelle envisagée; /, variation intra-structure ou intra-spécimen; **ou**, variations inter-spécimens; (), résultat observé dans moins de 15% des cellules basales; [#], nombre d'échantillons analysés.

^d Résultats dupliqués pour au moins un cas.

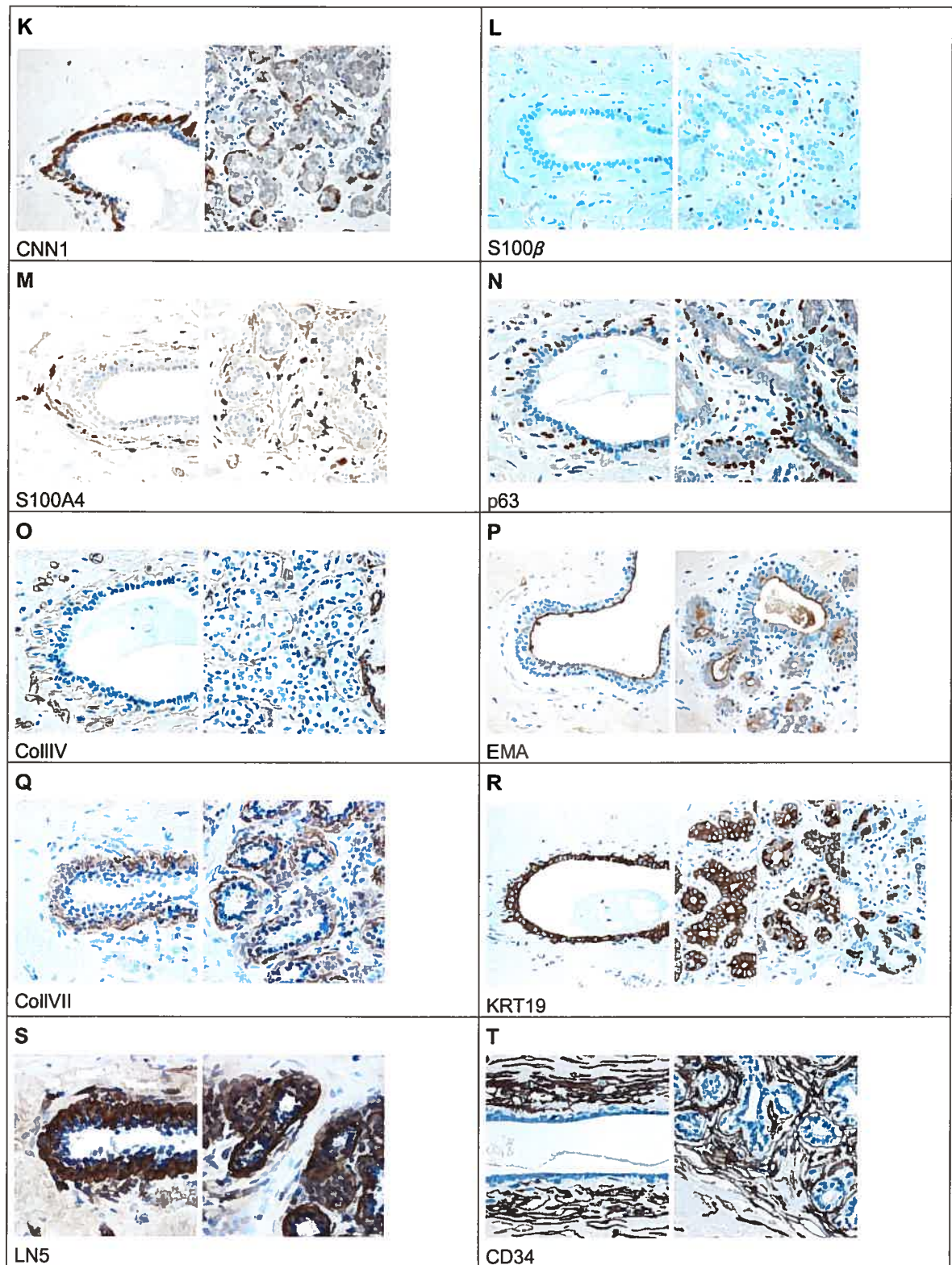
Figure 14 Caractérisation immunohistochimique de la cellule myoépithéliale dans le sein adulte normal au repos (première partie)



Spécimen N5: A.-V. résultats obtenus dans les CE (à gauche) et dans les TDLU (à droite).

Hématoxyline; 400X.

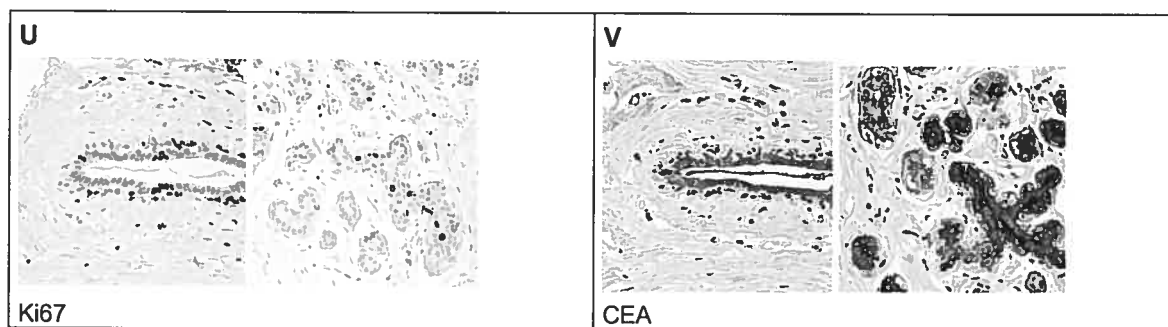
Figure 14 Caractérisation immunohistochimique de la cellule myoépithéliale dans le sein adulte normal au repos (deuxième partie)



Spécimen N5: A.-V. résultats obtenus dans les CE (à gauche) et dans les TDLU (à droite).

Hématoxyline; 400X.

Figure 14 Caractérisation immunohistochimique de la cellule myoépithéliale dans le sein adulte normal au repos (troisième partie)



Spécimen N5: A.-V. résultats obtenus dans les CE (à gauche) et dans les TDLU (à droite).

Hématoxyline; 400X.

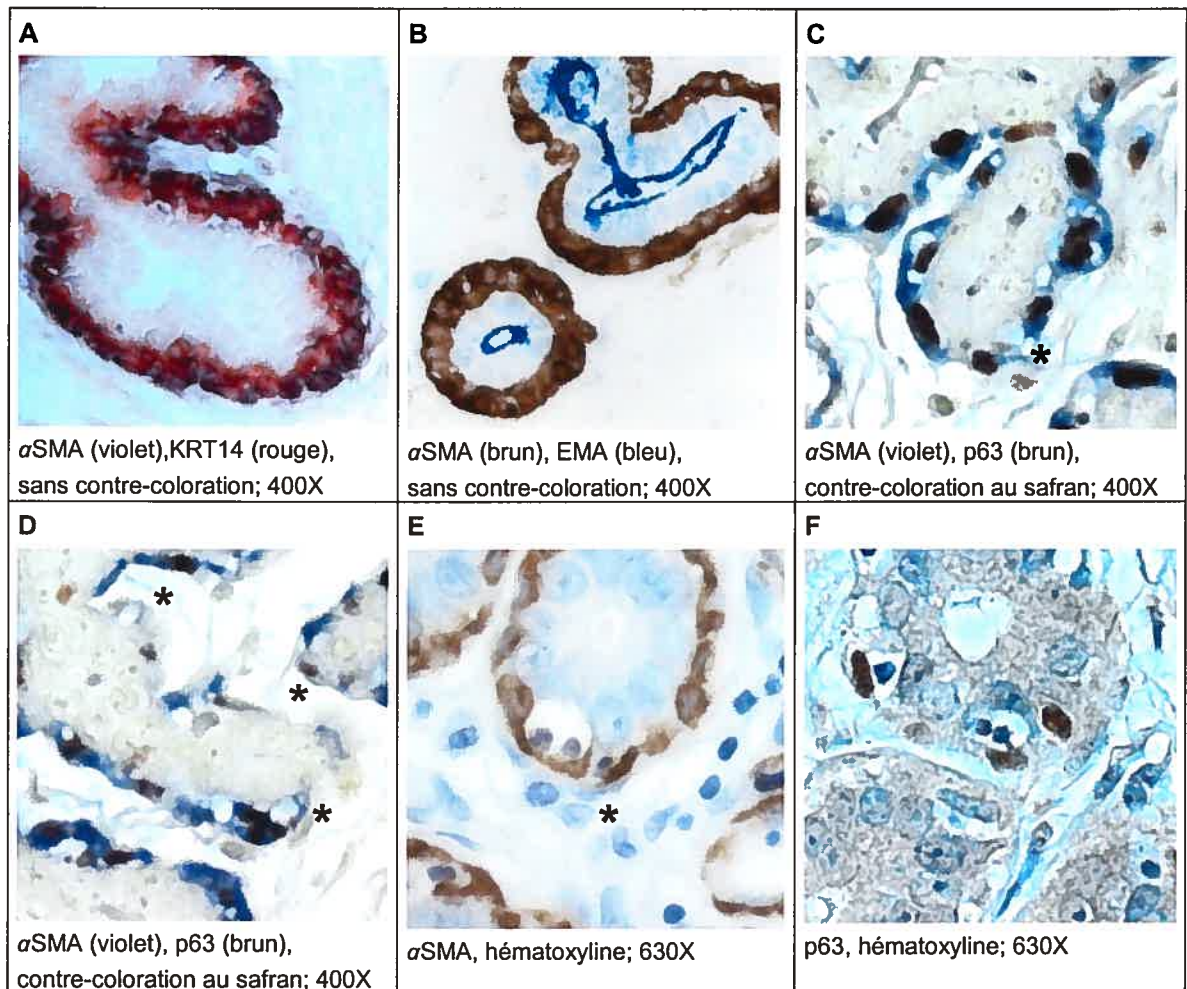
Tableau XV Propriétés antigéniques des cellules myoépithéliales dans le sein adulte normal au repos

Cibles	CE	CT de TDLU	Acini de TDLU			
67LR [7]	+ / ++	M / Mb, C	+ / ++	M / Mb, C	- / + / ++	M / Mb, C
α6 [7]	++ / +++	M / Mb, C / Cb	++ / +++	M / Mb, C / Cb	- / + / (++) / (+++)	M / Mb, C / Cb
β1 [7]	++ / +++	M / Mb, C / Cb	++ / +++	M / Mb, C / Cb	- / + / ++ / (+++)	M / Mb, C / Cb
β4 [7]	++ / +++	M / Mb, C / Cb	++ / +++	M / Mb, C / Cb	- / + / ++ / (+++)	M / Mb, C / Cb
CD10 [7]	++ / +++	Ma, Ca	++ / +++	Ma, Ca	+ / ++ / (+++)	Ma, Ca
CD44v6 [7]	- / (+)	C	- / (+)	C	- / (+)	C
KRT14 [13]	+++	C	+++	C	- / + / (++) / (+++)	C
KRT17 [13]	++ / +++	C	++ / +++	C	- / + / (++) / (+++)	C
VIM [13]	- / + / (++) / (+++)	C, Cb, N	- / + / ++ / +++	C, Cb, N	(-) / + / ++ / +++	C, Cb, N
GFAP [7]	-		-		-	
αSMA [13]	(-) / (+) / (++) / +++	C	(-) / (+) / (++) / +++	C	(-) / (+) / (++) / +++	C
CNN1 [7]	- / + / ++ / +++	C, Cb	- / + / ++ / +++	C, Cb	- / + / (++) / (+++)	C, Cb
S100β [13]	- / (+)	N	- / + / (++)	N	- / + / ++	(C), N
S100A4 [7]	- / + / (++) / (+++)	C	- / + / (++) / (+++)	C	- / + / ++ / (+++)	C
p63 [13]	- / + / ++ / +++	(C), N	++ / +++	(C), N	- / + / ++ / +++	(C), N
CollIV [7]	(-) / + / ++	Mb*, (Cb)*	- / + / ++	Mb*, (Cb)*	- / +	Mb*, (Cb)*
CollVII [7]	- / + / (++)	Mb*, Cb*	(-) / + / ++ / (+++)	Mb*, Cb*	(-) / + / ++ / (+++)	Mb*, Cb*
LN5 [7]	(-) / + / ++ / (+++)	Mb, Cb	+ / ++ / +++	Mb, Cb	(-) / + / ++ / +++	Mb, Cb
EMA [13]	- / (+)	C	- / (+)	C	- / (+) / (++) / (+++)	C
KRT19 [13]	- / (+)	C	- / (+)	C	- / (+) / (++) / (+++)	C
CD34 [13]	-		-		-	
Ki67 [3]	- / (+++)	N	- / (++) ou - / +++	N	- / (+) / (++) / (+++) ou - / +++	N
CEA [3]	-		-		-	

Intensité : -, nulle; +, faible; ++, modérée; +++, forte. Distribution cellulaire : a, polarisation apicale; b, polarisation basale; C, cytoplasmique; M, membranaire; N, nucléaire. Autres : *, nature artéfactuelle envisagée; /, variation intra-structure ou intra-spécimen; ou, variations inter-spécimens; (), résultat observé dans moins de 15% des cellules; [#], nombre de spécimens étudiés.

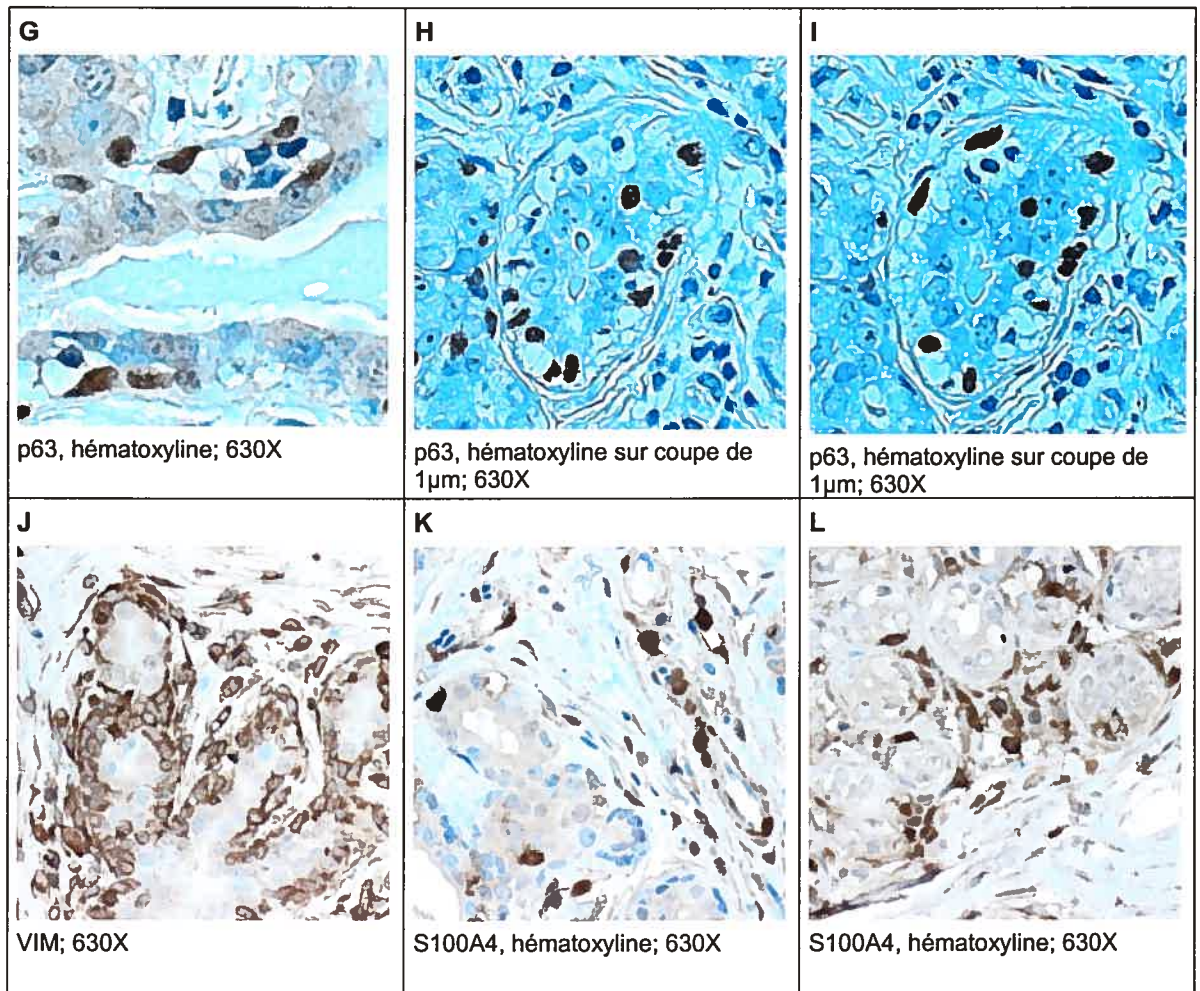
N.B. Tous les résultats ont été dupliqués pour plus d'un cas.

Figure 15 Résultats immunohistochimiques autres dans le sein adulte normal au repos (première partie)



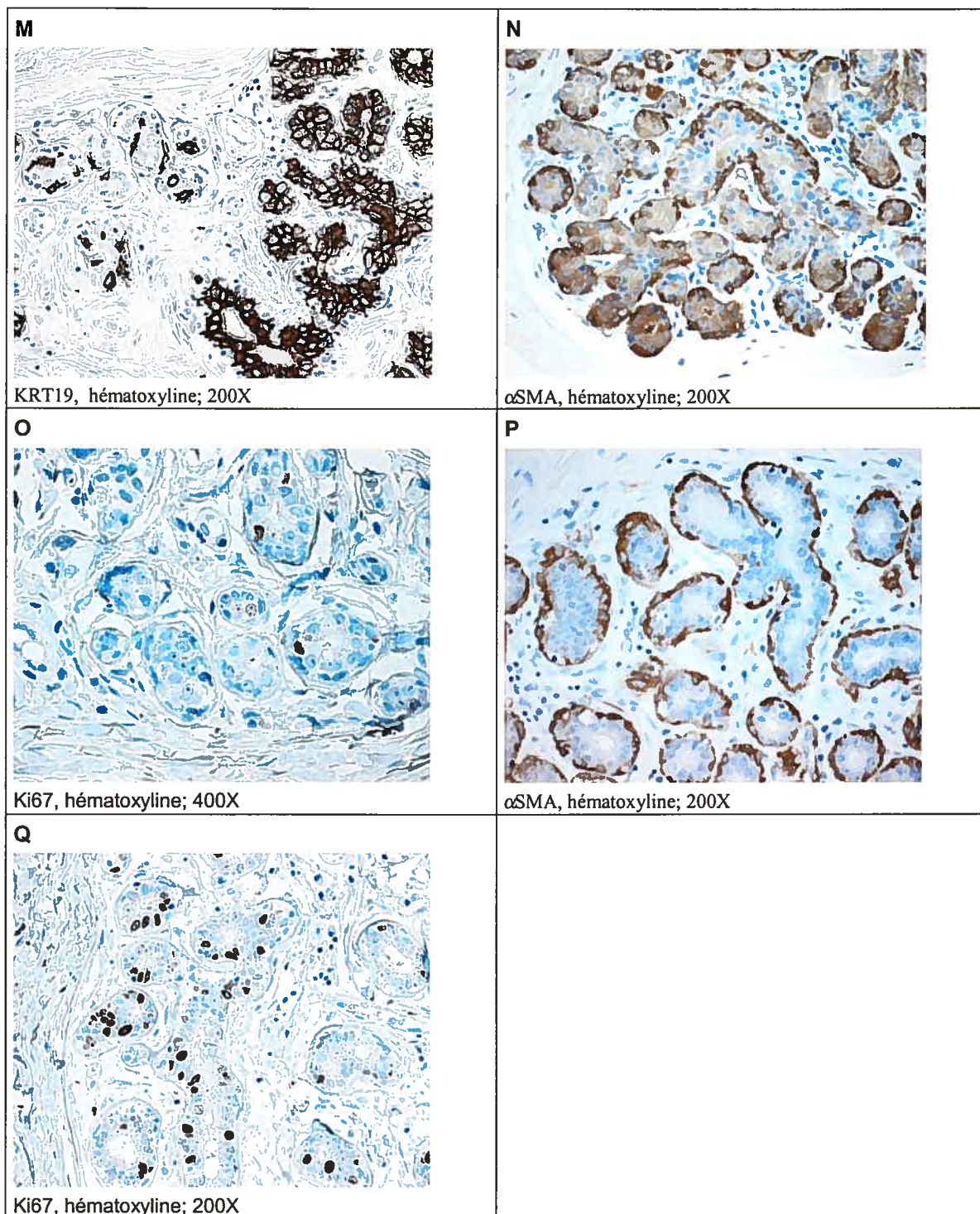
Résultats variés concernant le sein adulte normal au repos (données obtenues pour les spécimens N1, N2, N5 et N12): **A.**, **C.**, **D.** les doubles-marquages d'IHC permettent d'identifier les cellules épithéliales mammaires qui co-expriment l' α SMA et la KRT14, ou l' α SMA et le p63; **B.** un double-marquage montre les distributions mutuellement exclusives de l' α SMA et de l'EMA dans l'épithélium mammaire normal; **C.**, **D.**, **E.** la couche de CMEM présente des discontinuités dans plusieurs TDLU du sein adulte normal au repos et des cellules négatives pour l' α SMA semblent en transit entre l'épithélium et le mésenchyme via ces brèches (astérisques); **C.**, **F.**-**G.** le marquage pour le p63 met en évidence l'existence de doublets, triplets, etc., de noyaux à l'intérieur de vacuoles uniques, noyaux qui sont souvent inégalement positifs pour le p63. Des liens physiques peuvent être visualisés entre certains de ces noyaux (**F**). L'utilisation de concentrations d'anticorps anti-p63 légèrement excessives (bruit de fond important en **F.**-**H.**) suggère que la non-réactivité de certains de ces noyaux négatifs ne découle pas de l'emploi d'une dilution trop poussée de l'anticorps primaire. Voir la page suivante.

Figure 15 Résultats immunohistochimiques autres dans le sein adulte normal au repos (deuxième partie)



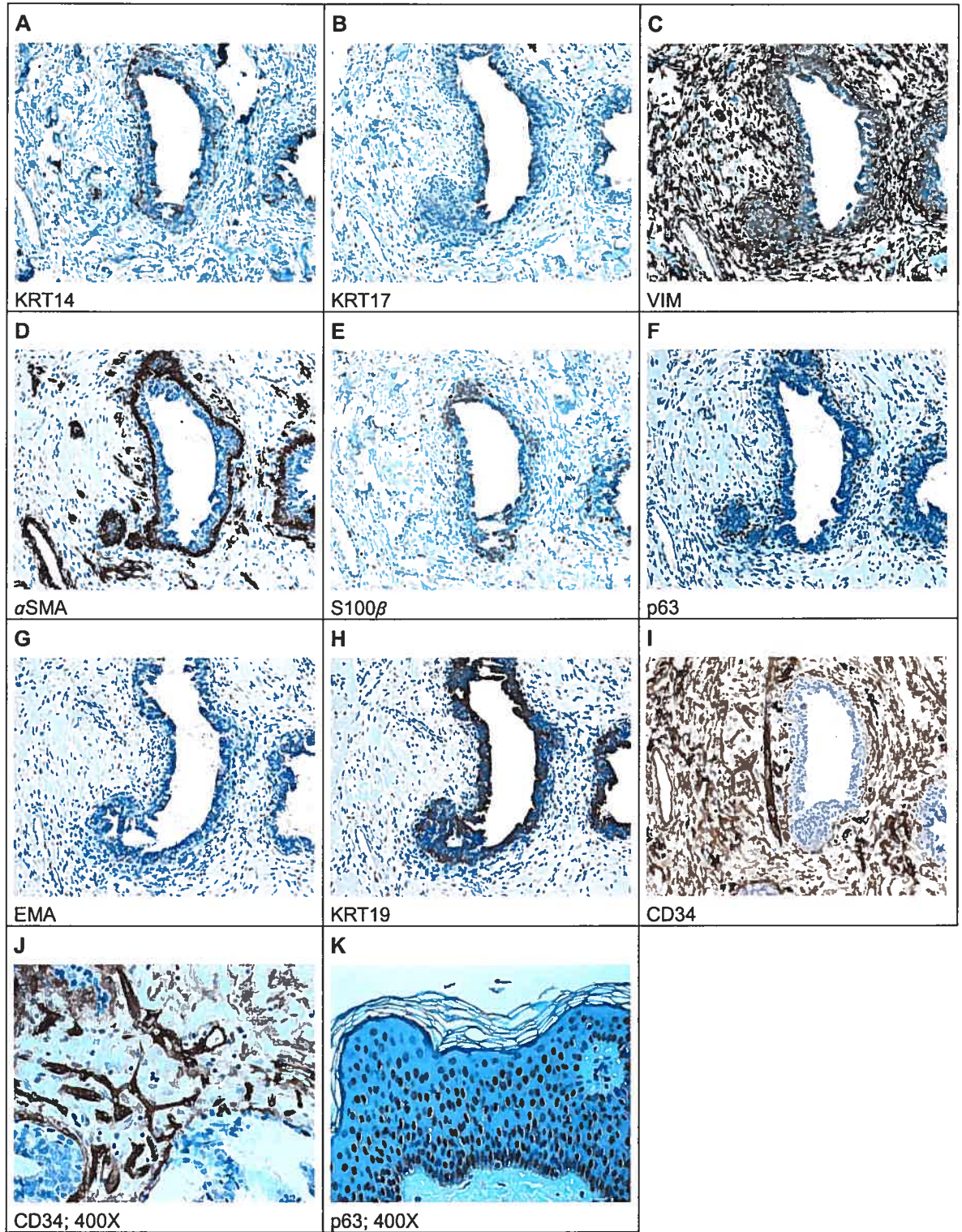
Suite. Résultats variés concernant le sein adulte normal au repos (données obtenues pour les spécimens N1, N2, N5 et N12): **H**. les noyaux ronds des cellules vacuolées, négatifs pour le p63, semblent reliés entre eux, aux membranes cellulaires et aux noyaux allongés positifs pour le p63 (habituellement retrouvés en position basale) par des filaments cytoplasmiques; **I**, **J**. l'analyse de coupes tissulaires successives de 1µm indique que la présence de multiples noyaux dans certaines cellules vacuolées du sein normal au repos n'est pas le résultat de superposition de noyaux dans des coupes trop épaisses (i.e. n'est pas artéfactuelle) ; **J**-**L**. la distinction entre CMEM normales, fibroblastes délimitants et cellules endothéliales n'est pas toujours possible dans les TDLU marqués pour la VIM et la S100A4 du sein adulte normal au repos. Voir la page suivante.

Figure 15 Résultats immunohistochimiques autres dans le sein adulte normal au repos (troisième partie)



Suite. Résultats variés concernant le sein adulte normal au repos (données obtenues pour les spécimens N1, N2, N5 et N12): **M**, des portions adjacentes de TDLU normaux réagissent très différemment pour la KRT19; **N**, **O**, résultats typiques pour l' α SMA et le Ki67 dans les portions de TDLU irrégulièrement positives pour la KRT19 (ex. à gauche, en **M**); **P**, **Q**, résultats typiques pour l' α SMA et le Ki67 dans les portions de TDLU extensivement positives pour la KRT19 (ex. à droite, en **M**).

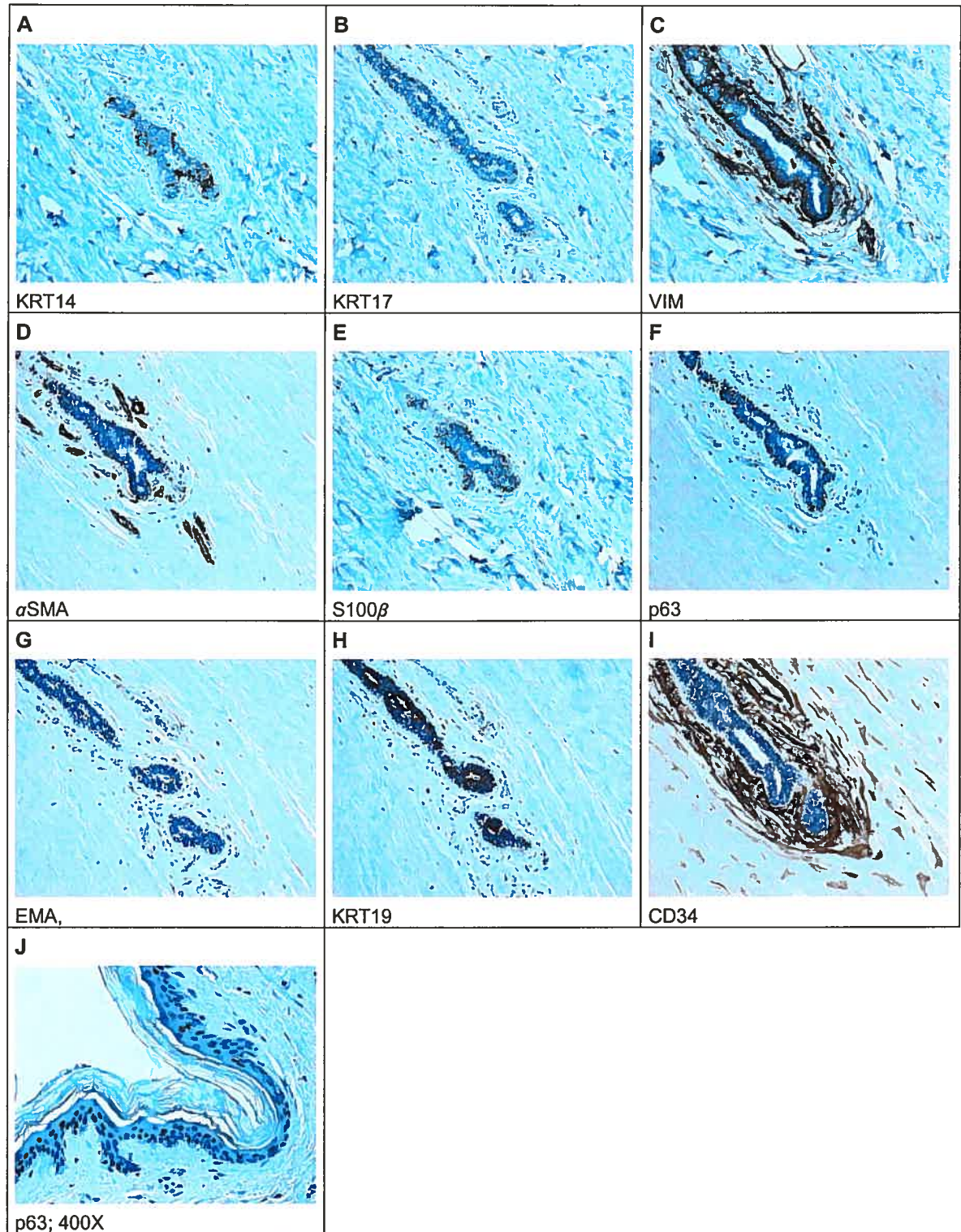
Figure 16 Immunohistochimie, hyperplasie bilatérale floride du sein



Spécimen T1: A.-I. résultats relatifs à une structure d'allure canalaire chez une patiente opérée à plusieurs reprises pour des accroissements mammaires inégaux; J. dans certains foyers, la distinction entre CMEM résiduelles, fibroblastes tumoraux et cellules de néo-vaisseaux n'était pas possible; K. la peau du sein de cette patiente était anormalement épaisse, et la plupart des kératinocytes observés étaient positifs pour le p63.

Hématoxyline, 100X (à moins d'une précision autre).

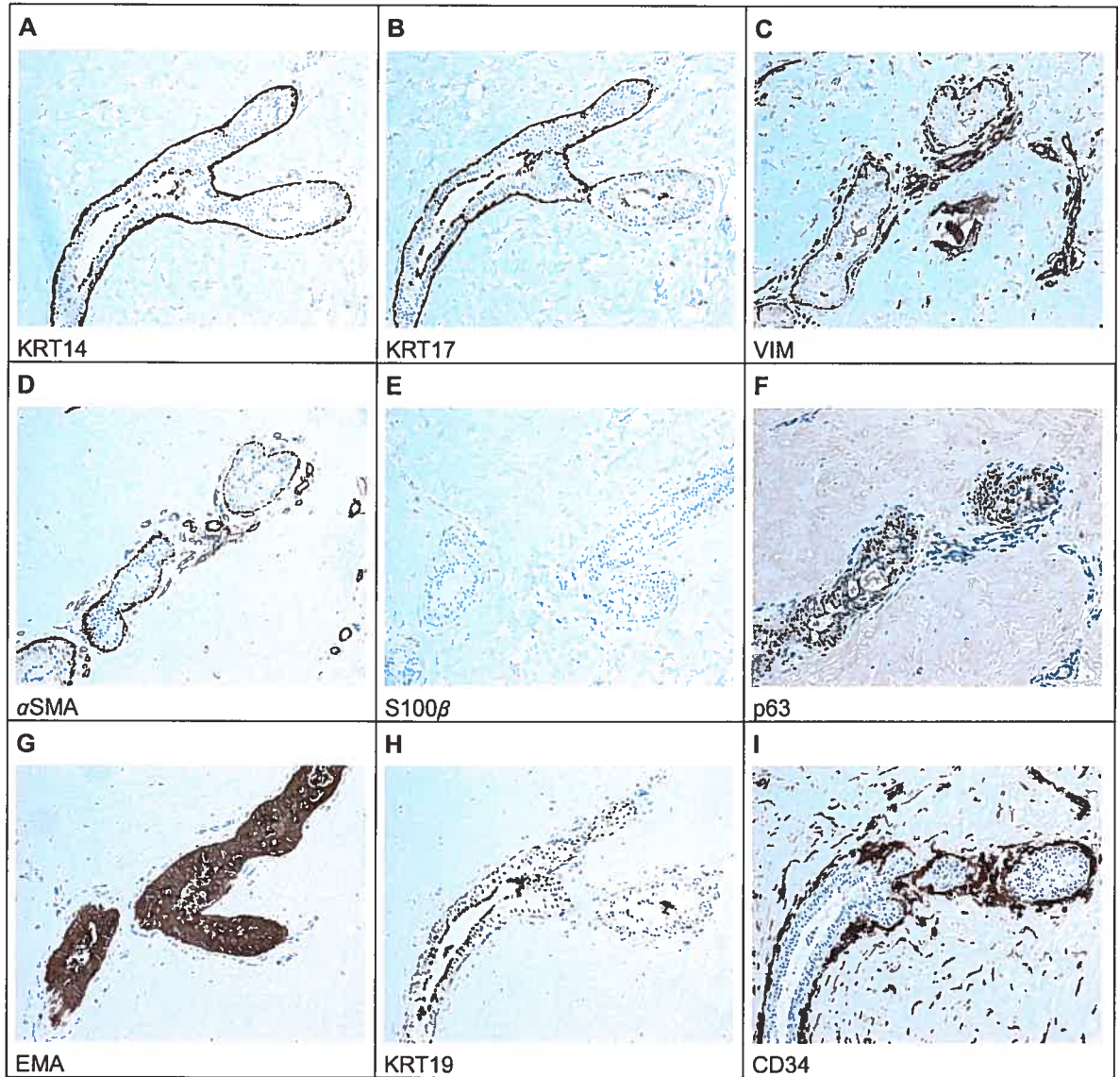
Figure 17 Immunohistochimie, hyperplasie bilatérale floride du sein



Spécimen T2: A.-I. résultats relatifs à une structure d'allure canalaire chez une patiente opérée pour un accroissement mammaire inégal; J. la peau du sein de cette patiente était anormalement mince, et de nombreux kératinocytes basaux étaient négatifs pour le p63.

Hématoxyline, 100X (à moins d'une précision autre).

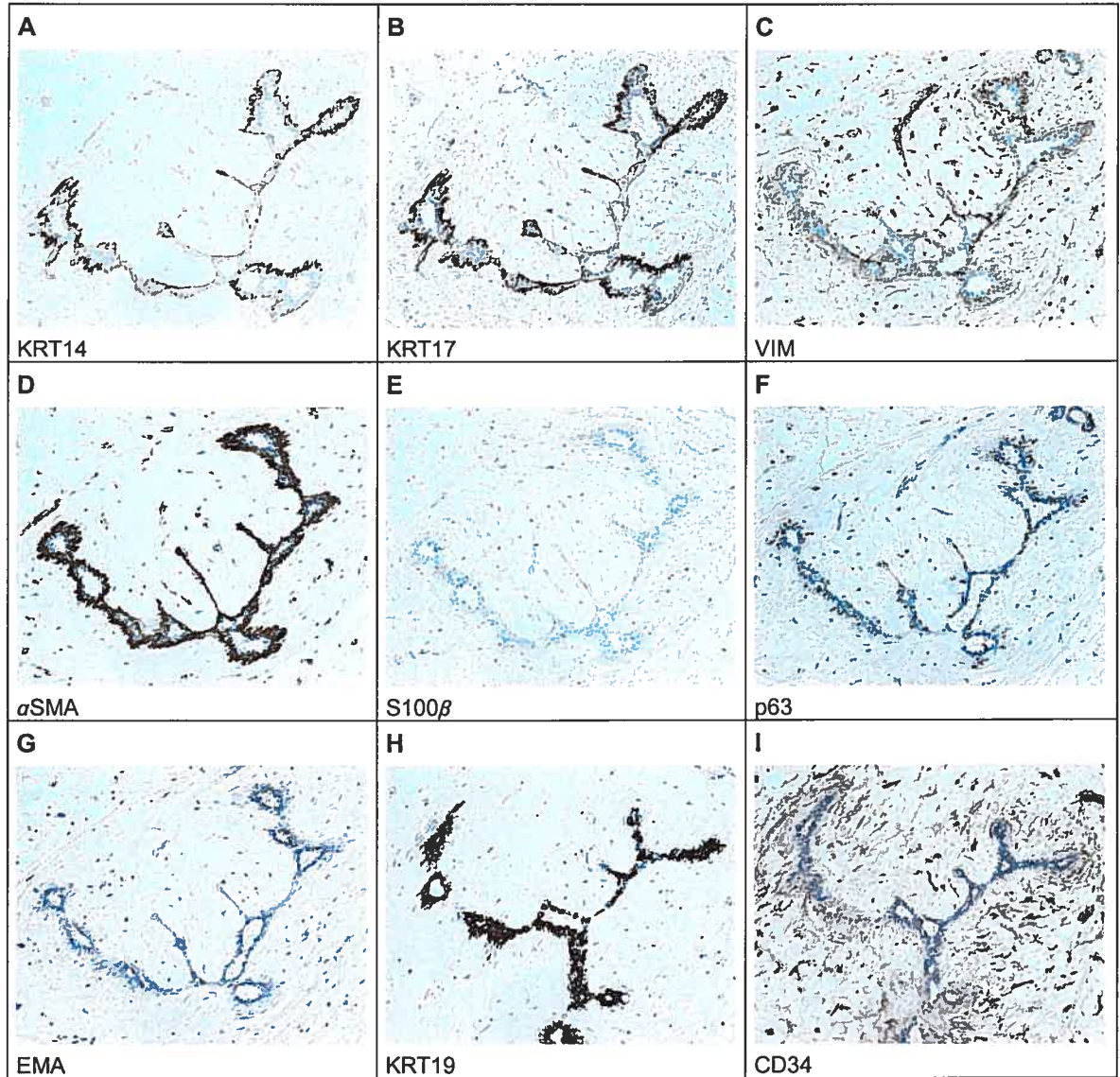
Figure 18 Immunohistochimie, gynécomastie juvénile



Spécimen T3: A.-I. résultats relatifs à une rare structure canalaire chez le seul spécimen masculin de la cohorte. Ce cas de gynécomastie présentait très peu d'éléments glandulaires; aucune structure d'allure franchement lobulaire n'a été détectée sur les coupes étudiées.

Hématoxyline, 100X .

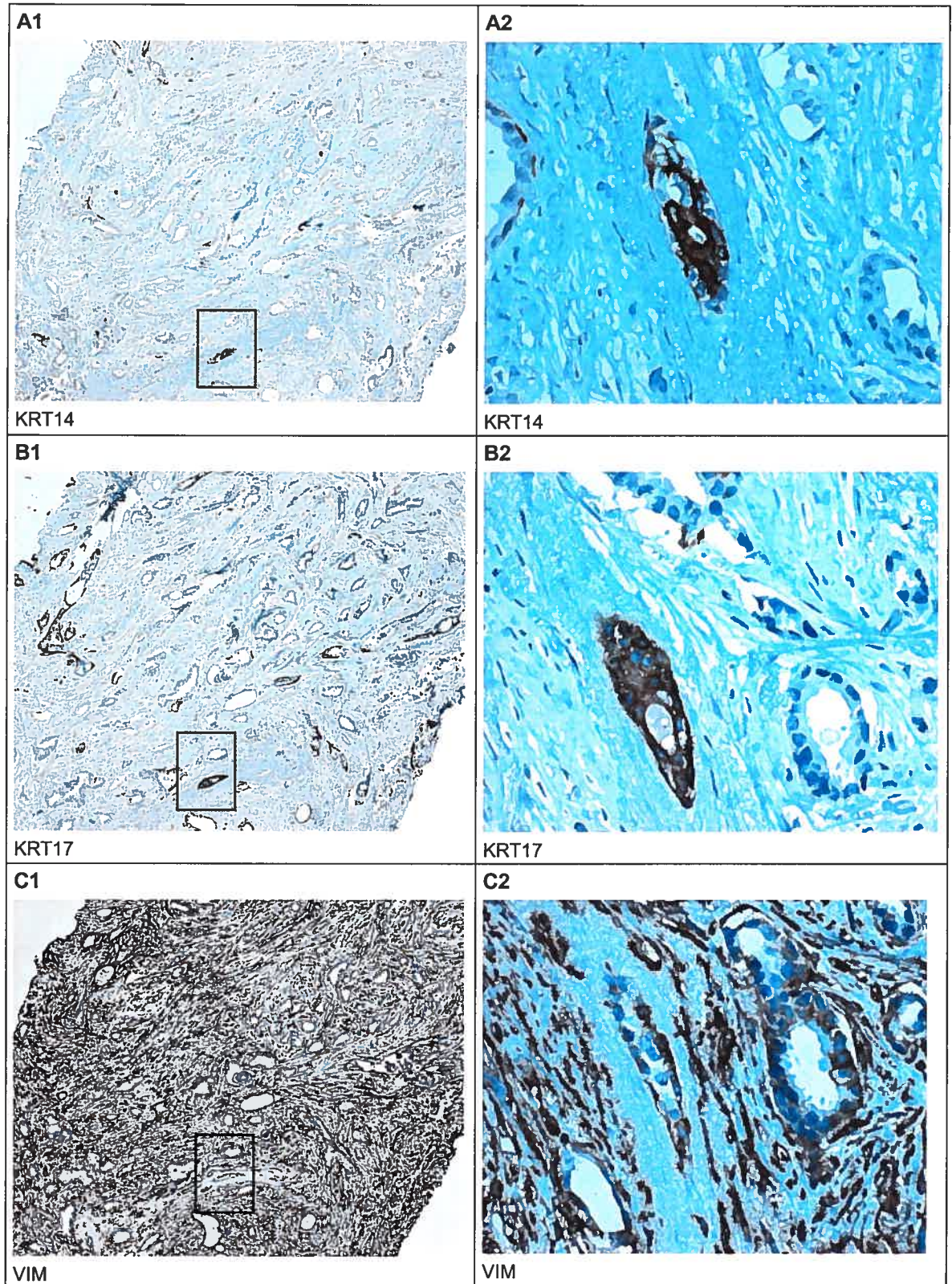
Figure 19 Immunohistochimie, fibroadénome du sein



Spécimen T4: A.-I. résultats relatifs à un foyer typique de la forme de croissance dite "intra-canaliculaire" des fibroadénomes, où la composante stromale du néoplasme semble provoquer l'affaissement de ses éléments épithéliaux.

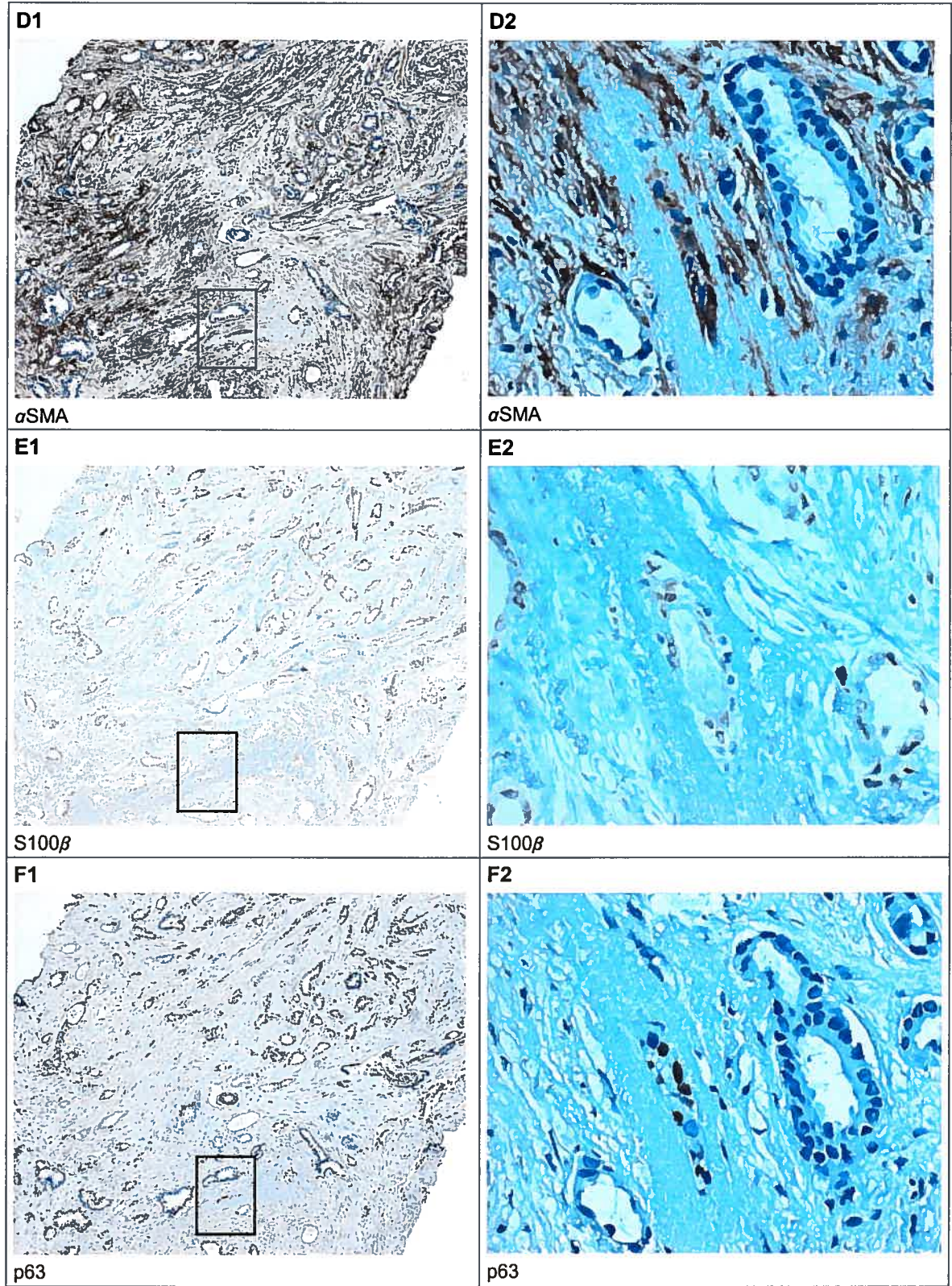
Hématoxyline, 100X.

Figure 20 Immunohistochimie, carcinome canalaire infiltrant de bas grade (première partie)



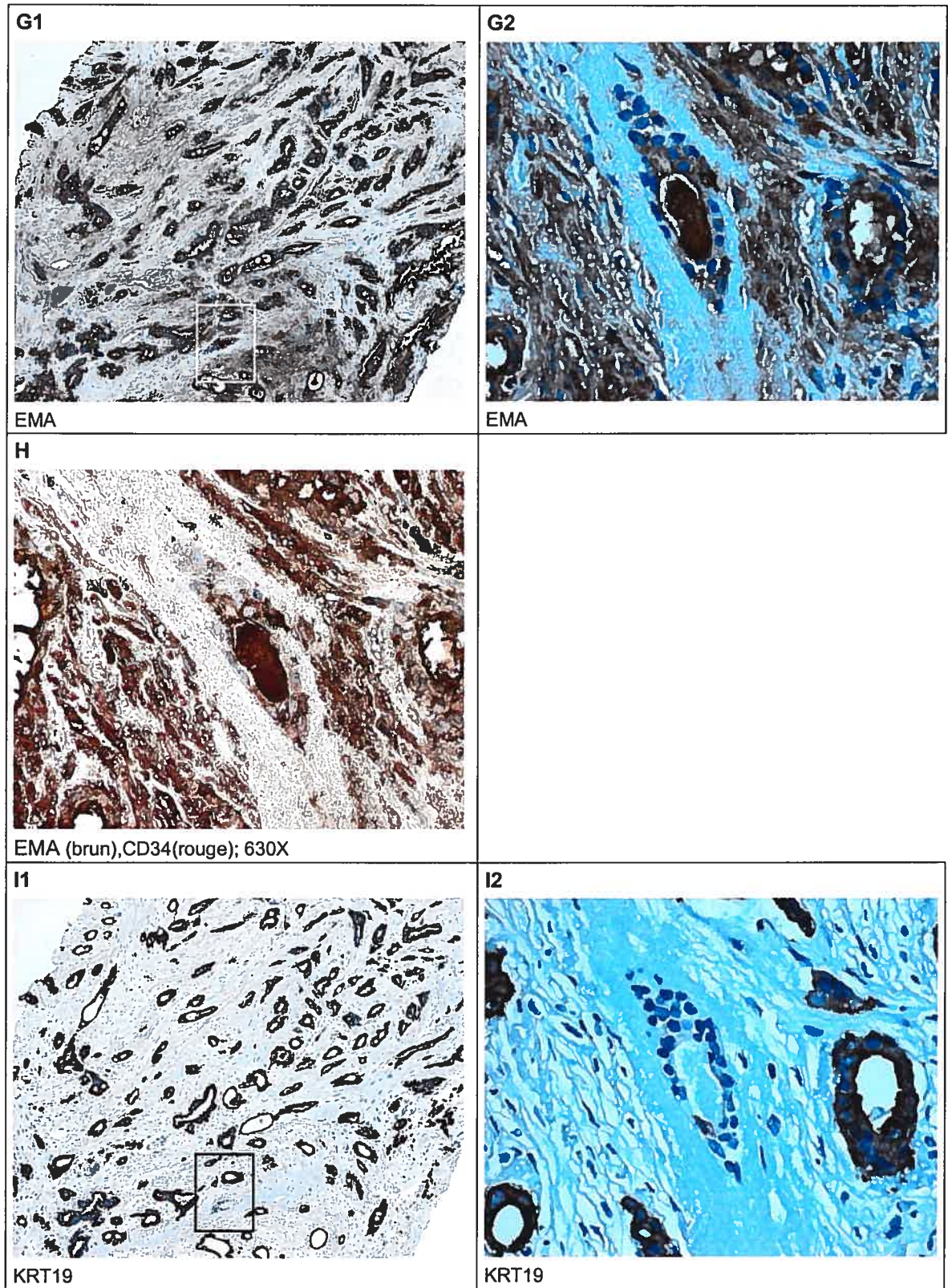
Spécimen T6: carcinome qui s'est développé chez une patiente recevant du raloxifène de façon prophylactique; A.-H. vue générale de la biopsie en 1 (hématoxyline; 100X), et agrandissement du foyer encadré, situé dans une zone de stroma distincte, en 2 (rotation horaire de 90°; hématoxyline; 630X). Les cellules de ce foyer réagissaient de manière distinctive pour la majorité des antigènes ciblés.

Figure 20 Immunohistochimie, carcinome canalaire infiltrant de bas grade (deuxième partie)



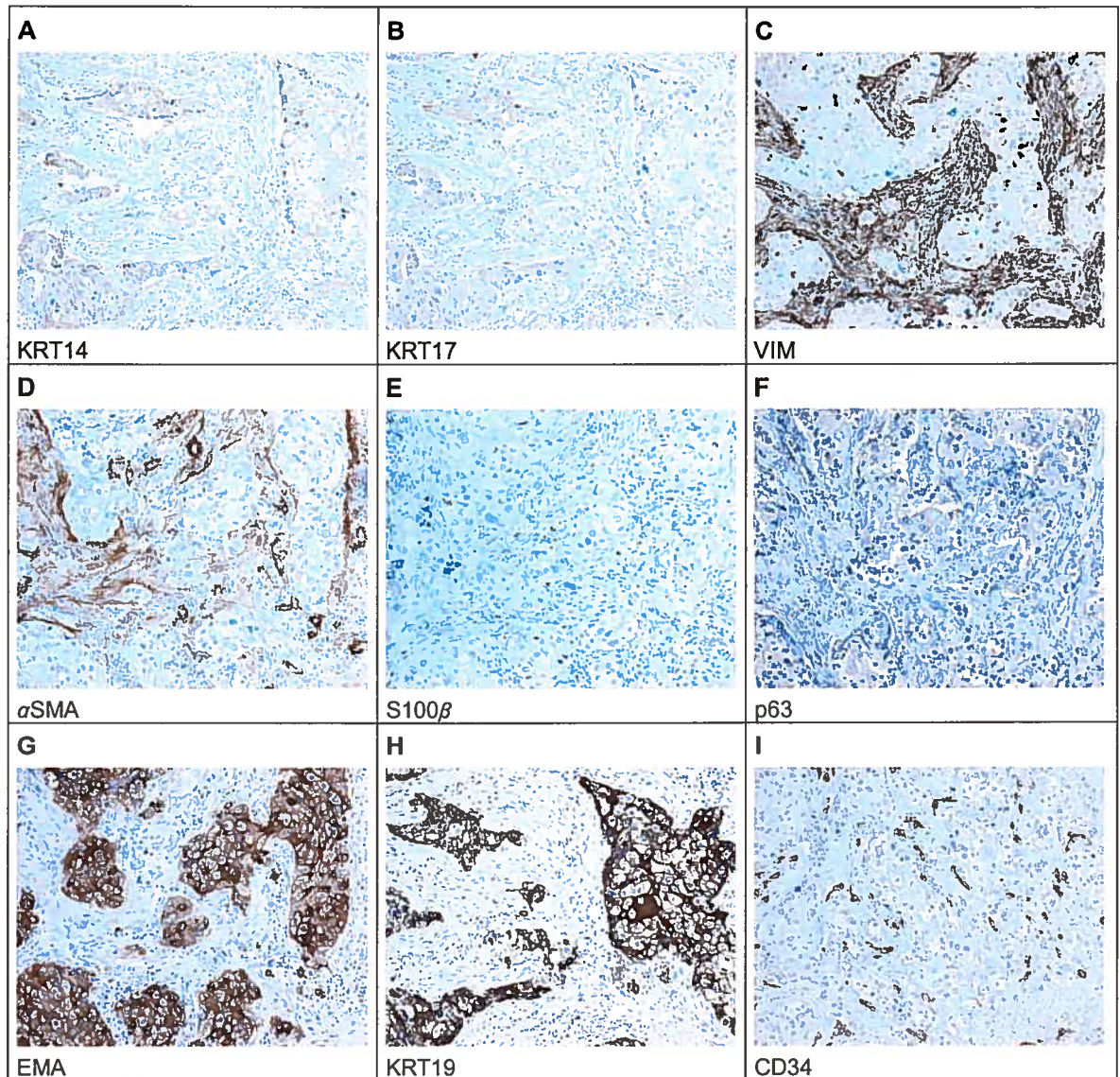
Spécimen T6: carcinome qui s'est développé chez une patiente recevant du raloxifène de façon prophylactique; A.-I. vue générale de la biopsie en 1 (hématoxyline; 100X), et agrandissement du foyer encadré, situé dans une zone de stroma distincte, en 2 (rotation horaire de 90°; hématoxyline; 630X). Les cellules de ce foyer réagissaient de manière distinctive pour la majorité des antigènes ciblés.

Figure 20 Immunohistochimie, carcinome canalaire infiltrant de bas grade (troisième partie)



Spécimen T6: carcinome qui s'est développé chez une patiente recevant du raloxifène de façon prophylactique; A.-I. vue générale de la biopsie en 1 (hématoxyline; 100X), et agrandissement du foyer encadré, situé dans une zone de stroma distincte, en 2 (rotation horaire de 90°; hématoxyline; 630X). Les cellules de ce foyer réagissaient de manière distinctive pour la majorité des antigènes ciblés.

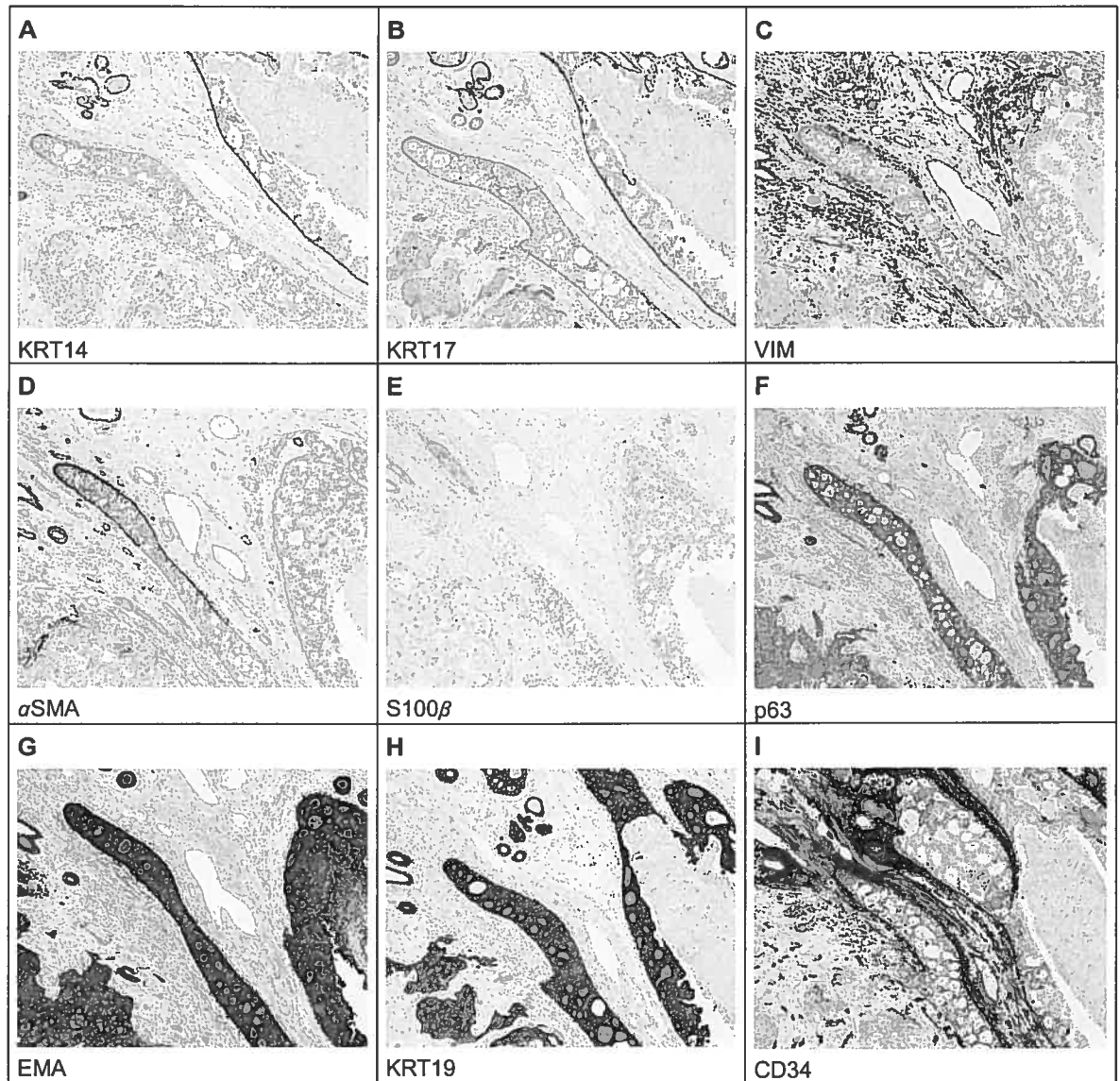
Figure 21 Immunohistochimie, carcinome canalaire infiltrant de haut grade avec métastases ganglionnaires



Spécimen T7: A.-I. résultats relatifs à un foyer d'infiltration dermique.

Hématoxyline, 100X.

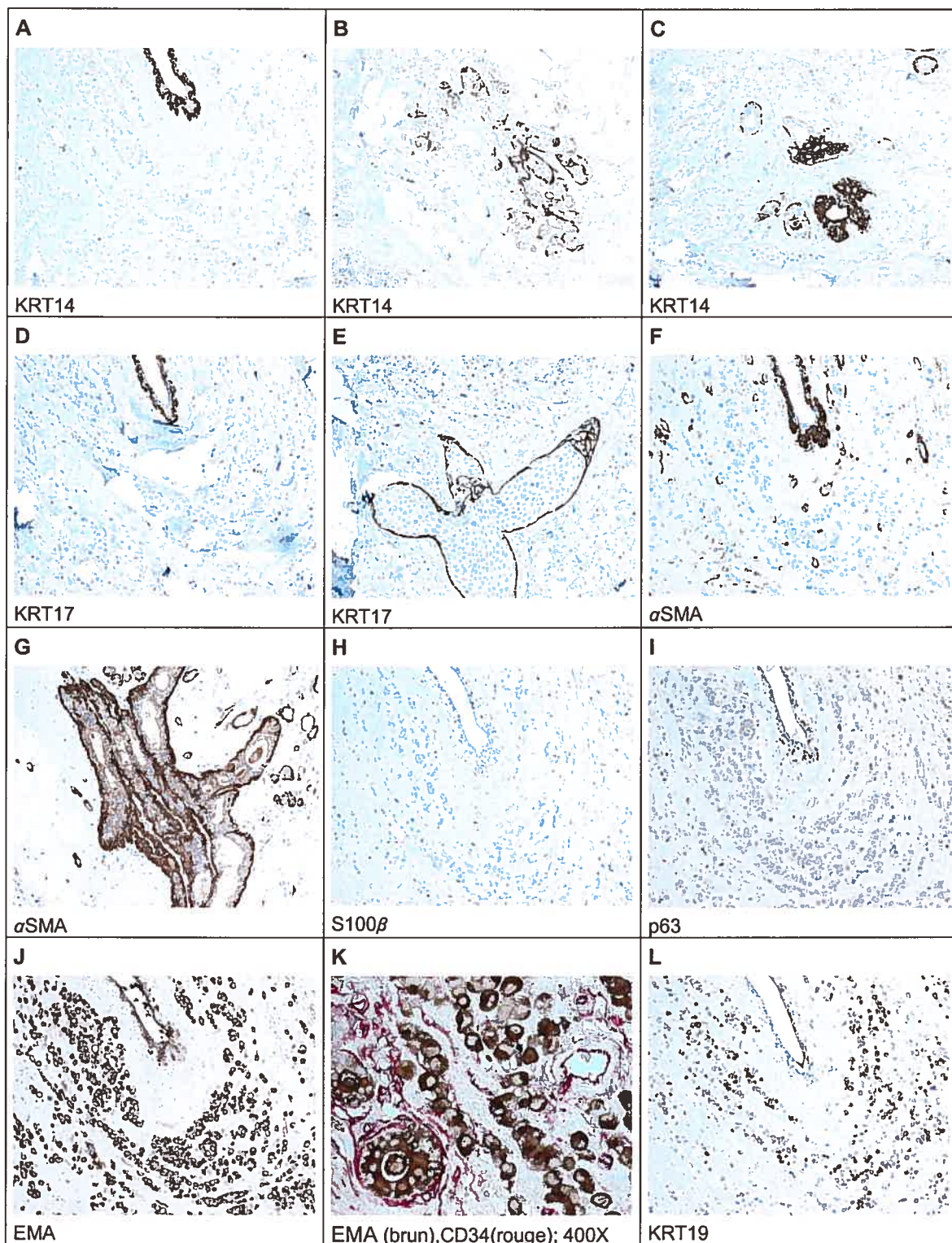
Figure 22 Immunohistochimie, carcinome canalaire infiltrant de haut grade sans métastase ganglionnaire



Spécimen T10: A.-I. résultats relatifs à trois foyers carcinomateux adjacents; on y distingue un front d'infiltration franche (en bas, à gauche), un élément glandulaire altéré aux limites bien définies (en haut, à droite), et un foyer aux propriétés intermédiaires (au centre).

Hématoxyline, 100X.

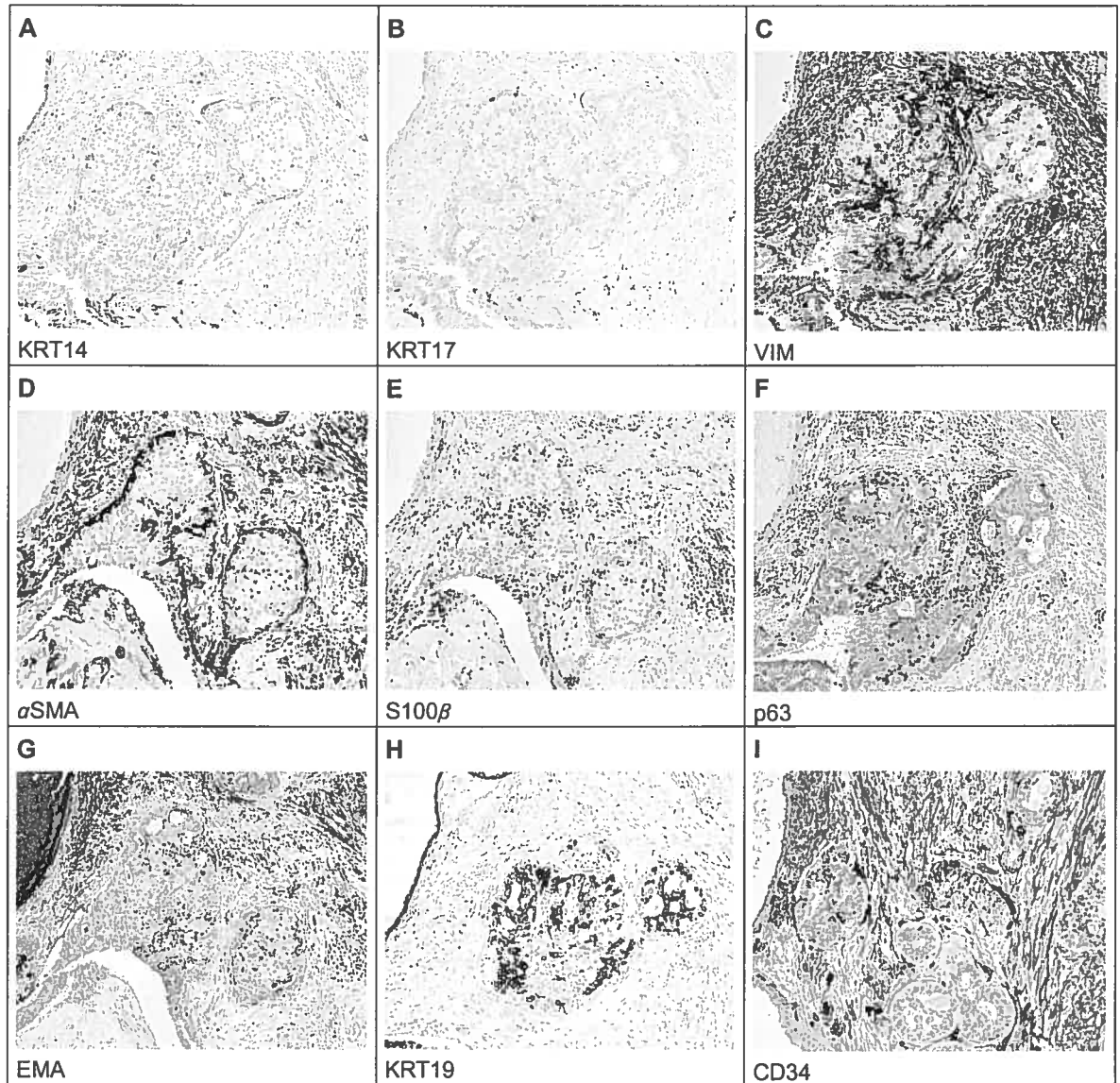
Figure 23 Immunohistochimie, carcinome lobulaire infiltrant de haut grade



Spécimen T12: A., D., F., H.-L. résultats relatifs aux abords d'un canal où des cellules cancéreuses envahissent le stroma "à la file indienne", produisant un aspect "en cible" retrouvé dans beaucoup de carcinomes lobulaires infiltrants; B., C., E., G. ces résultats, obtenus autour de structures autres, font l'objet de remarques dans la discussion.

Hématoxyline, 100X (à moins de précision autre).

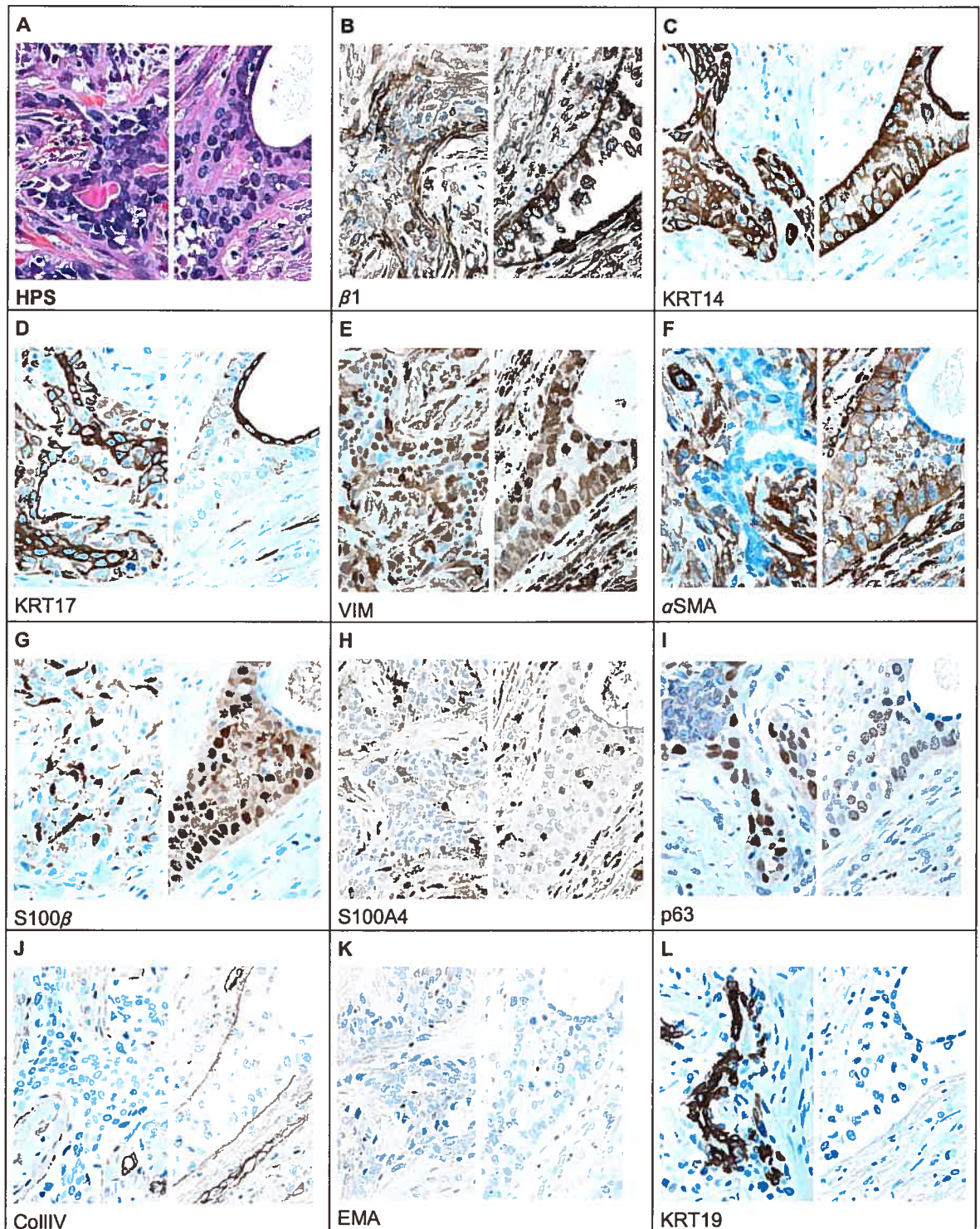
Figure 24 Immunohistochimie, adénomyoépithéliome présumé du sein



Spécimen T13: résultats pour un cas initialement diagnostiqué comme "adénomyoépithéliome mammaire"; sur ré-examen des lames et à l'étude de nouvelles coupes, les critères nécessaires n'ont pas été rencontrés; A.-I. la tumeur renfermait quelques foyers, comme celui illustré, de carcinome canalaire *in situ* de bas grade (d'après les pathologistes consultés). Elle présentait de nombreux kystes aux contenus variés, comme celui partiellement illustré ici (lumière en haut à gauche). Les attributs et la disposition des cellules épithéliales bordant des kystes étaient excessivement variables dans nos échantillons de sein normal et pathologique.

Hématoxyline, 100X.

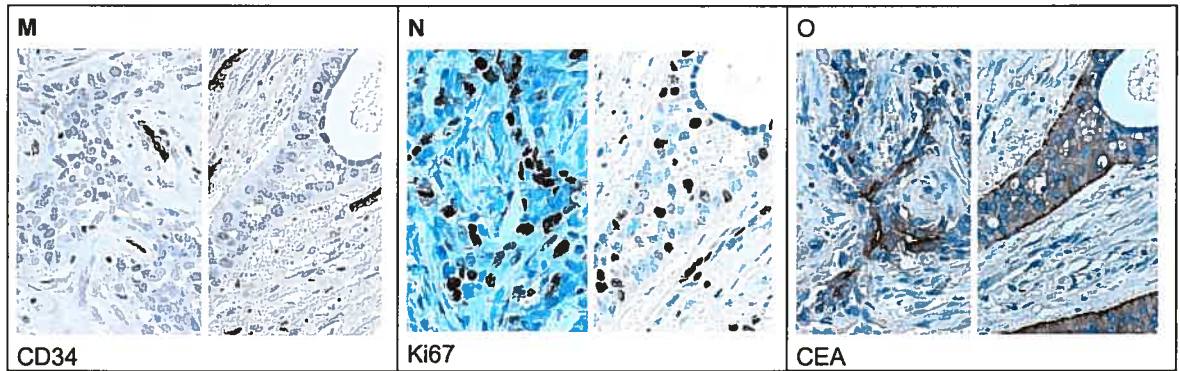
Figure 25 Microscopie optique et immunohistochimie, adénomyoépithéliome malin du sein (première partie)



Spécimen T14: A.-O. résultats de MO et d'IHC relatifs à deux des multiples foyers distincts de cette forme rare de carcinome mammaire. Beaucoup de foyers présentaient un aspect organoïde.

Hématoxyline (à moins de précision autre); 400X.

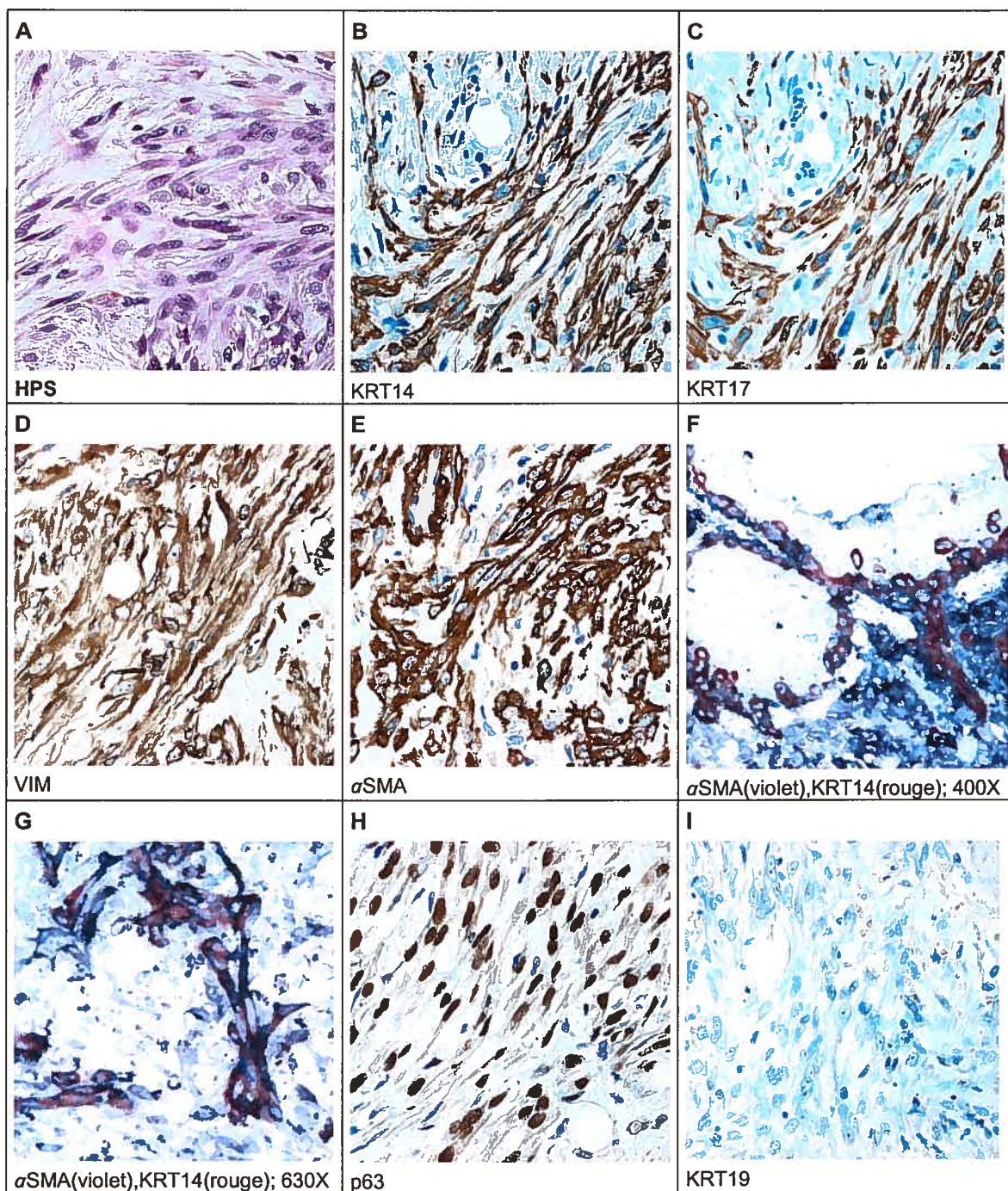
Figure 25 Microscopie optique et immunohistochimie, adénomyoépithéliome malin du sein (deuxième partie)



Spécimen T14: A.-O. résultats de MO et d'IHC relatifs à deux des multiples foyers distincts de cette forme rare de carcinome mammaire. Beaucoup de foyers présentaient un aspect organoïde.

Hématoxyline (à moins de précision autre); 400X.

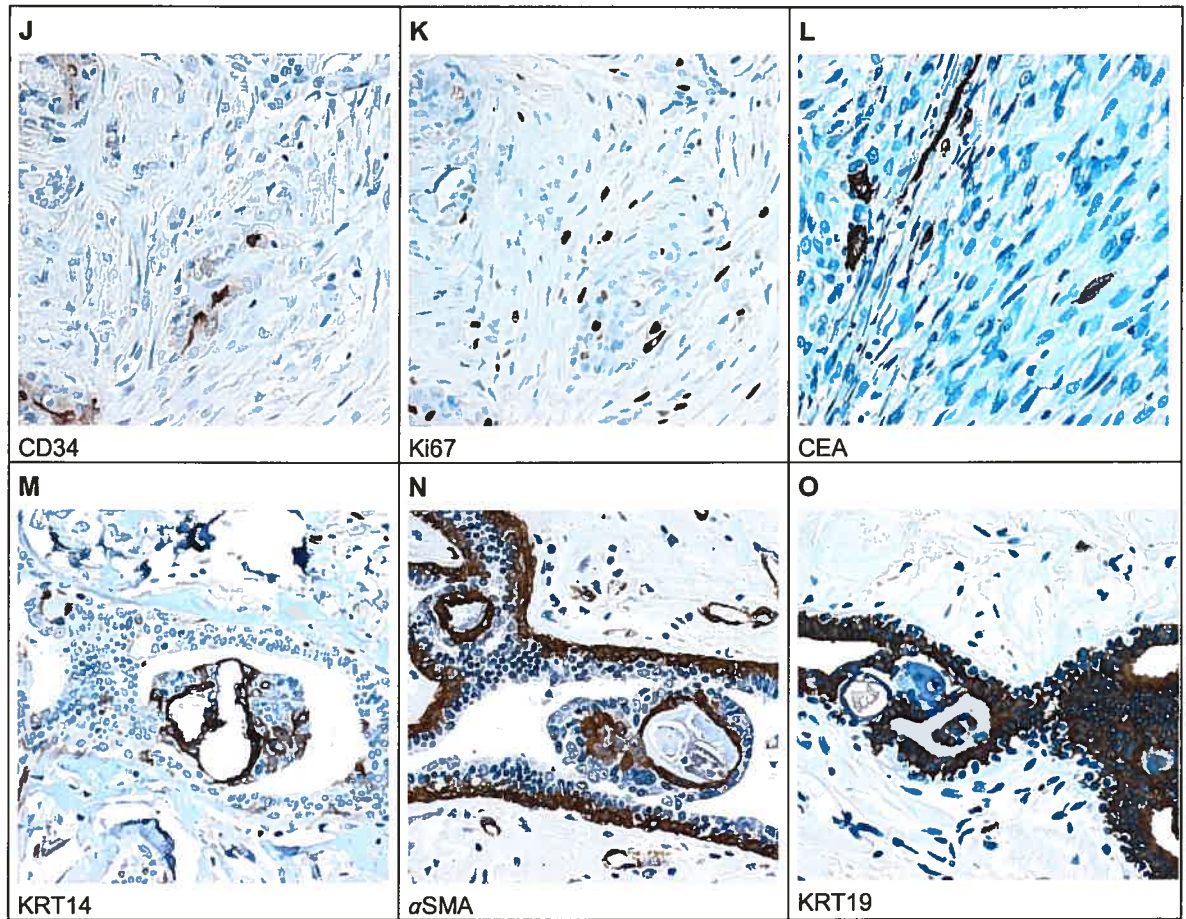
Figure 26 Microscopie optique et immunohistochimie, myoépithéliome malin du sein et nodule bénin associé (première partie)



Spécimen T16: A.-I. résultats de marquages immunohistochimiques simples et doubles dans un foyer typique de ce type très rare de carcinome du sein; F., G. le diagnostic peut être posé sur la base de résultats d'IHC lorsqu'un double-marquage confirme la co-expression de kératines et de protéines de muscle lisse par une majorité de cellules cancéreuses. Voir la page suivante.

Hématoxyline (à moins de précision autre); 400X.

Figure 26 Microscopie optique et immunohistochimie, myoépithéliome malin du sein et nodule bénin associé (deuxième partie)

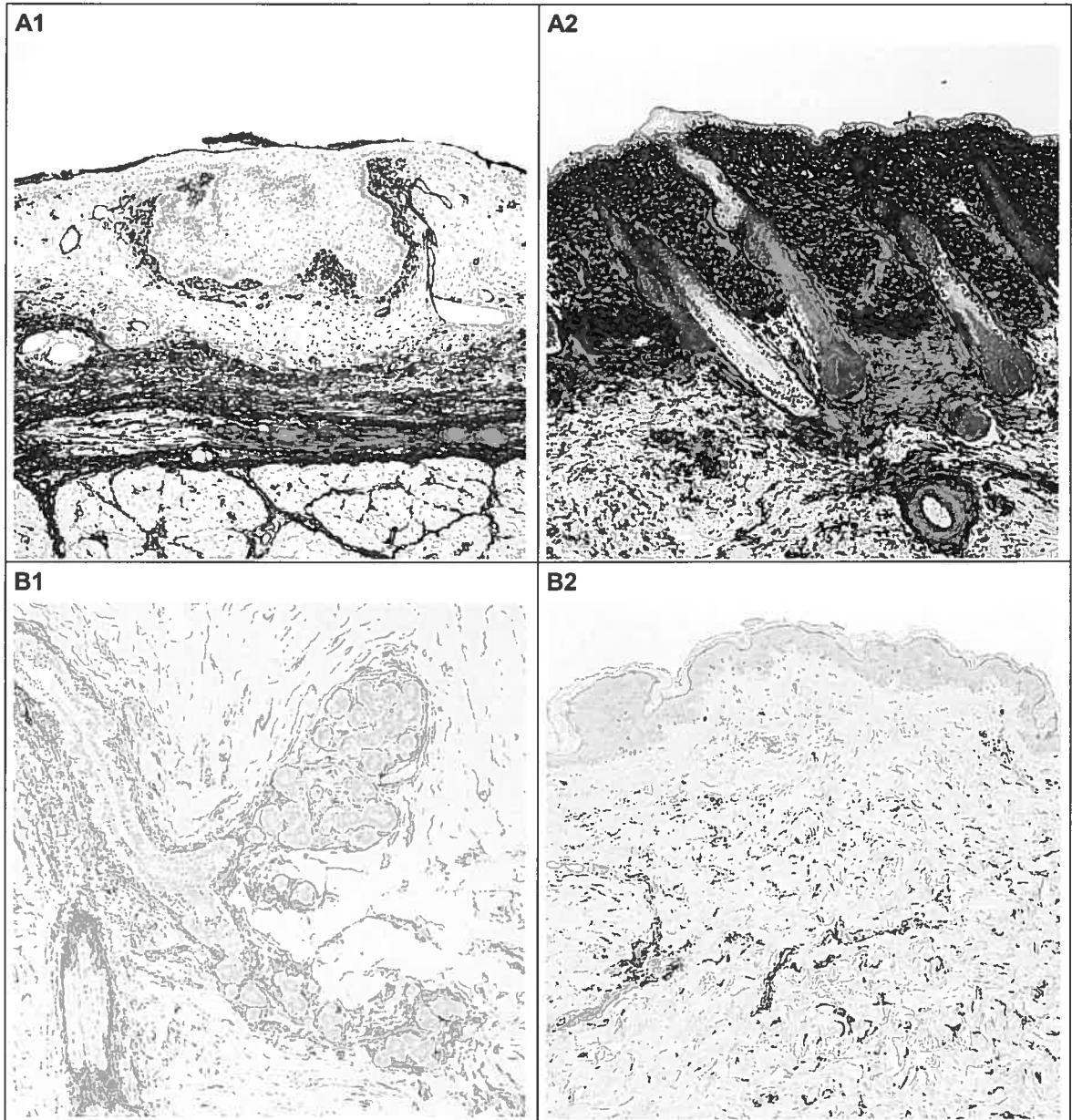


Suite. Spécimen T16: **J.-L.** résultats de marquages immunohistochimiques simples dans un foyer typique de ce type très rare de carcinome du sein.

Spécimen T15: **M.-O.** résultats d'IHC dans un nodule adjacent au myoépithéliome malin décrit; dans ce nodule diagnostiqué comme bénin, différentes inclusions intra-épithéliales, incluant des micro-calcifications, sont cernées de cellules positives pour l' α SMA et la KRT14, mais généralement négatives pour la KRT19.

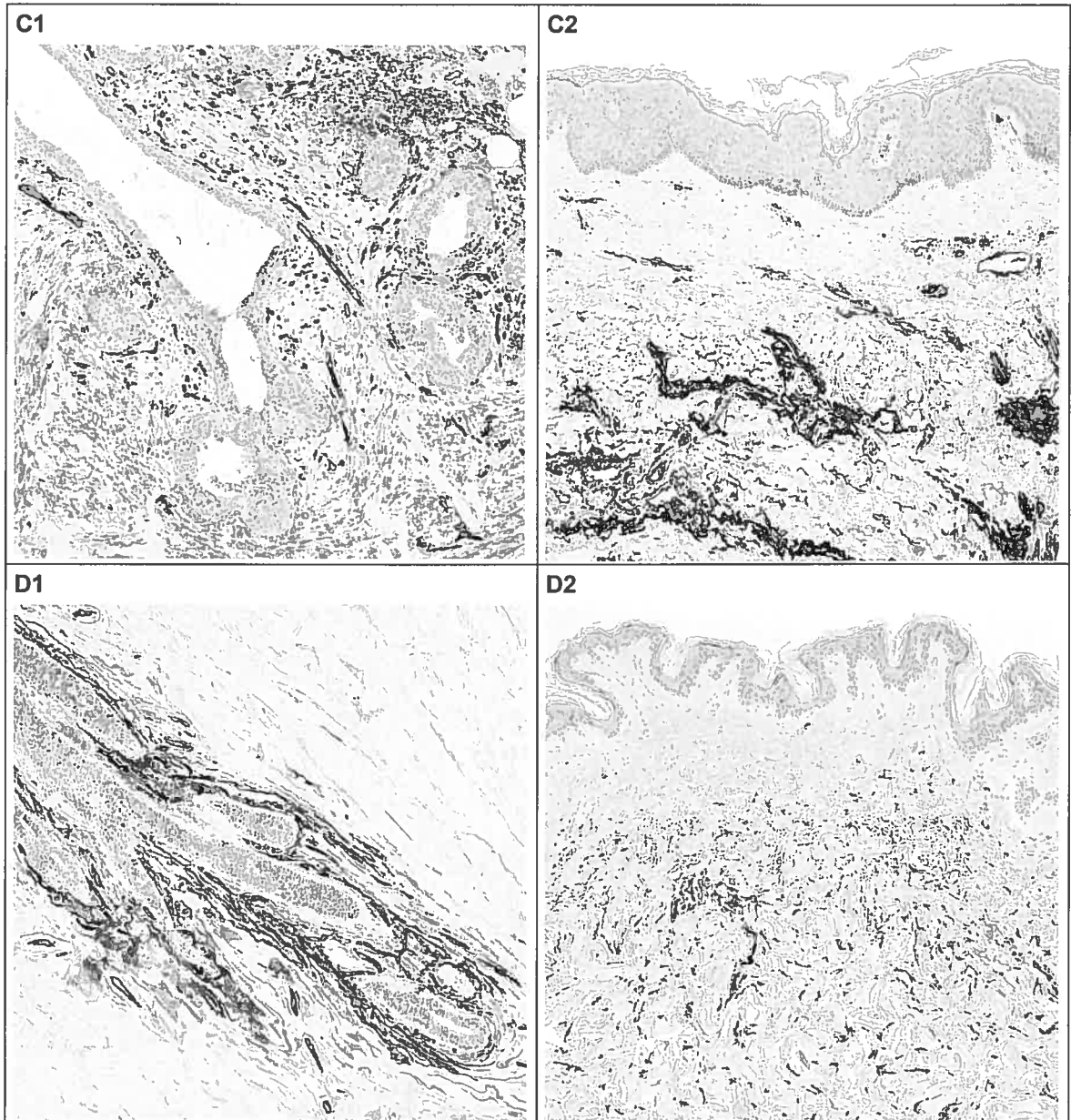
Hématoxyline; 400X.

Figure 27 Immunohistochimie, résultats obtenus pour le CD34 dans le sein et la peau de spécimens foetal, adulte normal et pathologiques (première partie)



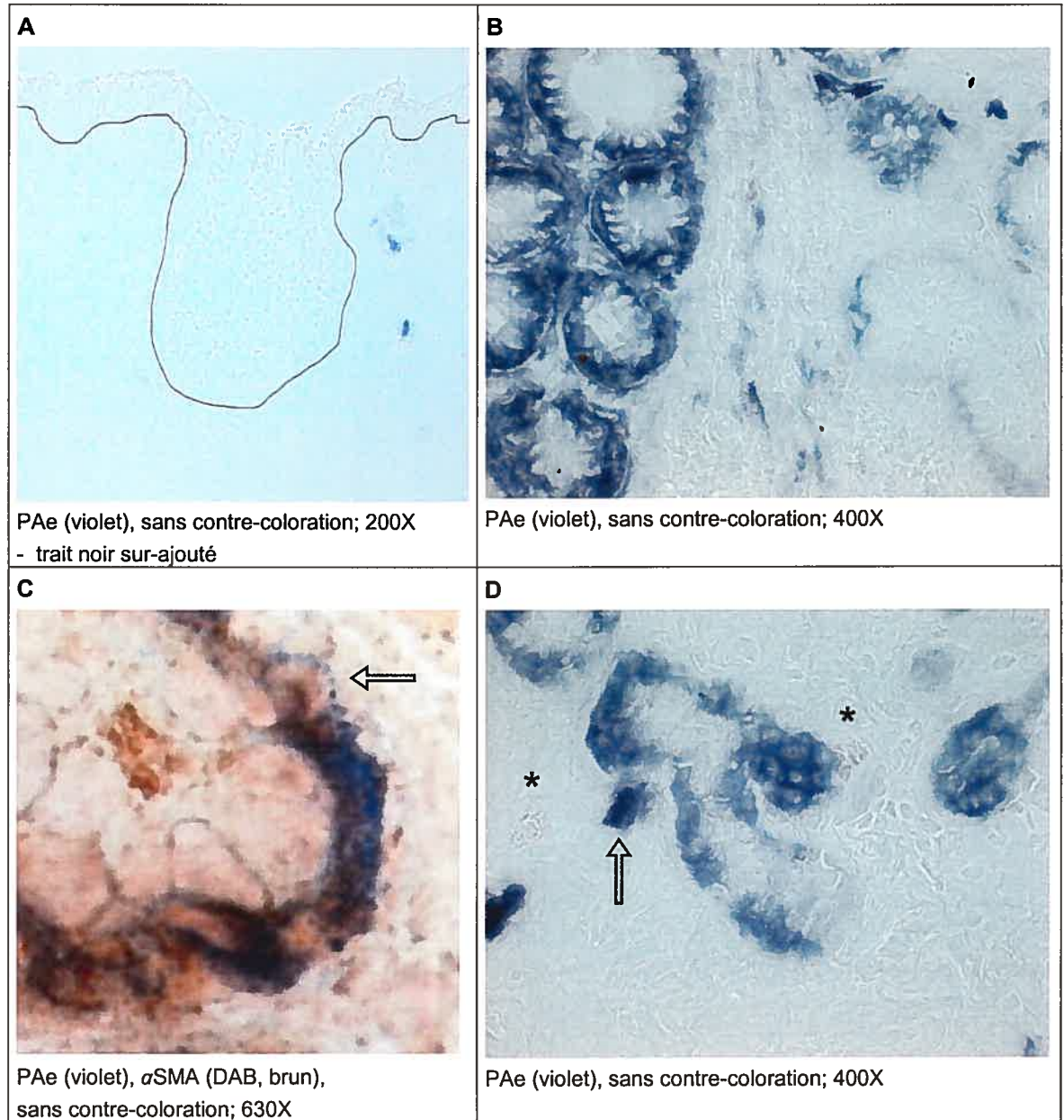
Résultats obtenus dans le sein (1) et dans la peau (2) de divers spécimens : A. spécimen F6 (sein foetal, 20 semaines de gestation; aussi illustré à la Figure 12 en F); B. spécimen N4 (sein adulte normal au repos, 20 ans). Voir la page suivante.
CD34, hématoxyline; 100X.

Figure 27 Immunohistochimie, résultats obtenus pour le CD34 dans le sein et la peau de spécimens foetal, adulte normal et pathologiques (deuxième partie)



Suite. Résultats obtenus dans le sein (1) et dans la peau (2) de divers spécimens : C. spécimen T1 (sein pathologique : hyperplasie mammaire floride, 12 ans; aussi illustré à la Figure 16); D. spécimen T2 (sein pathologique : hyperplasie mammaire floride, 20 ans; aussi illustré à la Figure 17).
CD34, hématoxyline; 100X.

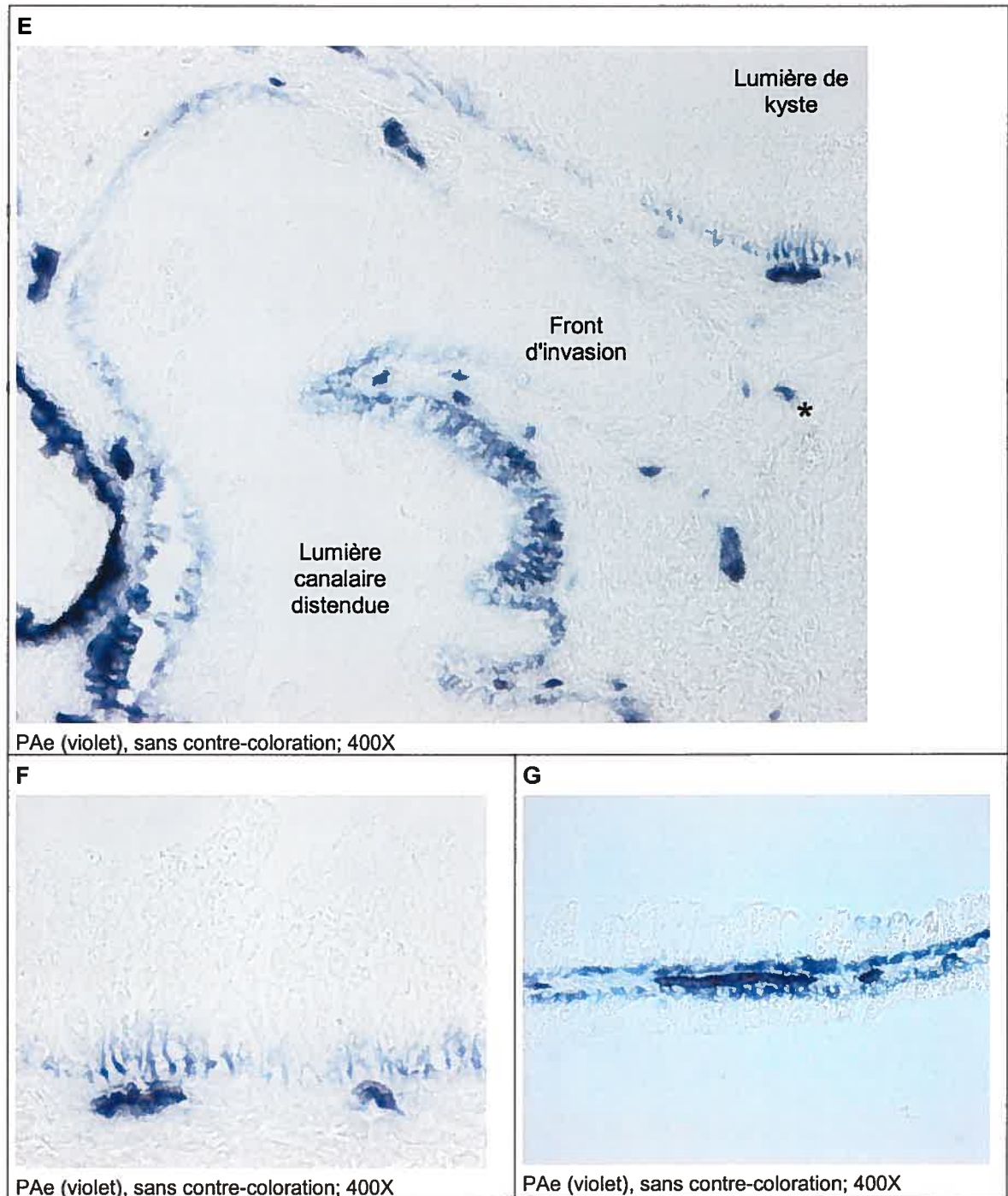
Figure 28 Activité de phosphatase alcaline endogène et glande mammaire humaine (première partie)



Résultat pour le cas F2, de région mammaire à 16 semaines de gestation (le trait noir sur-ajouté indique l'emplacement approximatif des lames basales de la peau et du bourgeon primaire) : **A**. les cellules du bourgeon primaire foetal ne montrent pas de PAe avec la technique utilisée, contrairement à certains vaisseaux sanguins du mésenchyme de soutien.

Résultats pour le cas N1, de sein adulte normal au repos en période péri-menstruelle : **B**. le marquage est très différent dans les CMEM de TDLU pourtant adjacents; **C**; le marquage est ponctuel le long des membranes basales de cellules qui semblent être des CMEM (flèche); **D**. le marquage des CMEM semble plus intense en présence de cellules de défense au cytoplasme granulaire (sous les astérisques); la présence de capillaires sanguins semble associée à une accentuation du marquage des cellules basales (flèche). Voir la page suivante.

Figure 28 Activité de phosphatase alcaline endogène et glande mammaire humaine (deuxième partie)

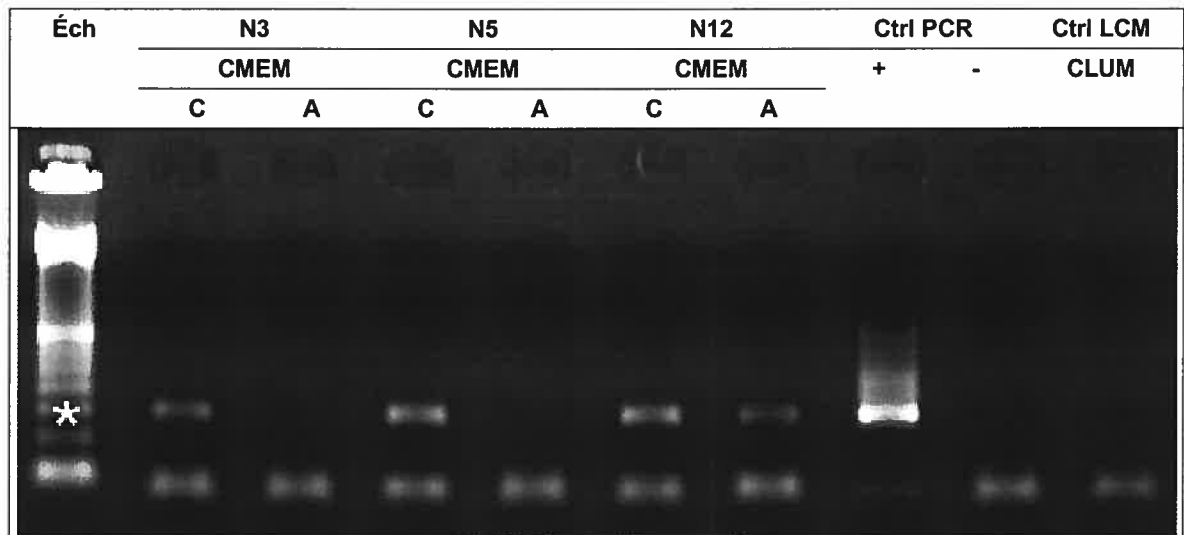


Suite. Résultats pour le cas T11, un carcinome lobulaire infiltrant : **E.** l'intensité du marquage pour la PAe baisse brusquement aux abords des foyers d'invasion (le stroma tumoral renferme des cellules de défense au cytoplasme granulaire comme celle située sous l'astérisque); **F.** l'intensité du marquage des CMEM semble augmenter à proximité de vaisseaux sanguins (agrandissement de la paroi du kyste voisin, visible en haut à droite en E); **G.** l'accentuation de marquage est aussi observée à proximité de capillaires contenus dans certains septa intra-kystiques.

Réaction de transcription inverse suivie d'une réaction de polymérase en chaîne (RT-PCR)

Les techniques de biologie moléculaire utilisées visaient avant tout à déterminer si nos résultats d'IHC pour la KRT14 dans le sein adulte normal au repos sont associés à des niveaux d'expression différents de ce FI dans le compartiment basal des CE et des TDLU (marquage intense des CMEM de CE contrastant avec une quasi-absence de marquage des CMEM de TDLU pour sept spécimens). Nos données pour les cas N3, N5 et N12 figurent aux pages suivantes. Les Figures 29 et 30 concernent la KRT14, les Figures 31 et 32 concernent la β 2M et la Figure 33 illustre nos efforts peu fructueux pour localiser l'ADNc du transcrit de la γ ACT dans nos échantillons. Nous avons obtenu des résultats adéquats pour notre contrôle de spécificité de microdissection (apex de CLUM canalaire) de même que pour nos contrôles de RT-PCR pour la KRT14 et la β 2M (mais non pour la γ ACT; Figure 33).

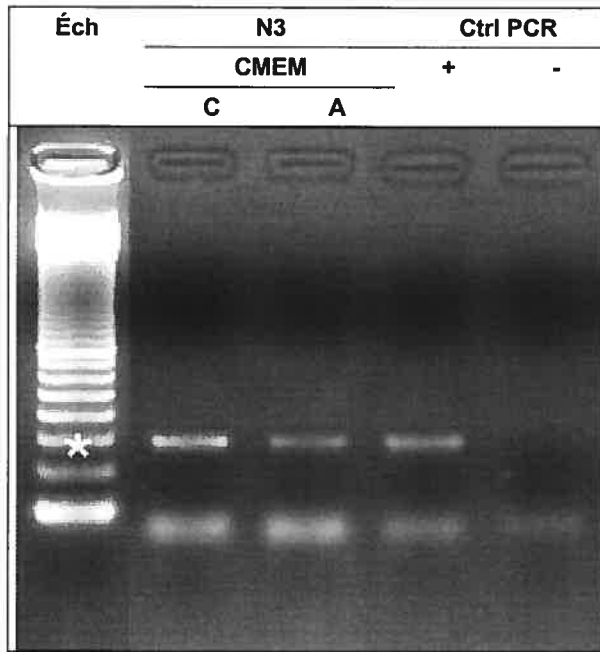
Figure 29 Détection de l'ADN complémentaire du transcrit de la kératine 14* pour les cas N3, N12 et N5 de sein adulte normal au repos (PCR de 45 cycles)



Légende : A, provenant d'acini; C, provenant d'un canal; Ctrl, contrôle(s); Éch, échelle de poids moléculaire de 100pb; LCM, microdissection par capture au laser.

* Produit de PCR attendu de 295pb pour la KRT14.

Figure 30 Détection de l'ADN complémentaire du transcrit de la kératine 14* pour le cas N3 (représentants de doublets d'échantillons non montrés à la Figure 29)

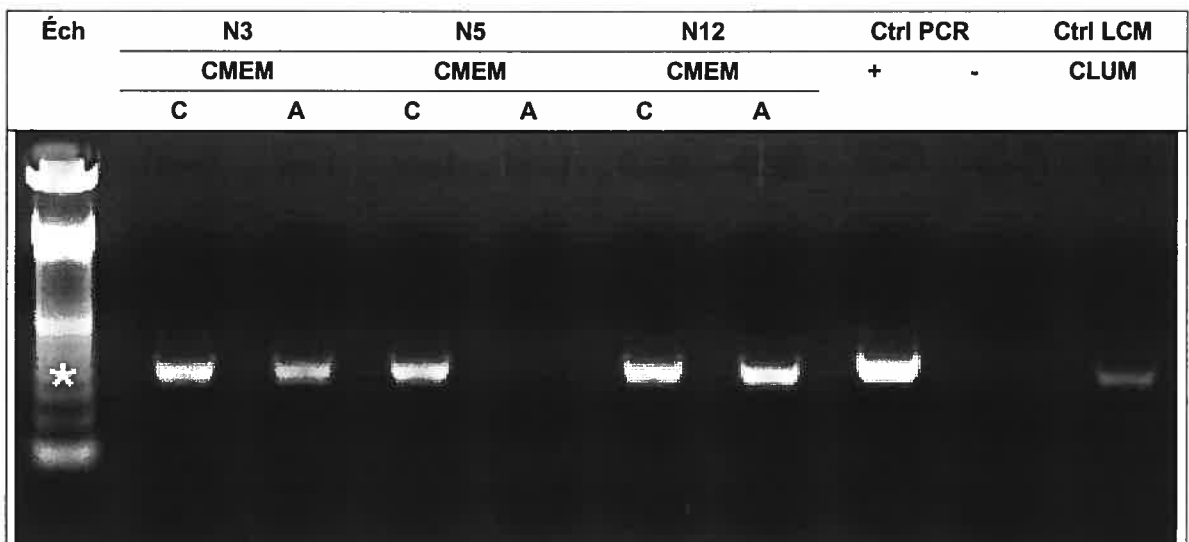


Légende : A, provenant d'acini; C, provenant d'un canal; Ctrl, contrôle; Éch, échelle de poids moléculaire de 100pb; LCM, microdissection par capture au laser.

N.B. Figure composite illustrant une portion des résultats d'une PCR de 42 cycles.

* Produit de PCR attendu de 295pb pour la KRT14.

Figure 31 Détection de l'ADN complémentaire du transcrit de la β 2-microglobuline* pour les cas N3, N5 et N12 de sein adulte normal au repos (PCR de 42 cycles)

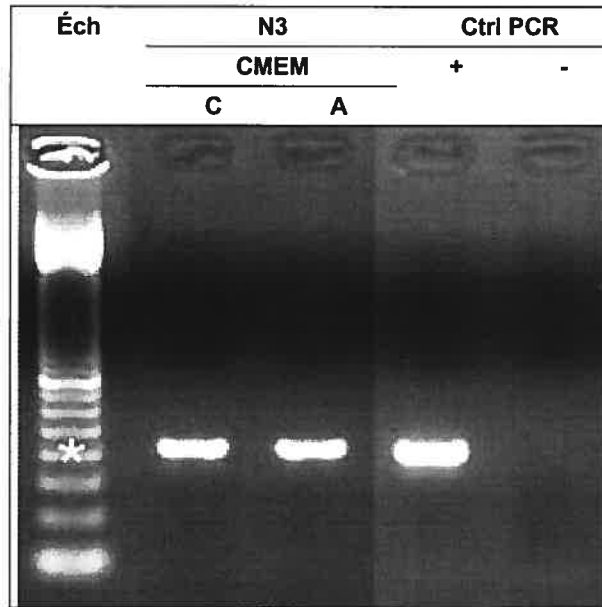


Légende : A, provenant d'acini; C, provenant d'un canal; Ctrl, contrôle(s); Éch, échelle de poids moléculaire de 100pb; LCM, microdissection par capture au laser.

N.B. Utilisation d'une dilution 1:20 du contrôle CLUM illustré à la Figure 29, faute de matériel.

* Produit de réaction attendu de 409pb pour la β 2M.

Figure 32 Détection de l'ADN complémentaire du transcrit de la $\beta 2$ -microglobuline* pour le cas N3 (représentants de doublets d'échantillons non montrés à la Figure 31)

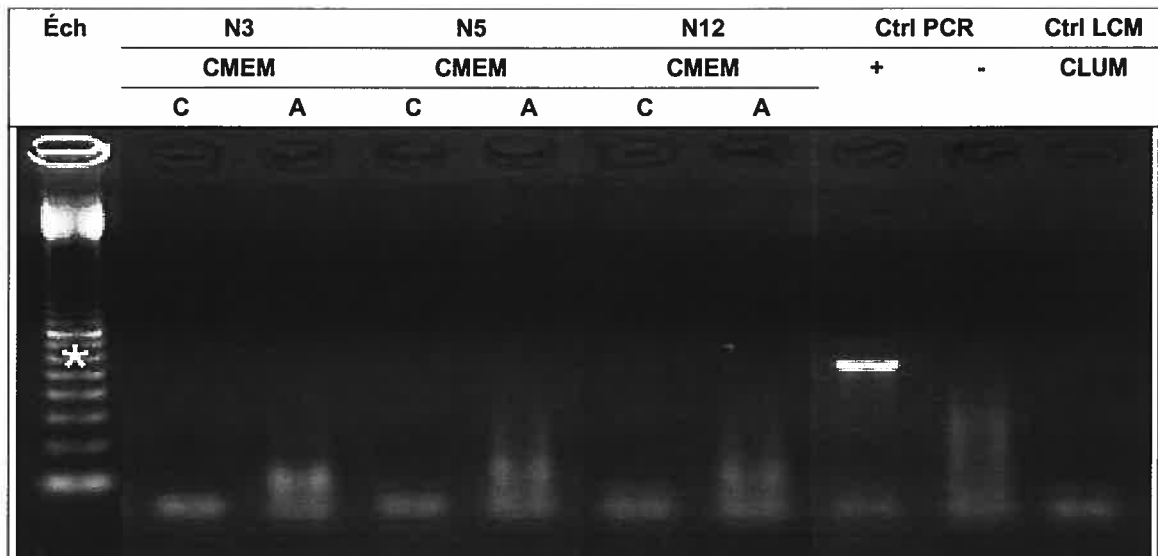


Légende : A, provenant d'acini; C, provenant d'un canal; Ctrl, contrôle; Éch, échelle de poids moléculaire de 100pb; LCM, microdissection par capture au laser.

N.B. Figure composite illustrant une portion des résultats d'une PCR de 42 cycles.

* Produit de réaction attendu de 409pb pour la $\beta 2M$.

Figure 33 Recherche de l'ADNc complémentaire du transcrit de la γ -actine cytosquelettique* pour les cas N3, N5 et N12 de sein adulte normal au repos



Légende : A, provenant d'acini; C, provenant d'un canal; Ctrl, contrôle(s); Éch, échelle de poids moléculaire de 100pb; LCM, microdissection par capture au laser.

N.B. Figure composite (PCR de 42 cycles).

* Produit de réaction attendu de 612pb pour la γ ACT.

Les résultats de la Figure 29 sont représentatifs des données obtenues pour tous les échantillons des cas N5 et N12. Les résultats obtenus pour le doublet d'échantillons enrichis en CMEM de TDLU du cas N3 sont discordants pour la KRT14 (Figures 29 et 30) mais non pour la β 2M (Figures 31 et 32). Constatée sur l'un de nos premiers échantillons testés, l'absence concomitante de bandes pour la KRT14 et la β 2M du cas N5 nous a fait douter de notre technique. Lorsque nous avons réalisé que la β 2M n'était peut-être pas un contrôle approprié pour nos travaux, notre matériel était presque entièrement épuisé par nos tests de vérification de technique (et avait été dégelé et re-congelé plusieurs fois) : une seule PCR a donc été réalisée pour la γ ACT, mais sans grand succès. Tel qu'illustré à la Figure 33, dans nos échantillons, nous avons observé des différences possiblement non aléatoires de «traînées d'amorces» mais pas de bandes.

DISCUSSION

Notre discussion se fera en trois temps. Premièrement, nous comparerons nos résultats avec les données de la littérature concernant la CMEM du sein foetal, adulte normal et pathologique. L'état fragmentaire des connaissances relatives au sein foetal explique pourquoi nous devons nous attarder à des considérations qui débordent quelque peu le cadre d'une description de la CMEM humaine. Deuxièmement, à la lumière de nos résultats, nous redéfinirons «la CMEM humaine» et proposerons un modèle spatio-temporel de la morphogenèse mammaire humaine *in utero*. Finalement, nous soulignerons les implications théoriques et pratiques de nos travaux et nous discuterons d'avenues de recherche qu'ils ouvrent en sénologie. Certains de nos résultats sur le sein foetal et pathologique ont fait l'objet de publications (voir Annexes IX et X).

Première partie : description et analyse des résultats

Tel que mentionné à la fin de l'introduction, afin d'accroître la validité et la pertinence des données générées, les conditions expérimentales choisies pour caractériser la CMEM humaine reproduisaient le plus fidèlement possible le contexte de travail en milieu hospitalier : travail sur des tissus humains et choix d'une technique accessible aux cliniciens; utilisation de réactifs – en particulier d'anticorps primaires - disponibles commercialement seulement; modifications mineures aux protocoles utilisés pour la routine; préparation des échantillons expérimentaux conforme à celle des échantillons issus de patients.

Le sein foetal et les précurseurs de la cellule myoépithéliale mammaire

Nos observations de MO supportent les conclusions d'études de microscopie électronique et de MO^{117,163,176,263} à l'effet que les structures épithéliales des régions mammaires foetales comprennent des populations cellulaires centrales et basales bien distinctes avant l'apparition de lumières glandulaires et avant le troisième trimestre gestationnel (déjà visibles vers 14 semaines). Nos résultats corroborent les affirmations voulant que le sein foetal repose sur une lame basale ininterrompue, continue avec celle de l'épiderme immature¹¹⁷; ils confirment également que le mésenchyme de soutien sous-jacent comporte des couches de propriétés distinctes^{17,163}.

Primordium mammaire ou mamelonaire?

Contrairement au BP, des PS comme celles présentes dans nos spécimens ont rarement fait l'objet de mentions ou de photographies dans la littérature sur le sein fœtal^{117,118,163}; une faible proportion de ces dernières sont de publication récente, l'utilisation de matériel fœtal humain étant de plus en plus strictement réglementée en recherche. Hughes a fourni dès 1949 une description particulièrement détaillée de projections similaires qu'il nomme «*cellular outgrowths*»¹⁷. Des croquis de Dabelow portant sur la morphogenèse du sein (1957) en illustrent également, mais cet auteur propose qu'elles dérivent du «disque mammaire globulaire»¹⁶⁷ (travaux cités et illustrations reprises par¹⁶¹). Hughes affirmait au contraire que le nodule cellulaire primaire (structure équivalente aux BP de nos spécimens) correspond au primordium mamelonaire, les excroissances constituant en fait le véritable primordium «mammaire» humain. Les propriétés de structures identiques aux nodules primaires de Hughes, aux disques mammaires globulaires de Dabelow et aux BP de nos spécimens foetaux ont été récemment assimilées à des «glandes mammaires immatures»^{169,170}; d'après les conclusions de Hughes et nos propres données de MO et d'IHC, il s'agirait plutôt de mamelons immatures. En effet, en MO :

- 1- les BP occupent une position intermédiaire entre les PS et la peau, cette position rappelant celle du mamelon adulte;
- 2- contrairement aux BP, les PS ressemblent davantage aux structures glandulaires du sein adulte;
- 3- contrairement aux BP qui semblent soumis aux influences d'un type unique de mésenchyme, les PS se développent au contact de différents mésenchymes. La situation des tPS et ePS rappelle donc celle des canaux et acini de l'adulte exposés, respectivement, au stroma extra- et intra-lobulaire du sein mature. Hughes a décrit quatre couches de mésenchyme de soutien, postulant que la troisième de ces couches était appelée à devenir le stroma extra-lobulaire (couche entourant les tPS) et la quatrième, le stroma intra-lobulaire du sein adulte (couche entourant les ePS);
- 4- les cellules de surface des BP de tous nos spécimens fœtaux ressemblent aux cellules de la peau environnante; les cellules du mamelon adulte présentent précisément un phénotype partiellement épidermique;
- 5- les noyaux des cellules basales de BP présentent une orientation rigoureusement perpendiculaire à la lame basale; ils se distinguent ainsi des noyaux des CMEM de

CE adultes et des noyaux des cellules basales de tPS foetales qui s'orientent parallèlement à la lame basale.

Plusieurs de nos résultats d'IHC supportent également les associations BP-mamelon et PS-glande mammaire suggérées par Hughes :

- 1- à l'instar des CMEM du sein adulte^{238,264,265}, plusieurs cellules basales de PS sont CD10(+); en revanche, les cellules basales des BP de tous nos spécimens sont négatives pour le CD10. Or, dans le sein adulte, les seules cellules épithéliales qui soient CD10(-) sont les cellules basales des canaux lactifères du mamelon¹³¹;
- 2- comme les CMEM du sein adulte^{126,131,134}, les cellules basales des PS sont VIM(+); les cellules basales de BP, inégalement VIM(+) chez les spécimens foetaux de moins de 20 semaines, sont majoritairement VIM(-) dans les spécimens plus âgés;
- 3- les cellules basales de tous les BP examinés sont α SMA(-). Au contraire, certaines cellules basales de PS sont positives pour ce marqueur reconnu de CMEM matures à 20/21 semaines, la majorité réagissant modérément pour l' α SMA à 24 semaines;
- 4- comme les CMEM du sein adulte¹²⁶, la plupart des cellules basales des PS sont KRT19(-). Chez l'humain, la KRT19 a une distribution particulière : typiquement apicale dans l'épithélium du sein adulte, elle est exclusivement basale au niveau du mamelon²⁶⁶ comme de l'épiderme²⁶⁷. Les cellules basales des BP, comme les cellules basales de l'épithélium mamelonaire adulte, sont KRT19(+) et soutiennent des cellules KRT19(-). Chez le fœtus, la distribution de KRT19 immunoréactive demeure basale à la jonction peau-BP mais non à la jonction BP-PS, devenant clairement centrale en aval de cette dernière (Figure 13 en R);
- 5- les seules cellules épithéliales S100 β (+) observées dans la région mammaire foetale sont des cellules basales d'ePS; or, d'après la littérature et nos données, cette protéine myoépithéliale serait plus abondante dans les CMEM des TDLU que des CE du sein adulte^{129,268,269};
- 6- nos résultats pour le CD34 confirment la stratification du mésenchyme de soutien observée par Hughes; la distribution différentielle du CD34 autour de tPS *versus* des ePS rappelle celle observée autour des CE *versus* des TDLU du sein adulte normal au repos.

Nos résultats de MO et d'IHC¹⁷² confirment donc que les cellules basales de PS *et non celles de BP* devraient être considérées comme précurseurs mammaires de CMEM dans le sein foetal. Ceci implique que la littérature sur les précurseurs fœtaux de CMEM contient des inexactitudes puisque des études récentes d'IHC sur le sein fœtal, considérées comme «classiques», décrivent en réalité des primordia *mamelonaires*^{169,170}. Depuis deux décennies, les débats de société entourant les interruptions volontaires de grossesse à motif social se sont multipliés et intensifiés. Pour des raisons d'éthique et de légalité, les établissements de santé de plusieurs pays n'en réalisent plus au-delà d'un âge gestationnel précis, ce dernier étant plus souvent antérieur que voisin des âges auxquels nous avons observé des PS (ex. en-deça de 20 semaines). À notre avis, la difficulté – ou même l'impossibilité – d'utiliser des échantillons de «régions mammaires fœtales» pouvant présenter de PS aura favorisé l'accroissement de cette confusion entre primordia mamelonaire et mammaire humains dans la littérature sur le sein foetal.

Révision du profil antigénique des précurseurs fœtaux de la cellule myoépithéliale

Nos données nous amènent à réviser le profil antigénique des précurseurs fœtaux de la CMEM humaine (Tableau XVI). Nos résultats pour la KRT14, la vimentine et l' α SMA contredisent des données de Anbazhagan et coll.¹⁶⁹. Ces derniers ont utilisé un fixateur différent du nôtre (TissuFix), à base de méthanol (méthacarn modifié) plutôt que de formaldéhyde, qui ne masque pas les épitopes reconnus par divers anticorps anti-kératines, anti- α SMA et anti-vimentine²⁷⁰. Leurs résultats négatifs pour la KRT14, la vimentine et l' α SMA dans le sein fœtal à 16, 18 20 et 23 semaines de gestation nous semblent donc moins susceptibles de découler de l'emploi d'un fixateur de nature distincte que de facteurs tels que : 1- leur observation de cellules basales de mamelons immatures plutôt que de futures CMEM à proprement parler; 2- leur recours à des anticorps primaires et/ou des protocoles moins efficaces (ex. leurs dilutions de travail pour la KRT14 et la vimentine étaient de 1:1 et 1:10 *versus* 1:20 et 1:100 pour nos travaux).

Tableau XVI Profil antigénique des précurseurs foetaux de la cellule myoépithéliale du sein (deuxième trimestre gestationnel)

2 ^e trimestre gestationnel		
Membrane plasmique	Littérature*	
	Nos travaux	67LR - ¹⁷² α6 + ¹⁷² β1 + ¹⁷² β4 + ¹⁷² CD10 + ¹⁷² CD44v6 + ¹⁷²
Cytoplasme	Littérature	<i>α-actine du muscle lisse</i> - ¹⁶⁹ <i>Kératine 14</i> - ¹⁶⁹ <i>Vimentine</i> - ¹⁶⁹
	Nos travaux	KRT14 + ¹⁷² KRT17 + ¹⁷² KRT19 + ¹⁷² VIM + ¹⁷² GFAP - ¹⁷² αSMA + ¹⁷²
Noyau	Littérature***	
	Nos travaux	p63 + ¹⁷² Ki67 +

Légende : +, antigène-cible détecté par immunohistochimie conventionnelle dans certains ou dans tous les précurseurs; -, antigène-cible non détecté par immunohistochimie conventionnelle.

N.B. Nos résultats contredisent les données de la littérature sur les précurseurs foetaux de la CMEM humaine qui apparaissent en italique.

* Gould et coll.¹⁷⁹ rapportaient des précurseurs positifs pour les sous-unités d'intégrines α6 et β1 pour 4 spécimens foetaux non décrits, d'âge non précisé.

** Nature artéfactuelle envisagée des marquages cellulaires obtenus pour le CollIV et le CollVII qui sont assemblés à l'extérieur des cellules qui en synthétisent les chaînes, contrairement à la LN5 (ex. impact possible, respectivement, de la digestion enzymatique ou de la fixation à l'acétone: les collagènes tendent à occuper de plus grands volumes lorsque dénaturés²⁷¹; effet de superposition lié à l'emploi de coupes de tissu congelé avec l'anti-CollVII).

*** Anbazhagan et coll. ont localisé le Ki67 dans les BP de trois foetus (18, 18 et 23 semaines de gestation), rapportant que de 10 à 22% des cellules épithéliales du BP sont positives; bien qu'ils précisent que cette proportion s'élève à la jonction peau-BP, ils n'illustrent pas leurs résultats pour cet antigène et ne précisent pas la position des cellules épithéliales marquées.

Depuis leur publication initiale, nous avons validé la plupart de nos résultats grâce à des spécimens additionnels. L'ajout récent du CD34 à notre batterie (absent du Tableau XVI car il ne s'agit pas d'un marqueur myoépithélial) a par ailleurs permis de corroborer les données de Naccarato et coll.¹⁷⁶ sur la distribution très compartimentalisée du CD34

immunoréactif dans le mésenchyme de soutien foetal. À ce jour, nos données sur la distribution du Ki67 dans les PS semblent inédites et ne peuvent faire l'objet de comparaisons.

Indices d'une modulation de la différenciation dans l'espace et dans le temps

L'épithélium des projections glandulaires immatures de rongeurs repose sur une lame basale aux propriétés variables; ces variations pourraient refléter un degré croissant d'immaturation des cellules basales de ces structures dans l'axe proximo-distal^{272,273}. Comme les extrémités des projections mammaires de rongeurs, les ePS humaines reposent sur la portion la plus mince et la plus irrégulière de la lame basale entourant les PS de nos spécimens fœtaux de plus de 20 semaines. Chez le rongeur^{274,275} et l'humain²⁷⁶, dans le contexte de la croissance mammaire normale, l'association avec une lame basale très mince est perçue comme un indice d'immaturation myoépithéliale. Les caractéristiques morphologiques et antigéniques des cellules basales des ePS mammaires humaines ne sont que partiellement «myoépithéliales» (ex. forme et orientation mal définies, cytoplasme et noyau clairs). En effet, ces cellules présentent des réactions cytoplasmiques très faibles à nulles pour des FI de cellules ectodermiques basales bien différenciées (KRT14 et KRT17) et une forte positivité pour la VIM, ce FI dont l'abondance décroît très précocement pendant la différenciation de la plupart des dérivés ectodermiques humains²⁷⁷. Dans les PS, l'intensité du marquage pour la VIM est d'ailleurs légèrement supérieure dans les cellules basales d'ePS. En fait, le phénotype des cellules basales des ePS de nos spécimens de sein foetal ressemble à celui des «*cap cells*» retrouvées aux extrémités de la glande mammaire immature des rongeurs; l'immaturation des *cap cells*, habituellement décrites comme des cellules souches mammaires totipotentes²⁷⁸, est un fait admis bien que leur nature exacte soit encore débattue (ex. cellules de pavage²⁷⁹, cellules mammaires multipotentes de phénotype foetal transitoire²⁸⁰).

Les propriétés des cellules basales des tPS et des ePS ne sont pas homogènes; leurs variations pourraient être le reflet de leur développement inégal dans le temps, mais aussi d'une différence de micro-environnements. En effet, les cellules basales des tPS et des ePS amorcent logiquement leur développement avec un certain décalage (impact du temps); elles sont cependant aussi exposées à des couches de mésenchyme aux propriétés distinctes (impact du milieu). Quoique des comparaisons inter-spécimens suggèrent une «maturation

myoépithéliale» (ex. réaction plus extensive pour l' α SMA à 24 semaines qu'à 21 semaines dans les cellules basales de tPS), on ne peut écarter l'implication d'altérations graduelles du mésenchyme de soutien. C'est pourquoi nous avons proposé que la différenciation des précurseurs foetaux de la CMEM pourrait être modulée dans le temps et l'espace¹⁷², comme celle des précurseurs foetaux de la CMEM du rat¹⁵⁶. L'analyse de nos spécimens foetaux additionnels suggère une modulation où les concepts d'espace et de temps se confondent (modulation spatio-temporelle).

La jonction tPS-ePS est située à la frontière entre les deux couches les plus profondes du mésenchyme de soutien. Dans le spécimen F9 (21 semaines), cette jonction est associée à un épaississement focal très marqué de la lame basale épithéliale (PS à la Figure 13 en N). Cette observation et nos résultats d'IHC pour la KRT14, la KRT17 et l' α SMA (marquages intenses en amont de la jonction, quasi-inexistants en aval pour ces marqueurs de CMEM différenciées^{126,134,135}) suggèrent une association entre la jonction tPS-ePS et l'acquisition de plusieurs caractéristiques myoépithéliales. Puisque l'architecture tissulaire peut moduler la physiologie de cellules épithéliales mammaires chez le rongeur^{51,281} et chez l'humain^{46,47,282}, nous avons proposé¹⁷² que la structure tridimensionnelle de la jonction tPS-ePS pourrait être particulièrement propice à l'acquisition de propriétés «myoépithéliales» par les cellules basales du sein foetal. Nos résultats d'IHC pour le 67LR, pour la β 1 et pour diverses composantes d'hémidesmosomes matures (l' α 6, la β 4, la KRT14, le CollIV, le CollVII et la LN5) s'accordent d'ailleurs avec l'idée que des interactions épithélio-stromales interviennent très précocement au cours de la morphogenèse mammaire¹⁷¹; ils démontrent que les précurseurs foetaux de la CMEM seraient plus susceptibles que ceux des CLUM de participer à ces phénomènes morphogéniques. Enfin, la distribution du CD34 suggère l'existence d'inductions réciproques particulièrement efficaces entre les cellules épithéliales basales (du BP et des PS) et le mésenchyme local; en effet, le marquage pour le CD34 révèle que des variations brusques de leurs attributs surviennent aux frontières de certaines couches du mésenchyme de soutien.

Autres considérations relatives au sein foetal

En marge de la caractérisation des précurseurs de la CMEM, nous avons noté la présence d'ébauches de lumières dans le sein dès la fin du second trimestre de gestation.

Nos observations, comme celles d'autres chercheurs^{117,162}, contredisent des rapports suggérant que la formation des lumières ne débiterait qu'au cours du troisième trimestre gestationnel^{165,169}. Ces ébauches de lumières tireraient leur origine de lacunes observées entre les cellules centrales des PS. Dans les ePS, d'autres lacunes séparent par contre les cellules épithéliales basales et centrales. D'après leur position et leur amincissement vis-à-vis de cellules basales positives pour l' α SMA (Figure 13 en J), il s'agirait plus vraisemblablement d'espaces inter-cellulaires dilatés¹⁶⁵ que de futures lumières glandulaires¹⁶³.

Dans un autre ordre d'idée, d'après la littérature, le sein ne présente pas de dimorphisme sexuel *in utero* - contrairement aux glandes mammaires de certains rongeurs^{14,163,273,283}. Les tiges de PS du spécimen masculin de 24 semaines sont nettement plus étroites que les tiges de PS du spécimen féminin de 21 semaines; la taille de notre cohorte ne nous permet par contre pas de déterminer si ceci résulte d'une simple variation inter-individus ou d'un dimorphisme sexuel léger propre à la glande mammaire humaine foetale.

Enfin, rappelons que contrairement aux deux spécimens de 20 et 23 semaines de gestation étudiés par d'autres^{169,170}, nos quatre spécimens âgés de 20, 21 et 24 semaines gestationnelles présentent des PS. Cette contradiction résulte peut-être simplement du caractère approximatif de «l'âge gestationnel» comme mesure du développement foetal. Nos observations suggèrent par contre que la morphogenèse mammaire pourrait ne pas débiter exactement au même stade du développement *in utero* pour tous les individus. L'association imparfaite entre le degré de développement des PS et la longueur du pied foetal (LPF) de nos spécimens s'accorde avec cette hypothèse (ex. cas F8). Responsable d'un décalage de développement mammaire entre individus, une morphogenèse hormono-dépendante plus ou moins précoce pourrait contribuer à expliquer la variabilité de présentation de cette glande (ex. différences de volume, d'architecture et de sensibilité aux oestrogènes déjà évidentes *in utero*¹⁷⁶) et le déphasage des stades de développement morphologique et fonctionnel du sein des nourrissons^{163,284}. L'analyse d'une plus grande cohorte permettrait de vérifier ces hypothèses.

La cellule myoépithéliale dans le sein adulte normal au repos

Nos données de MO, comme celles de nombreuses études, soulignent l'existence de différences morphologiques importantes entre les CMEM des CE et celles des TDLU. Nous nous limiterons, dans une première sous-section, à la discussion de l'une d'elles : l'apparition cyclique de vacuoles dans les cellules basales/myoépithéliales des TDLU. Les sous-sections subséquentes traiteront de nos résultats d'IHC, de coloration pour la PAe et de RT-PCR dans le sein adulte normal.

La vacuolisation de cellules basales/myoépithéliales mammaires adultes

La plupart des épithéliums renferment des cellules épithéliales basales isolées d'aspect vacuolaire (ex. la peau). Cependant, d'après la littérature^{56,57,59} et nos propres observations, la vacuolisation de cellules basales prend une ampleur parfois remarquable dans l'épithélium du sein adulte. Comme plusieurs des cellules vacuolées sont négatives pour l' α SMA ou le p63, nous jugeons préférable de les qualifier de «basales» ou de «basales/myoépithéliales».

Ce phénomène de vacuolisation pourrait être lié au processus de croissance de l'épithélium mammaire adulte puisqu'il a été démontré que :

- 1- l'activité de croissance du parenchyme mammaire adulte est surtout manifeste au niveau des TDLU du sein adulte (figures mitotiques presque exclusives aux TDLU selon plusieurs auteurs^{61,272} et nos propres observations); d'après la littérature, les cellules basales claires de l'épithélium – surtout retrouvées dans les TDLU - prolifèrent très activement (indices de prolifération parmi les plus élevés¹⁴⁶);
- 2- l'activité de croissance du parenchyme mammaire adulte est maximale en période lutéale²⁸⁵, soit au moment où la vacuolisation des cellules basales atteint son paroxysme;
- 3- un gonflement cellulaire peut favoriser la prolifération épithéliale par le biais de voies métaboliques différentes de celles déclenchées par des facteurs de croissance^{286,287,288}.

Deux de nos observations d'IHC supportent cette hypothèse. Premièrement, la majorité des TDLU des échantillons prélevés pendant la période lutéale du cycle mammaire renferme un nombre accru – par rapport aux CE - de cellules basales et supra-basales

positives pour le Ki67 (Figure 15); plus de 50% des noyaux positifs pour le Ki67 appartiennent à des cellules supra-basales vacuolées. Deuxièmement, dans ces TDLU, de nombreuses cellules basales vacuolées contiennent plusieurs noyaux qui réagissent de façon souvent contraire pour le p63 (Figure 15 de C à I; observations confirmées en utilisant des coupes tissulaires sériées de 1µm); or, le p63 est étroitement associé aux phénomènes de prolifération et de régénération épithéliales chez l'animal et l'humain^{289,290}. Ces profils cellulaires reflètent vraisemblablement le déroulement de mitoses asymétriques dans les cellules basales vacuolées des TDLU du sein adulte normal au repos, un phénomène dont nous avons déjà envisagé l'existence dans le sein foetal¹⁷². Les noyaux positifs pour le p63 occupent une position généralement basale dans ces cellules multi-nucléées. Cette observation s'accorde avec une découverte récente : l'expression du p63 serait requise pour amorcer un programme de stratification épithéliale²⁹¹. Sur les coupes de nos spécimens de sein adulte au repos, certaines cellules supra-basales vacuolées sont positives pour l' α SMA et négatives pour la KRT19 et vice-versa; d'autres encore sont négatives pour ces deux antigènes. Selon quelques chercheurs, les cellules qui ne réagissent ni pour l' α SMA ni pour la KRT19 seraient des progéniteurs communs des lignées myoépithéliale et luminale mammaires : elles donneraient naissance aux «cellules d'amplification transitoire» exclusives à l'une ou l'autre lignée épithéliale mammaire^{98,292,293}.

Un immunophénotype incomplètement caractérisé

La plupart des études publiées en sénologie utilisent des échantillons de «sein normal», mais ceux-ci y figurent plus souvent à titre de contrôles que d'échantillons expérimentaux et il s'agit encore souvent de tissu mammaire péri-lésionnel d'apparence saine. Étant donné l'emphase mise sur la CLUM en sénologie, les descriptions de la CMEM du sein réellement normal demeurent peu nombreuses.

Les illustrations de nombreuses publications montrent des fluctuations de marquages d'IHC effectués pour divers antigènes-cibles dans le «compartiment myoépithélial normal». Ces variations sont rarement discutées, étant parfois rapidement mentionnées pour conclure que l'antigène ciblé serait peu performant comme marqueur de CMEM à des fins diagnostiques. Quelques chercheurs ont pourtant souligné l'aspect non aléatoire de certaines de ces variations^{125,131,174,294}, suggérant que les CMEM de CE et de TDLU exerceraient des fonctions distinctes et/ou seraient issues de progéniteurs différents.

Jusqu'à tout récemment^{100,159}, ces travaux sont passés pratiquement inaperçus²⁹⁵. De prime abord, le sujet semble manquer de pertinence clinique : les pratiques de diagnostic histopathologique qui exploitent actuellement les propriétés de la CMEM nécessitent l'utilisation de marqueurs très sensibles - un besoin que semble combler l' α SMA (selon certains, la CNN1¹ et le p63^{123,296} pourraient aussi être utilisés dans le cadre de ces pratiques).

Des variations non aléatoires de l'immunophénotype myoépithélial normal

Les résultats d'IHC que nous avons obtenus de manière systématique et uniforme pour 15 marqueurs reconnus ou putatifs de la CMEM humaine concernent 13 spécimens distincts de sein adulte normal au repos. Ils s'accordent avec les données publiées antérieurement (tel qu'indiqué au Tableau XVII) sauf pour la GFAP, la CNN1 et le p63.

Tableau XVII Résumé sommaire du profil antigénique de la cellule myoépithéliale dans le sein adulte normal au repos selon la présente étude

Antigènes ciblés dans le sein normal	Sein normal au repos	Sein normal au repos
	CE	TDLU
67LR ^{142,297}	[++]	[+]
α6 ^{127,133,137,179,218}	[++]	[+]
β1 ^{127,133,137,179,218,237,237}	[++]	[+]
β4 ^{127,133,137}	[++]	[+]
CD10 ^{131,174,238,264,265,298}	++	++
CD44v6 ^{240,299,300}	[±]	[±]
KRT14 ^{1,131,132,134,301}	++	±
KRT17 ^{1,125,132,302}	++	±
VIM ^{1,125,126,131,134}	[±]	[+/+++]
GFAP ^{1,126,131,222}	-	-
αSMA ^{1,126,131,134}	[++]	[++]
CNN1 ^{1,282,303}	[++]	[±]
S100β ^{129,268,269}	±	+/+++
S100A4 ¹⁴¹	[±]	[+]
p63 ^{123,296,304}	+	+

Légende : ++, détection par IHC dans >85% des cellules; + détection par IHC dans 15-85% des cellules; ±, antigène-cible détecté dans <15% des cellules; -, antigène-cible non détecté; [], le marquage n'est pas uniquement myoépithélial si l'on considère les composantes épithéliale et stromales du sein.

N.B. Nos données corroborent celles des études citées en caractères standards; en cas de contradiction très claire, l'étude est citée en italique. Ces énumérations ne sont pas exhaustives.

Comme d'autres, nous n'avons pu localiser la GFAP dans les CMEM du sein adulte normal. Par ailleurs, nos résultats pour la CNN1 contredisent des rapports récents suggérant qu'elle pourrait être un marqueur aussi sensible et plus spécifique que l' α SMA^{1,303} : elle s'avère peu sensible et à peine plus spécifique que l' α SMA comme marqueur de CMEM. En ce qui a trait au p63, l'existence de nombreux doublets nucléaires horizontaux positifs-négatifs semble peu compatible avec le «très haut degré de sensibilité» attribué par d'autres au p63 comme marqueur des cellules basales de l'épithélium du sein^{123,296} (à peine 50% de cellules basales positives dans les TDLU présentant de nombreuses cellules vacuolées).

À l'instar des cellules basales de l'épithélium du sein foetal décrites plus tôt, les CMEM du sein adulte au repos présentent des variations phénotypiques reproductibles. Dans le sein adulte comme dans le sein foetal, ces variations non aléatoires ne sont pas uniquement morphologiques. Il s'agit de variations d'immunophénotype :

- 1- topographiques impliquant des «compartiments» glandulaires entiers; associés à des mésenchymes différents ou à des frontières mésenchymateuses chez le foetus et l'adulte, ces compartiments incluent : les tPS, les jonctions tPS-ePS et les ePS du sein foetal d'une part, et les CE extra-lobulaires, les CT et les acini des TDLU du sein adulte au repos d'autre part;
- 2- topographiques autres.






Le Tableau XVIII résume ces variations immunohistochimiques notées dans le sein normal foetal et adulte. Fournies à titre indicatif, ces représentations doivent être consultées isolément pour les antigènes mentionnés (la méthode employée ne permet pas une comparaison d'ordre quantitatif de résultats obtenus à l'aide d'anticorps différents). Pour chaque marqueur de CMEM ciblé, l'analyse de ces variations a été omise du présent texte pour fins de concision mais peut être consultée à l'Annexe VIII.

Tableau XVIII Résumé visuel des variations topographiques de l'immunophénotype myoépithélial dans le sein normal (foetal et adulte)

Sein foetal (fin du deuxième trimestre gestationnel), selon nos travaux			
	tPS	Jonction tPS / ePS	ePS
67LR			
alpha 6			
beta 1			
beta 4			
CD10			
CD44v6			
KRT14			
KRT17			
VIM			
aSMA			
S100b			
S100A4			
p63			

Sein adulte normal au repos, selon nos travaux			<u>Littérature</u>
	CE	CT	
67LR			
alpha 6			
beta 1			
beta 4			
CD10			
CD44v6			
KRT14			KRT14 ^{131,294}
KRT17			KRT17 ^{125,132,29} 4,305
VIM			VIM ¹²⁵
aSMA			
CNN1			
S100b			
S100A4			
p63			

Légende de l'intensité des réactions observées*

	Forte		Faible		Nulle
	Moyenne		Peu perceptible		

N.B. Résumé des variations de marquages d'IHC observées pour les antigènes-cibles considérés isolément – voir le texte. Les études citées à droite incluaient des échantillons de tissu mammaire normal (*versus* péri-lésionnel) et décrivaient explicitement des variations topographiques analogues pour les antigènes spécifiés.

* Dans au moins 25% des cellules épithéliales occupant clairement une position basale.

Par IHC, la distribution des marqueurs suivants : le 67LR, l' α 6, la β 1, la β 4, le CD10, le CD44v6, la KRT14, la KRT17, la VIM, l' α SMA, la CNN1, la S100 β , la S100A4 et le p63 présente en effet des variations impliquant des compartiments glandulaires entiers du sein normal (foetal et adulte). Ces variations de phénotype basal/myoépithélial s'accompagnent de variations topographiques d'attributs morphologiques et/ou antigéniques (CollIV, CollVII, LN5 et CD34) de la lame basale et du stroma. Les marquages d'IHC pour l'EMA, la KRT19, le Ki67 et le CEA présentaient également des variations topographiques dans le sein foetal et adulte normal.

D'autres variations topographiques, non associées à ces compartiments, impliquent les marqueurs suivants : la VIM, l' α SMA, la S100A4, l'EMA, la KRT19, le Ki67 et le CEA (Figures 14 et 15). Elles concernent donc un marqueur putatif de CMEM aussi perçu comme un marqueur d'immaturité épithéliale (VIM), le marqueur reconnu de CMEM le plus utilisé en clinique (α SMA), un marqueur putatif de CMEM et marqueur de transition épithéliale-à-mésenchymateuse (S100A4), un marqueur reconnu de CLUM et marqueur de régulation de la physiologie luminale par la CMEM (EMA), un marqueur reconnu de CLUM et marqueur putatif de progéniteurs mammaires (KRT19), un marqueur reconnu de prolifération cellulaire (Ki67) et enfin, un antigène dont la distribution foetale importante contraste avec sa distribution limitée chez l'adulte (CEA). Plusieurs de ces variations topographiques sont inter-reliées, comme celles impliquant des TDLU morphologiquement similaires du sein adulte. Tel qu'illustré à la Figure 15 de M à Q, les portions de TDLU qui renferment de rares CLUM positives pour la KRT19 présentent en général des éléments glandulaires pauvres en cellules basales/myoépithéliales vacuolées; fortement positifs pour l' α SMA, ces éléments aux lumières mal définies ne renferment presque pas de cellules Ki67(+). Au contraire, les portions de TDLU aux CLUM uniformément KRT19(+) présentent de nombreuses cellules basales/myoépithéliales vacuolées; bordés par une mince couche de CMEM α SMA(+) comportant des brèches, ces éléments présentent des lumières remplies de matériel sécrétoire et renferment un nombre élevé de cellules basales et supra-basales Ki67(+). Considérées dans leur ensemble, ces variations phénotypiques suggèrent la co-existence de CMEM et de CLUM similaires mais non identiques à l'intérieur de compartiments anatomiques/histologiques.

Une reconnaissance entravée

Il existe peu d'informations sur les variations non aléatoires de l'immunophénotype myoépithélial normal malgré (Tableau XVIII), possiblement en raison de:

- 1- l'idée reçue selon laquelle la CMEM est une «cellule accessoire terminalement différenciée»; le peu d'études systématiques réalisées sur la CMEM humaine normale serait à la fois une cause et une conséquence du manque d'intérêt manifesté vis-à-vis de ce type cellulaire;
- 2- le nombre restreint de marqueurs de CMEM utilisés en pathologie mammaire;
- 3- le critère de *sensibilité* sur lequel se base la sélection des marqueurs de CMEM utilisés en milieu hospitalier depuis près de vingt ans. Prenant pour acquis qu'il n'existe qu'un immunophénotype myoépithélial mammaire normal, il favoriserait la sélection d'antigènes-cibles peu informatifs pour l'étude de sous-groupes de CMEM (α SMA, p63) aux dépens d'antigènes-cibles mettant en évidence le caractère distinct des CMEM de CE et de TDLU; autrement dit, le manque de sensibilité reproché à ces derniers (ex. KRT14, KRT17, VIM) découlerait en fait de leur spécificité pour des sous-groupes biologiquement significatifs de CMEM;
- 4- l'utilisation généralisée de *cocktails* d'anticorps anti-kératines en pathologie humaine. Les *cocktails* d'anti-kératines sont souvent préférés aux anticorps qui ciblent une seule kératine à la fois parce qu'ils amenuisent les variations de distribution propres à chacune d'elles; bien que perçu comme avantageux dans certains contextes, cet apparent gain d'efficacité traduit une perte d'informations. De plus, ces *cocktails* sont encore souvent utilisés sans tenir compte du fait que les kératines seraient des marqueurs de comportements plutôt que de «nature» cellulaire, leur expression n'étant pas strictement épithéliale^{245,306,307,308} comme on l'avait d'abord cru. De plus, certains *cocktails* d'anti-kératines ne reconnaissent pas aussi efficacement les différentes kératines qu'ils devraient cibler; leur efficacité étant souvent biaisée en faveur des kératines luminales^{134,301}, ils s'avèrent peu fiables pour le dépistage de carcinomes myoépithéliaux du sein^{194,201,309,310,311}. Enfin, l'utilisation de tels *cocktails* retarde l'acquisition de connaissances cliniquement pertinentes, de données sur le potentiel de kératines individuelles comme facteurs de diagnostic ou de pronostic, par exemple;

- 5- l'utilisation encore fréquente de tissus mammaires péri-lésionnels à titre d'échantillons de sein normal : variations peu visibles à cause d'un aminuement de l'hétérogénéité «normale» dans le sein pathologique⁷⁴; à l'inverse, variations normales conservées mais interprétées comme réactionnelles - et ignorées;
- 6- la variabilité inter-études du type et des modalités de fixation des tissus. Il existe une grande variété de fixateurs et de protocoles de fixation qui s'avèrent plus ou moins adéquats dans diverses situations. En clinique, la fixation à base de formaldéhyde est fréquemment utilisée (stabilisation réversible des tissus qui semblent moins altérés avec un fixateur comme le TissuFix, employé au CHUM et pour nos travaux, qu'avec l'éthanol²²⁷ par exemple); toutefois, des fixateurs peu adéquats pour faire de l'IHC sont encore employés en milieu hospitalier²³⁰ (ex. Bouin) et beaucoup d'articles de recherche discutent de données issues d'échantillons de sein normal fixés très différemment (ex. congélation et acétone; éthanol, méthacarn, formaldéhyde, etc. employés pour des durées et à des concentrations variables). Même réalisée de façon optimale, la fixation de tissus par différentes approches occasionne des variations artéfactuelles qui compliquent la documentation de variations phénotypiques d'origine biologique. Des protocoles de fixation inadéquats ont le même effet (ex. variations entre le centre et le pourtour des coupes découlant d'un temps de fixation trop court avec un fixateur à base de formaldéhyde; ce dernier pénétrera rapidement mais fixera lentement les tissus : le centre des pièces sera alors fixé par l'éthanol utilisé pour la circulation automatisée précédant l'enrobage en paraffine);
- 7- l'attribution non confirmée d'une origine artéfactuelle aux variations de marquages d'IHC difficiles à expliquer selon les connaissances de sénologie du moment (ex. variations inter- et intra-compartimentales interprétées comme des artéfacts de sur-fixation).

Des variations non aléatoires de l'activité de phosphatase alcaline endogène

La localisation de PAe peut agir à titre de contrôle technique en IHC; elle-même a déjà servi à caractériser divers types cellulaires³¹² dont les CMEM (forte activité de PAe presque exclusivement myoépithéliale dans le sein¹⁴⁵). Les colorations enzymatiques sont rarement utilisées à des fins de recherche depuis l'introduction de l'IHC, au début des années 1980.

Le BP d'un spécimen foetal de 16 semaines de gestation ne montre aucune réaction pour la PAe (marquage limité à quelques structures vasculaires; Figure 28 en A). Chez l'adulte, en revanche, de nombreuses CMEM et la majorité des vaisseaux sanguins du sein adulte normal et pathologique présentent une PAe détectable par simple exposition des tissus congelés au chromogène BCIP/NBT (Figure 28 de B à G). La distribution ponctuelle du chromogène, le long des membranes basales de certaines CMEM, suggère une association entre l'activité de PAe et l'établissement d'adhésions cellule-ECM.

Le fait que le marquage soit généralement plus faible dans l'ensemble des CE *versus* dans l'ensemble des TDLU du sein adulte normal suggère, à l'instar des variations de certains de nos marquages d'IHC, que les CMEM des CE et des TDLU présentent des différences d'ordre physiologique. De plus, dans les CMEM de TDLU pourtant adjacents, la PAe est tantôt présente et importante, tantôt quasi-absente (Figure 28 en B). Dans les TDLU «positifs», l'intensité de la réaction est typiquement maximale dans les acini présentant des lumières bien définies et un épithélium comportant deux assises cellulaires distinctes. En revanche, les CMEM de petites structures aux lumières mal définies sont plus rarement et plus faiblement marquées. Ceci souligne encore une fois la coexistence de CMEM morphologiquement similaire mais non identiques, cette fois d'un point de vue fonctionnel à l'intérieur de compartiments glandulaires définis à l'histologie.

Les territoires positifs pour la PAe et pour des antigènes-cibles comme la KRT19, le Ki67 et le CEA présentent une géographie particulière, ceux-ci n'impliquant que des portions de TDLU voisins. Ceci rappelle étrangement la géographie des territoires d'inactivation de l'X décrits récemment par IHC dans divers organes⁹⁷. Par ces travaux, Novelli et coll. ont re-confirmé que le parenchyme mammaire normal est un amalgame de territoires monoclonaux^{96,313}. La distribution en bandes du CEA immunoréactif dans notre contrôle de côlon normal, par exemple, est très similaire à celle de la déshydrogénase glucose-6-phosphate décrite par ces chercheurs (la frontière d'une de ces bandes est visible à la Figure 42 de l'Annexe VII). À notre avis, la possibilité que certaines variations inter- et intra-compartimentales de marquages décrites dans cette thèse soient reliées à l'inactivation de chromosomes X distincts mériterait d'être explorée.

Dans un autre ordre d'idées, des accentuations focales du marquage des CMEM pour la PAe sont observées à proximité : de vaisseaux sanguins fortement marqués pour la PAe; de cellules correspondant possiblement à des éosinophiles (cytoplasme riche en granules rosés; Figure 28 en D). Le marquage pour la PAe démontre des accentuations similaires aux abords de capillaires irriguant des parois et des septa de kystes mammaires associés à un carcinome : ces hausses de marquage enzymatique ne semblent donc pas artéfactuelles. Chez la souris, le développement post-natal de la glande mammaire requiert le recrutement de macrophages et d'éosinophiles au niveau des bourgeons glandulaires distaux^{314,315,316,317}. Les éosinophiles pourraient influencer certains aspects de la physiologie mammaire normale chez l'humain comme chez la souris, ce que suggèrent :

- 1- notre observation d'éosinophiles autour de petits éléments solides de TDLU du sein adulte normal;
- 2- notre observation de variations du marquage pour la PAe dans les CMEM de ces structures;
- 3- l'intensification cyclique de la métachromasie du stroma intra-lobulaire⁵⁷ (hausses suivant immédiatement les pics d'activité mitotique dans l'épithélium);
- 4- l'accumulation d'éosinophiles aux fronts d'invasion de certains carcinomes du sein³¹⁸
- 5- le recrutement d'éosinophiles par des cellules de lignées de carcinome mammaire humain³¹⁹.

Autrement dit, nos travaux suggèrent une implication de la CMEM humaine dans la médiation d'effets encore méconnus des éosinophiles sur la croissance mammaire dans le sein normal et pathologique.

Une régulation différentielle des niveaux d'expression de la kératine 14?

Certaines CMEM du sein adulte normal réagissant de manière opposée sur nos coupes marquées pour la KRT14, nous avons étudié les niveaux d'expression de ce FI par RT-PCR, à l'aide d'échantillons de cellules microdisséquées enrichis en CMEM de CE *versus* en CMEM de TDLU.

D'après nos résultats, les niveaux d'expression de la KRT14 seraient moins homogènes dans le compartiment myoépithélial des TDLU que dans celui des CE du sein

adulte au repos (en ne considérant que les échantillons où l'ADNc de la β 2M a été détecté; résultats dupliqués intégralement, i.e. depuis l'étape de la microdissection). Quoique compatibles avec l'idée d'une régulation différentielle de l'expression de la KRT14 dans l'arbre mammaire (une telle régulation existe dans les poils^{307,308}), nos résultats devront être corroborés sur un plus grand nombre de spécimens pour déterminer si l'hétérogénéité observée traduit une réalité biologique (et non une contamination occasionnée par le système de microdissection utilisé, par exemple).

La cellule myoépithéliale du sein pathologique

En pathologie mammaire, la localisation par IHC de la CMEM humaine vise quatre buts principaux :

- 1- déterminer si un carcinome est de forme *in situ* ou invasive;
- 2- faciliter la détection de foyers de micro-invasion;
- 3- déterminer si une lésion mammaire d'architecture complexe est maligne;
- 4- permettre le diagnostic et l'étude des carcinomes myoépithéliaux malins du sein, des entités rarissimes mais fréquemment agressives.

Parce que trois de ces buts demandent de départager de manière reproductible des «CMEM résiduelles» de «CLUM altérées», la pathologie mammaire s'est surtout intéressée aux caractéristiques musculaires des CMEM; actuellement, les marqueurs ultrastructuraux et immunohistochimiques utilisés en clinique sont majoritairement associés à la différenciation musculaire^{1,1,3,20,20,95,95,320,321,322,323,324,325,326,327}.

Malgré leur intérêt potentiel^{6,7,8,9,10,11,12,13,130,201,216,217,282,328}, les kératines «basales» de CMEM sont rarement ciblées isolément; elles sont plutôt ciblées en groupe pour départager les CMEM des CLUM ou ciblées conjointement avec des kératines luminales pour établir l'origine - épithéliale *versus* mésenchymateuse - de néoplasmes à l'étude. Cette seconde pratique repose sur une théorie qui date du début des années 1980^{329,330,331,332,333}. On croyait alors que le contenu en FI d'une cellule permettait de retracer son origine tissulaire selon les associations : kératines-origine épithéliale, vimentine-origine mésenchymateuse, protéine gliale fibrillaire-origine gliale et neurofilaments-origine nerveuse. Mise en doute par certains³³⁴, cette théorie prédomine toujours en clinique (ex. base de classifications des entités pathologiques, principe d'élaboration des batteries d'anticorps d'IHC diagnostique). Un nombre croissant d'études confirment qu'elle est peu représentative de la réalité, démontrant par exemple que des fibroblastes^{335,336} et des cellules de muscle lisse³⁰⁶ peuvent synthétiser des kératines.

La VIM et les kératines (considérées individuellement) sont souvent omises des batteries standards d'IHC en pathologie mammaire¹; sinon, les résultats générés sont considérés avec méfiance car plusieurs publications ont souligné le caractère inconstant et

hétérogène de leurs distributions et ce, même dans le sein normal. Bien que moins d'études le mentionnent^{1,337}, les protéines associées à la différenciation musculaire montrent pourtant, elles aussi, des limites importantes comme marqueurs de CMEM : manque de sensibilité^{134,135,282}; manque de spécificité, l'antigène étant aussi retrouvé dans certaines CLUM normales ou dans les cellules de carcinomes non myoépithéliaux^{338,339}; signification biologique équivoque³⁴⁰.

Efficacité des marqueurs myoépithéliaux à l'étude vis-à-vis de pratiques usuelles de pathologie mammaire

La majorité des antigènes inclus dans notre devis comme «marqueurs de CMEM» ne sont pas utilisés couramment en clinique. Divers aspects de leurs distributions respectives expliquent le peu d'intérêt qu'ils suscitent, leur fiabilité semblant moindre que celle, déjà imparfaite, des rares marqueurs de CMEM utilisés quotidiennement en pathologie mammaire (surtout l' α SMA). Nos résultats d'IHC corroborent la plupart des données préalablement publiées sur ces marqueurs putatifs et reconnus de la CMEM, leurs «limitations» les plus fréquentes étant :

- 1- un manque de sensibilité,
plus de 5% de cellules d'aspect myoépithélial négatives pour les antigènes : 67LR, CD44v6, KRT14, KRT17, VIM, GFAP, CNN1, S100 β , S100A4 et p63;
- 2- un manque de spécificité inter-tissulaire,
positivité dans le stroma pour les antigènes : 67LR, α 6, β 1, β 4, CD44v6, VIM, α SMA, CNN1, S100 β et S100A4;
- 3- un manque de spécificité intra-tissulaire,
plus de 5% de cellules épithéliales supra-basales et lumorales positives pour les antigènes : 67LR, α 6, β 1, β 4, CD44v6, VIM, S100 β et S100A4.

Tel que mentionné précédemment, nos résultats d'IHC suggèrent que les trois marqueurs de CMEM les plus reconnus en clinique – outre l' α SMA, la CNN1 et le p63 décrits récemment - sont moins efficaces que ce que la littérature prédisait dans le cadre d'usages courants de la localisation de CMEM pour fins de diagnostic. Les paragraphes qui suivent développent ces réflexions, consignées au Tableau XIX, pour les trois premiers usages mentionnés (fréquents) puis pour le quatrième.

Tableau XIX Degré d'efficacité attendu, selon cette étude, de marqueurs myoépithéliaux reconnus et putatifs dans le cadre d'usages actuels de la localisation par immunohistochimie de cellules myoépithéliales en pathologie mammaire

Antigènes	Carcinomes communs <i>In situ</i> ou infiltrants?*	Carcinomes communs Micro-invasifs?*	Lésions complexes Néoplasiques ou non?*	Carcinomes myoépithéliaux Diagnostic, étude (C.ME.)
67LR ^{142,234,297}	n	n	n	i
α6 ^{127,133,137,179,218}	n	n	n	ND
β1 ^{127,133,137,179,218,237,237}	n	n	n	i
β4 ^{127,137}	n	n	n	ND
CD10 ¹³¹	i	i	i	ND
CD44v6 ^{240,341}	n	n	n	i
KRT14 ^{1,131,132,134,192,197,201,242,301,311,342}	f	f	f	é**
KRT17 ^{1,125,242}	f	f	f	é
VIM ^{1,125,126,131,134,191,192,197,311,343}	f	f	f	é**
GFAP ^{126,131}	n	n	n	f
αSMA ^{1,126,131,134,135,191,192,197,311,324,325,338,339,343,344}	i	f	f	é**
CNN1 ^{1,282,303}	f	f	f	i
S100β ^{129,249,268,269}	f	f	f	é
S100A4 ^{141,249}	f	f	f	i
p63 ^{123,252,296}	i	f	i	é

Légende : C.ME., composante myoépithéliale; é, élevé; f, faible; i, intermédiaire; n, nul; ND, non disponible.

N.B. Nos réflexions corroborent les conclusions des études citées en caractères standards; en cas de contradiction très claire, l'étude est citée en italique; ces énumérations ne sont pas exhaustives. Selon la littérature, les antigènes-cibles soulignés ont déjà été localisés dans les cellules de carcinomes agressifs présumément dérivés de CLUM – voir la dernière colonne du Tableau X (Matériel et méthodes).

* Usage fréquent – souvent quotidien – dans les hôpitaux pour adultes.

** Ces réflexions ont été publiées¹⁹⁴ relativement au cas de myoépithéliome malin de notre cohorte (spécimen T16).

En fait, d'après nos résultats et notre revue de littérature, aucun des antigènes-cibles inscrits au Tableau XIX ne présente un degré d'efficacité «élevé» vis-à-vis des trois usages fréquents de marqueurs de CMEM en clinique. Cette constatation s'appuie notamment sur les faits suivants :

- 1- tous ces antigènes présentaient une sensibilité imparfaite comme marqueurs de CMEM, l'utilisation des moins sensibles d'entre eux (67LR, CD44v6, KRT14, KRT17, VIM, GFAP, CNN1, S100β, S100A4 et p63) risquant d'entraîner une sur-évaluation de la gravité de certaines lésions;

- 2- onze de ces antigènes manquaient de spécificité inter-tissulaire comme marqueurs de CMEM, leur utilisation risquant d'entraîner une sous-évaluation de la gravité de certaines lésions (67LR, $\alpha 6$, $\beta 1$, $\beta 4$, CD44v6, VIM, GFAP, α SMA, CNN1, S100 β et S100A4);
- 3- huit de ces antigènes manquaient de spécificité intra-tissulaire comme marqueurs de CMEM, leur utilisation risquant d'entraîner une sous-évaluation de la gravité de certaines lésions (67LR, $\alpha 6$, $\beta 1$, $\beta 4$, CD44v6, VIM, S100 β et S100A4);
- 4- presque tous ces antigènes peuvent être localisés dans les cellules de carcinomes non myoépithéliaux du sein. Leur utilisation pourrait favoriser la sous-évaluation de l'étendue et de la gravité de certains carcinomes, de petits foyers d'invasion risquant d'être mépris pour des structures glandulaires péri-lésionnelles ou pour de petites structures vasculaires, par exemple.

Nos résultats dans le sein adulte normal attribuent au CD10 (syn. CALLA) une efficacité potentielle supérieure à celles des autres antigènes ciblés vis-à-vis des trois principaux usages actuels de la localisation de CMEM par IHC en pathologie mammaire (bonne sensibilité et bonne spécificité, inter- et intra-tissulaire). Le CD10 est utilisé comme marqueur de différenciation myoépithéliale mammaire depuis plusieurs années par les milieux de recherche, principalement pour effectuer des triages cellulaires à partir de tissus; la technique de *fluorescent magnetic activated cell sorting* (FACS), par exemple, permet la séparation de cellules positives pour le CD10 (identifiées comme CMEM) et de cellules positives pour un marqueur de CLUM (typiquement la mucine MUC-1). Malheureusement, ce marqueur myoépithélial reste méconnu et sous-utilisé en milieu hospitalier. Faute de tissus congelés, nos spécimens de carcinomes myoépithéliaux n'ont pu être marqués pour le CD10. Des anticorps anti-CD10 utilisables sur tissus fixés et inclus en paraffine ont récemment été commercialisés mais leur efficacité demeure variable; d'après nos données sur la distribution du CD10 dans le sein normal et pathologique, des anticorps anti-CD10 fiables sur paraffine pourraient contribuer de façon importante à la localisation de CMEM humaines, en clinique comme en recherche, au cours des prochaines années.

Dans le sein adulte normal au repos, les CMEM de TDLU positives pour l' α SMA et le p63 forment une couche fréquemment discontinue; plusieurs brèches de cette couche permettent vraisemblablement le passage de cellules épithéliales négatives pour l'un et/ou

l'autre de ces antigènes (Figure 15 en C à E). Le recours à l' α SMA ou au p63 comme marqueur de CMEM semble dès lors moins justifié pour identifier des foyers de micro-invasion (risque de résultats faux-positifs). L'utilisation de l' α SMA ou du p63 comme marqueur de CMEM semble à peine plus indiqué pour distinguer des lésions non néoplasiques complexes de néoplasmes : leur distribution est inégale parmi les CMEM de nombreuses lésions non néoplasiques (ex. CMEM de kystes comme celui illustré à la Figure 24) et parmi les CMEM résiduelles de certains néoplasmes. Notre vérification de ces limites connues de l' α SMA comme marqueur de CMEM^{135,338} confirme l'importance de ne pas l'utiliser seul lors d'investigations par IHC de lésions mammaires³³⁹. Nos résultats tempèrent l'enthousiasme récemment manifesté vis-à-vis de l'efficacité du p63 comme marqueur de CMEM résiduelles à des fins diagnostiques^{252,296}; ils confirment par contre que le p63 pourrait compléter avantageusement les batteries d'anticorps utilisées en sénologie fondamentale et appliquée.

Vue l'importance accordée à la CLUM pathologique au cours des dernières années, le recours à des batteries de marqueurs de CMEM n'a pas été et n'est encore pas la norme^{1,95} : la plupart des études d'IHC impliquent rarement plus de deux ou trois marqueurs «très sensibles» de CMEM (typiquement l' α SMA ou un autre marqueur de différenciation musculaire). Tel que mentionné précédemment, notre batterie d'anticorps souligne la présence de cellules de carcinomes de formes communes positives pour divers antigènes myoépithéliaux, par exemple :

- 1- des cellules cancéreuses positives pour la KRT14 et/ou la KRT17 concentrées aux fronts d'invasion de carcinomes canauxaires de haut grade (Figure 21 en A et B; Figure 22 en B);
- 2- des cellules positives pour la KRT14, la KRT17 et diffusément positives pour l' α SMA dans certains foyers *in situ* d'un carcinome lobulaire de haut grade (Figure 23 en C, E et G);
- 3- des cellules cancéreuses positives pour la KRT14, la KRT17 et le p63 dans un foyer, facile à méprendre pour un vaisseau sanguin, d'un carcinome canalaire résistant au raloxifène (Figure 20).

Beaucoup d'auteurs ont ignoré ou automatiquement attribué une origine artéfactuelle à des données semblables; ils considéraient le caractère partiellement basal de ces cellules cancéreuses comme aberrant en raison :

- 1- de la réputation de «cellule accessoire terminalement différenciée» de la CMEM;
- 2- de leur conviction que la CMEM ne participe pas à la genèse des formes communes de carcinomes mammaires et qu'elle agit en fait comme une alliée de l'hôte en s'opposant à la progression néoplasique^{202,203,204,205,206,207,208} (directement et/ou indirectement, activement et/ou passivement).

Devant des données similaires, d'autres chercheurs ont plutôt formulé l'hypothèse à contre-courant d'une «implication myoépithéliale parfois insoupçonnée»^{6,7,8,9,10,11,12,13,201}. Les résultats de recherches récentes effectuées par IHC, par analyse de perte d'hétérozygotie, par hybridation génomique comparative et par *microarrays* d'ADN^{4,5,114,154,209,213,214,215,216,217}, appuient clairement cette thèse. Nos travaux supportent ce courant idéologique souvent dénigré, initié il y a plus de 30 ans^{153,210,211,212}.

Des marqueurs pour l'étude et le diagnostic de carcinomes myoépithéliaux

Les limitations des marqueurs discutées ci-dessus s'avèrent moins problématiques vis-à-vis d'un autre usage de la localisation de CMEM par IHC en pathologie mammaire, soit le diagnostic/l'étude de carcinomes myoépithéliaux du sein (purs, mixtes). La littérature mentionne moins souvent cet usage, ces carcinomes semblant rarissimes. Les propriétés antigéniques de leurs CMEM pathologiques ne sont pas toujours documentées de manière extensive; lorsqu'elles le sont, elles présentent typiquement des différences intra- et inter-cas marquées^{191,343,344,345}.

Nos résultats d'IHC pour les cas T14 et T16 confirment et complètent la littérature disponible sur les adénomyoépithéliomes et myoépithéliomes malins du sein, ces entités dont la patho-physiologie reste obscure et qui s'avèrent souvent agressives^{192,194,195}; nos données démontrent l'intérêt de cibler de multiples antigènes myoépithéliaux pour les caractériser, leurs CMEM pathologiques adoptant de multiples profils altérés.

Tel que mentionné dans la légende de la Figure 25, en accord avec la littérature^{195,344}, les CMEM pathologiques de notre cas d'adénomyoépithéliome malin

forment des foyers d'aspect organoïde (Figure 25, cas T14); par leur morphologie générale et les propriétés antigéniques de leurs populations cellulaires, ces foyers ressemblent beaucoup aux tPS de nos spécimens foetaux de plus de 20 semaines (ex. Figure 25). Bien qu'à un degré moindre que le carcinome du cas T14, toutes les lésions étudiées présentent des foyers d'aspect focalement plus organoïde que chaotique. Ces observations rejoignent celles faites par Bissell et coll. à l'aide de systèmes de culture cellulaire tridimensionnels³⁴⁶ (aspect remarquablement organoïde de cultures de lignées mammaires cancéreuses).

Le myoépithéliome malin de notre cohorte était accompagné de nodules satellites suspects (cas T16); des éléments glandulaires typique de l'un de ces nodules présente des «inclusions intra-épithéliales» d'aspect très variable (Figure 26 en M à O). L'examen de coupes sériées permet de constater qu'il s'agit en fait souvent de travées de mésenchyme anormal plutôt que de nodules isolés; ces travées et les cellules épithéliales qui les bordent sont continues avec le mésenchyme mammaire environnant et les CMEM locales. Chez des patientes présentant un myoépithéliome malin, l'excision de tels nodules pourrait être justifiée même s'ils semblent bénins, vu le comportement souvent agressif et imprévisible des carcinomes myoépithéliaux malins et le peu de données disponibles à leur sujet (moins de 10 cas confirmés dans la littérature).

Les marqueurs ciblés par nos travaux semblent particulièrement intéressants pour étudier la biologie des carcinomes myoépithéliaux mammaires - qu'ils soient employés seuls, pour des doubles-marquages ou inclus dans des batteries d'anticorps. Nous avons par ailleurs proposé que le diagnostic de carcinomes myoépithéliaux de forme pure peut être confirmé par des doubles-marquages d'IHC¹⁹⁴ : au besoin, un double-marquage d'IHC pour la KRT14 et l' α SMA peut remplacer l'ultrastructure pour le diagnostic de myoépithéliomes malins du sein, ce diagnostic nécessitant la mise en évidence d'une coexpression à l'échelle *cellulaire* (et non simplement tumorale) de kératines basales et de protéines de muscle lisse.

Des CMEM pathologiques positives pour la GFAP ont été occasionnellement décrites^{248,347,348,349}. Des cellules allongées positives sont présentes dans un foyer d'une coupe du cas T14 marquée pour la GFAP (non illustré), mais leur disposition ne permet pas de les identifier avec certitude comme «CMEM pathologiques» (le manque de matériel, pour ce cas et le cas T16, nous a empêché d'approfondir cette question); ceci explique le

degré «faible» d'efficacité attendue attribué à cet antigène vis-à-vis de ce quatrième usage de la localisation par IHC de CMEM en clinique (Tableau XIX).

Enfin, les CMEM pathologiques de notre cas de myoépithéliome malin présentent un moins grand nombre de profils antigéniques distincts que les CMEM pathologiques de notre cas d'adénomyoépithéliome mammaire malin. Cette observation supporte l'hypothèse voulant que des progéniteurs épithéliaux communs aux lignées luminale et myoépithéliale du sein donnent naissance aux carcinomes myoépithéliaux mixtes¹⁵⁴; elle suggère par ailleurs que les myoépithéliomes malins purs seraient issus de progéniteurs *myoépithéliaux* altérés. La découverte de l'aspect monoclonal de vastes territoires du sein adulte normal^{96,97,313} et l'existence d'altérations génétiques communes aux CLUM et CMEM d'adénomyoépithéliomes du sein^{5,154} semblent appuyer cette hypothèse.

La demande - irréaliste? - faite aux marqueurs du phénotype myoépithélial mammaire

Nos antigènes-cibles présentent des limitations importantes vis-à-vis de trois usages actuels de la localisation par IHC de CMEM en oncologie (i.e. déterminer si un carcinome est de forme *in situ* ou invasive, faciliter la détection de foyers de micro-invasion et déterminer si une lésion mammaire d'architecture complexe est maligne). De prime abord, nos résultats semblent confirmer :

- 1- le besoin de poursuivre la recherche d'antigènes myoépithéliaux susceptibles de remplir plus efficacement ces rôles;
- 2- la nécessité d'utiliser, en clinique, des batteries d'anticorps anti-CMEM plus complètes;
- 3- l'intérêt d'optimiser de telles batteries d'anticorps anti-CMEM en fonction de contextes pathologiques spécifiques (ex. choix de quelques kératines basales - ciblées individuellement - pour le dépistage de carcinomes myoépithéliaux).

La synthèse des données fournies par les trois volets de notre caractérisation de la CMEM humaine nous a pourtant amenés à pousser plus loin cette réflexion. En effet, la manière actuelle d'évaluer la sensibilité des marqueurs de CMEM suppose que les CMEM du sein adulte normal forment une population cellulaire homogène, partageant un immunophénotype unique. Or, nos travaux ont mis en évidence de nombreuses variations

du phénotype myoépithélial dans le sein adulte normal; ces variations ne sont pas que morphologiques. Parce qu'elles sont non aléatoires, inter-reliées et démontrables dans tous nos spécimens de sein adulte normal, ces variations confirment la coexistence de CMEM similaires mais néanmoins distinctes dans l'épithélium du sein adulte normal au repos²⁸². D'après nos données de MO, d'IHC et de colorations pour la PAe, des CMEM qui partagent certaines propriétés sont souvent regroupées dans l'espace. D'après nos données de MO, d'IHC, de colorations pour la PAe et possiblement aussi de RT-PCR, par exemple, les CMEM de CE et de TDLU normaux différencieraient les uns des autres aux plans morphologique, antigénique et physiologique.

Cette réalité biologique méconnue pourrait expliquer la grande difficulté d'identifier des marqueurs myoépithéliaux hautement spécifiques et sensibles de «la CMEM humaine», ce mandat exigeant d'eux qu'ils soient spécifiques et sensibles pour des entités immunophénotypiquement distinctes. Les marqueurs myoépithéliaux les plus sensibles, selon la vision actuelle des CMEM, sont donc peu spécifiques (ex. marquage concomitant de cellules stromales par l' α SMA, la VIM, les protéines S100, etc) et vice-versa (ex. KRT14 et KRT17 très spécifiques, mais ne marquant que des sous-groupes de CMEM). Ceci expliquerait par ailleurs les nombreuses controverses entourant la valeur informative, en pathologie mammaire appliquée, de tous les marqueurs de CMEM utilisés dans cette étude^{1,20,95,217,303}.

Quoique prédominant en sénologie, le concept selon lequel l'épithélium du sein ne comporte que deux types cellulaires terminalement différenciés (angl. *two-cell concept*) occulterait la réalité et freinerait l'acquisition de nouvelles connaissances^{292,350}. Relégué aux oubliettes par plusieurs chercheurs engagés dans la quête des insaisissables précurseurs "ultimes" du sein adulte (ceux-ci trébuchant sur des progéniteurs transitoires presque aussi nombreux qu'eux...; réf. revue de Smalley et Ashworth¹⁰⁰), ce concept demeure très influent en sénologie. Même récents, les modèles actuels de physiologie mammaire s'appuient encore sur le *two-cell concept* ou sur une de ses nombreuses variantes, i.e. des concepts «oligo-cellulaires» reconnaissant notamment l'existence :

- 1- de CLUM, de CMEM canaux et de CMEM lobulaires¹²⁵;
- 2- de CLUM canaux, de CLUM lobulaires et de CMEM^{105,351};
- 3- de CLUM, de CMEM et de progéniteurs supra-basaux multipotents²⁹².

Le *two-cell concept* demeure par ailleurs omniprésent en clinique en tant que fondement de pratiques et de schèmes de raisonnement utilisés quotidiennement en pathologie mammaire appliquée. Cette vision réductionniste se serait ouvertement opposée et s'opposerait encore, mais moins explicitement, à la reconnaissance de l'existence et de l'importance physiologique des différentes CMEM du sein normal... et pathologique (ex. en tant que fondement conceptuellement inexact des critères de sélection des marqueurs de CMEM). En effet, parce que le phénotype de la majorité des cellules de la plupart des cancers du sein est jugé «incomplètement luminal mais encore moins myoépithélial», l'oncologie se préoccupe presque exclusivement des CLUM depuis des décennies.

De multiples phénotypes myoépithéliaux résiduels... et péri-lésionnels

Les propriétés des CMEM résiduelles présentent des variations^{13,125,324,325,328,352,353} qui ont rarement été documentées^{114,282,354}. Notre étude parallèle de diverses lésions mammaires confirme que des CMEM résiduelles et péri-lésionnelles présentent des variations d'immunophénotype non aléatoires qui ne sont pas qu'artéfactuelles :

- 1- les CMEM altérées de lésions non néoplasiques présentent des phénotypes très variables mais souvent uniformes de façon focale (Figure 16 en E; Figure 24 en D);
- 2- les CMEM résiduelles présentent habituellement des immunophénotypes différents en fonction du type de carcinome «commun» qu'elles bordent et, le cas échéant, de leur position par rapport aux fronts d'invasion (Figures 16, 19, 22, 24);
- 3- les CMEM péri-lésionnelles de TDLU arborent fréquemment un profil antigénique plus typique des CMEM de CE que de TDLU du sein normal (Figure 23 en B).

Ces variations impliquent moins souvent l' α SMA et le p63 que la KRT14, la KRT17, la VIM, la CNN1, la S100 β . Plusieurs d'entre elles semblent coordonnées et associées à des variations non aléatoires de marquages pour le CollIV, le CollVII, la LN5, l'EMA, la KRT19, le CD34, le Ki67 et le CEA. Une cohorte plus considérable permettrait d'étudier les potentiels diagnostique et pronostique inexplorés de ces variations en pathologie. L'utilisation de coupes sériées et la documentation systématique de foyers sélectionnés ont été cruciales pour mettre en évidence le caractère non aléatoire de certaines de ces variations phénotypiques. À notre avis, la reconnaissance de l'existence de sous-groupes de CMEM résiduelles et péri-lésionnelles pourrait être retardée du fait que ces deux pratiques ne sont pas exigées pour la publication de résultats d'IHC en sénologie.

Deuxième partie : une redéfinition et un modèle de croissance physiologique

Les variations d'IHC mises en évidence par nos travaux impliquent des marqueurs de CMEM, de lame basale, de CLUM, de fibroblastes stromaux et de prolifération cellulaire (collaboration en cours avec le Dr André Tremblay concernant des récepteurs d'hormones stéroïdiennes). Reproductibles et souvent inter-reliées, très similaires dans le sein fœtal, adulte normal et pathologique, ces variations délimitent des «compartiments» glandulaires déjà pressentis ou reconnus comme morphologiquement/fonctionnellement distincts dans la glande mammaire humaine normale et lésée. Nos données s'opposent ainsi au concept selon lequel l'épithélium mammaire ne comporterait que deux populations principales de cellules aux propriétés homogènes; en fait, nos travaux questionnent même la pertinence de définir des sous-populations myoépithéliales et luminales, l'existence de variations «intra-compartimentales» topographiques soulignant le caractère plastique des CMEM et des CLUM (ex. marquage pour le Ki67, marquage pour la PAe). Les variations phénotypiques non aléatoires décrites dans cette thèse s'accordent mal avec l'idée reçue selon laquelle une CMEM ou une CLUM s'engage de façon quasi-irréversible dans un processus de différenciation défini.

D'après un nombre croissant d'études réalisées *in vitro*, les capacités fonctionnelles de la CMEM humaine seraient largement sous-estimées. Elles influenceraient par exemple les processus de polarisation et de croissance épithéliales^{44,105,139,160,203,216,355,356,357,358,359,360} par l'établissement d'adhésions cellule-cellule spécifiques, par la synthèse de facteurs de croissance à action paracrine et autocrine, par la synthèse de constituants d'ECM précis et le remodelage de la lame basale mammaire, par l'initiation et la terminaison de mouvements de mobilisation cellulaire, etc. Malheureusement, les données discordantes obtenues à l'aide de systèmes expérimentaux distincts ravivent des controverses, ajoutant à la confusion générale qui entoure les propriétés de la CMEM humaine. Par exemple, des publications récentes la désigne tantôt une «alliée de l'hôte agissant comme suppresseur naturel d'angiogenèse et d'invasion»^{203,204,205,207,208}, tantôt comme une cellule «naturellement invasive» et/ou «à l'origine de cancers particulièrement agressifs»^{4,5,209,215,216}. Sur la base de travaux effectués principalement chez le rat, Deugnier et coll. (2002) proposent que l'hétérogénéité du phénotype des CMEM animales et humaines pourraient témoigner des

différentes origines et fonctions des cellules basales de l'épithélium mammaire¹⁵⁹. Nos observations supportent davantage cette vision de la CMEM : elle admet que les CMEM ne forment pas un groupe cellulaire homogène et ne sont possiblement pas engagées dans une seule et même voie de développement. La présente caractérisation permet d'ajouter:

- 1- que la variabilité du phénotype myoépithélial mammaire humain n'est pas aléatoire dans l'espace;
- 2- que les variations d'aspects distincts du phénotype myoépithélial mammaire humain sont inter-reliées;
- 3- que la variabilité du phénotype myoépithélial mammaire humain n'est pas un phénomène isolé au niveau de la jonction épithélio-stromale du sein, les propriétés d'autres constituants de cette unité fonctionnelle présentant des variations non aléatoires coordonnées avec certaines variations phénotypiques des CMEM.

Nos travaux sur tissus humains s'opposent aux notions très ancrées selon lesquelles la CMEM est une «cellule terminalement différenciée» et «accessoire». Rarement contestées^{158,159}, ces réputations n'ont pas fait l'objet de démonstrations formelles mais ont été alimentées par les nombreuses incertitudes et controverses qui entourent ce type cellulaire depuis sa description initiale. En fait, la littérature de sénologie renferme des données similaires aux nôtres, mais disséminées au point de perdre leur potentiel informatif. Notre étude systématique d'échantillons de sein foetal et adulte normal démontre clairement – consulter au besoin l'Annexe VIII - que les cellules basales/myoépithéliales du sein:

- 1- sont plus susceptibles de participer à l'établissement et à la médiation d'interactions épithélio-stromales que tout autre type cellulaire de l'épithélium mammaire d'après leur position, la modulation de leur activité enzymatique à proximité de cellules de défense, les associations existant entre les variations phénotypiques de ces cellules et les attributs de la lame basale et du mésenchyme sous-jacents, mais aussi leur profil antigénique (résultats d'IHC pour la KRT14, le 67LR, l' α 6, la β 1 et la β 4);
- 2- peuvent proliférer du fait que certaines d'entre elles renferment plusieurs noyaux, présentent des figures mitotiques, sont Ki67(+), KRT17(+) et/ou VIM(+);
- 3- ne semblent pas terminalement différenciées d'après leur profil antigénique (résultats d'IHC pour la KRT17, la VIM et la S100A4);

- 4- présentent des attributs typiques de progéniteurs d'épithéliums humains, notamment : des figures mitotiques asymétriques (résultats d'IHC pour le p63 et le Ki67); une co-immunoréactivité pour des FI de classes différentes (KRT14, KRT17 et VIM); une réaction variable pour le p63 à l'instar de cellules multipotentes de la peau (Figure 12); la non-expression focale de la KRT14 à l'instar de cellules d'amplification transitoire de la matrice pileuse³⁰⁷; des membranes CD10(+). Sur la base de résultats préliminaires concernant le sein foetal, nous avons d'ailleurs proposé¹⁷² que ces cellules basales/myoépithéliales pourraient être des constituants cruciaux du micro-environnement de progéniteurs mammaires et/ou même agir comme progéniteurs dans certains contextes. Nos données additionnelles semblent valider ces deux propositions, chez le fœtus mais aussi chez l'adulte.

Parce que les interactions épithélio-stromales sont au coeur de la physiologie mammaire^{171,361,362}, la première de ces constatations confère à elle seule une importance énorme à la CMEM humaine. Ce type cellulaire serait en effet essentiel à l'accomplissement de processus aussi complexes que la croissance physiologique, processus impliquant des événements transitoires de prolifération et de mobilisation cellulaires qui doivent être coordonnés et étroitement régulés. Ces processus requièrent fréquemment qu'une même cellule change radicalement de comportement lorsqu'exposée à des stimuli de nature et d'ampleur très variables. Or, la CMEM humaine présente justement des propriétés décrites comme très «hétérogènes» *in vivo*, propriétés qui ne peuvent être parfaitement reproduites *in vitro* (les CMEM et les cellules de lignées d'aspect myoépithélial mises en culture adoptant des propriétés distinctes et variables selon le milieu utilisé^{363,364,365}). Ironiquement, cet obstacle technique à la caractérisation de la CMEM humaine serait donc en lui-même un indice majeur de son potentiel physiologique non reconnu – comme de nombreuses contradictions concernant ses propriétés dans la littérature. Ainsi, la CMEM serait un peu à la physiologie de l'épithélium mammaire ce que le p53 est à la physiologie cellulaire, c'est-à-dire un élément-clé de processus dont les conséquences biologiques peuvent être contraires. Son étude et sa définition seraient d'autant plus difficiles qu'à l'instar du p53, elle semble être constamment «l'exception qui confirme la règle» des schèmes de pensée actuels.

Redéfinition des cellules myoépithéliales du sein

À la lumière de notre revue de littérature, de nos observations personnelles et des réflexions précédentes, nous nous proposons de redéfinir les CMEM humaines comme suit : des dérivés de progéniteurs épithéliaux multipotents qui ont adopté des états de type basal, conservant souvent un potentiel de prolifération et un potentiel de différenciation non nuls; certains états basaux permettraient la genèse de progéniteurs multipotents *de novo* par le biais de mitoses asymétriques. Les CMEM moduleraient et seraient continuellement modulées par leur micro-environnement via des interactions de nature biochimique, spatiale, physique et autres. Chaque CMEM serait unique et ses propriétés, à un instant précis, résulteraient de ses potentiels réalisés, en voie de l'être et latents. L'exposition de progéniteurs possédant des propriétés analogues à des micro-environnements similaires ou homogènes mènerait cependant à leur adoption d'états relativement uniformes. Le compartiment myoépithélial de l'épithélium du sein normal comprendrait des acteurs physiologiques de premier plan de la jonction épithélio-stromale (médiation d'interactions épithélio-stromales cruciales pour la morphogenèse puis le maintien de l'homéostasie glandulaires, activité progénitrice, etc.).

En accordant une grande importance au micro-environnement et non seulement au temps, notre redéfinition de la CMEM adopte une approche spatio-temporelle de la physiologie mammaire. De prime abord, son énoncé semble donc plus complexe que celui de définitions usuelles de la CMEM. Contrairement à ces dernières, basées sur le concept de «programme pré-établi de différenciation», notre définition ne présume pas que les CMEM normales sont engagées dans *un* processus de *maturation* aboutissant à un état de «différenciation terminale» spécifique (approche temporelle). De ce fait, notre définition semble plus apte à rendre compte de la variabilité non aléatoire de nos résultats et de ceux obtenus par d'autres groupes à l'aide de milieux de culture cellulaire tridimensionnels^{42,46,158,346,346}, par exemple. Nos travaux soulignent ainsi l'intérêt, pour la sénologie, d'approches scientifiques dites «de logique floue» (angl. *fuzzy-logic*; voir notamment^{366,367}): ces approches plus probabilistes que déterministes permettent d'analyser les multiples facettes de réalités biologiques complexes parce qu'elles font appel à des définitions peu rigides. Le caractère réductionniste de paradigmes actuels tend à freiner l'étude de certaines de ces facettes, s'opposant parfois à leur existence pourtant

démontrable expérimentalement. Nos travaux suggèrent que des controverses relatives à la CMEM ne pourraient être résolues malgré la mise au point de techniques d'analyse toujours plus sophistiquées : certaines controverses découleraient de schèmes de pensée réductionnistes menant à des interprétations biaisées des informations recueillies et non d'un manque d'informations ou d'informations invalides. Le manque de consensus concernant les marqueurs myoépithéliaux les plus performants pour fins de diagnostic en pathologie mammaire¹ en serait un exemple, tel que discuté plus tôt (section La demande – irréaliste ? – faite aux marqueurs du phénotype myoépithélial mammaire; commentaire sur la recherche de marqueurs «sensibles et spécifiques» pour le phénotype de CMEM normales-résiduelle).

Un modèle de l'initiation de la morphogenèse du sein *in utero*

La définition de CMEM proposée ci-dessus sert de prémisse à ce modèle de la dynamique de croissance épithéliale dans le sein normal foetal (deuxième trimestre gestationnel).

Tel que mentionné dans la première partie de la discussion, les propriétés des cellules basales de PS de nos spécimens de sein foetal rappellent beaucoup celles des cellules basales dans la glande mammaire foetale des rongeurs (voir notamment^{155,156,280}). Sapino et coll.²⁷⁹ ont étudié les cellules basales mammaires chez la souris, à l'aide d'explants mammaires maintenus dans un milieu riche en oestrogènes, en prolactine et en facteur de croissance épidermique. De nombreuses similarités existent entre les ePS de nos échantillons de sein foetal et les terminaisons mammaires bulbeuses de souris, ces dernières démontrant : une atténuation proximo-distale de l'immunophénotype épithélial basal; une variation plus marquée du phénotype basal en amont et en aval du collet des extrémités renflées (une région de la glande murine similaire à la jonction tPS-ePS du sein foetal humain); l'association à une lame basale CollIV(+) de *cap cells* négatives pour l' α SMA et diverses kératines (dont la KRT14).

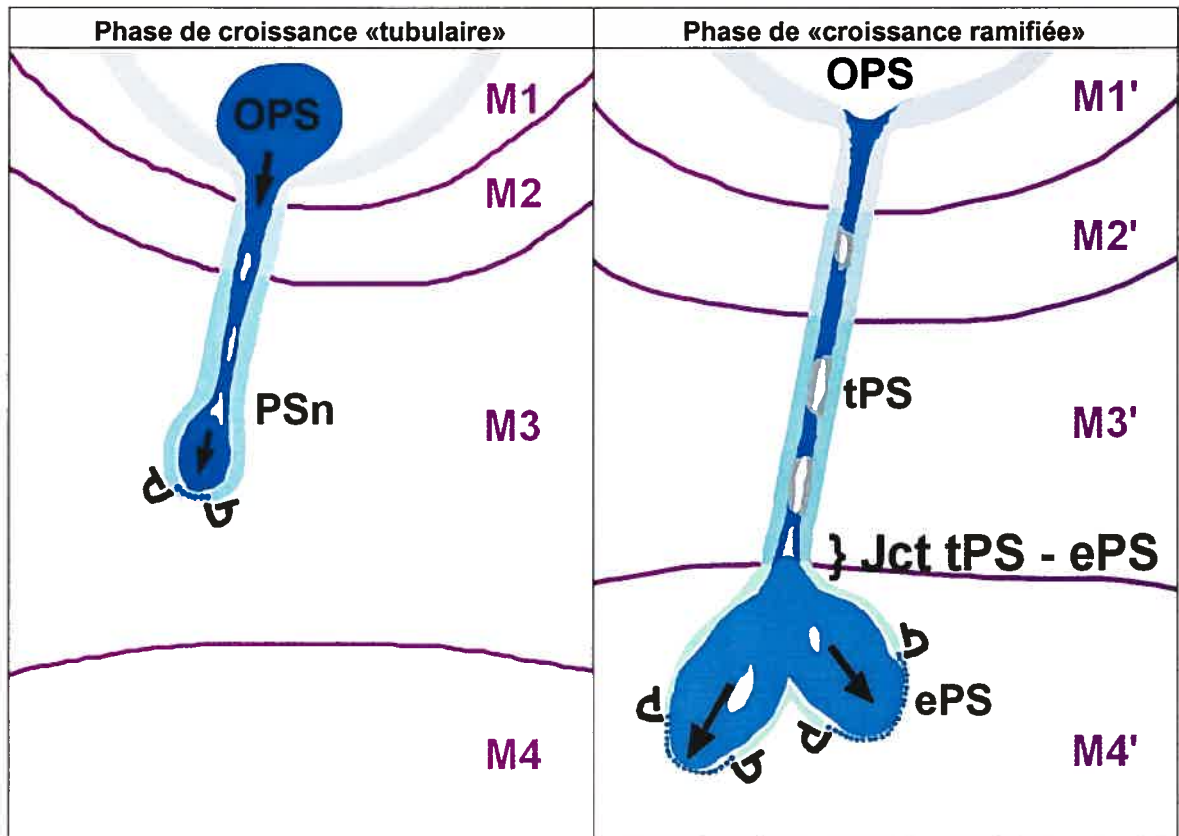
Alors que le courant général attribuait et attribue toujours un rôle de progéniteur totipotent aux *cap cells* des rongeurs, Sapino et coll. proposent qu'elles constitueraient plutôt des cellules «de pavage»; d'après eux, les cellules souches mammaires seraient situées derrière les *cap cells* et proliféreraient activement au centre des projections – non à

leurs extrémités. Cette réflexion originale, non reprise dans la littérature récente, s'accorde pourtant particulièrement bien avec nos résultats de MO et d'IHC concernant la région mammaire foetale humaine (ex. distribution du Ki67 dans la glande mammaire murine foetale similaire à celle observée chez l'humain; Figure 13 en T).

La Figure 34 de la page suivante illustre notre perception de l'initiation de la morphogenèse mammaire humaine entre 15 et 24 semaines de gestation. D'après ce modèle, des mésenchymes distincts seraient largement responsables de la genèse de structures épithéliales aux architectures différentes (tubulaire *versus* ramifiée). Les paragraphes qui suivent expliquent ces propos.

Les PS mammaire foetales présenteraient des zones épithélio-stromales distinctes, incluant des cellules basales de PS dissemblables parce qu'exposées à des couches de mésenchyme différentes (d'où l'utilisation de quelques tons de vert pour les représenter vis-à-vis des quatre couches du mésenchyme de soutien). Les progéniteurs épithéliaux multipotents jouissant vraisemblablement d'une grande plasticité, les schémas de la Figure 34 ne seraient pas pleinement représentatifs de la variété des phénotypes qu'ils adoptent dans le sein foetal. Les apostrophes des désignations M1' à M4' rappellent que la composition des couches du mésenchyme de soutien n'est probablement pas fixe (remodelages associés au processus de croissance épithéliale).

Figure 34 Modèle proposé de l'initiation de la morphogénèse du sein *in utero* (deuxième trimestre de gestation)



Légende : ePS, extrémité de projection secondaire; Jct tPS-ePS, jonction tige-extrémité d'une projection secondaire; M#, couches spécifiques du mésenchyme (début de la morphogénèse); M#', couches spécifiques du mésenchyme (pendant la morphogénèse); OPS, origine d'une projection secondaire au niveau du bourgeon primaire; PSn, projection secondaire naissante; tPS, tige de projection secondaire.

Les **teintes de bleu** identifient des progéniteurs épithéliaux multipotents, très plastiques, qui prolifèrent dans les compartiments supra-basaux et centraux des PS; ils modulent et sont modulés par le mésenchyme (ECM, cellules) qu'ils touchent directement. Le **noir** identifie les possibilités de parcours de ces progéniteurs : les flèches impliquent leur mobilisation; les lignes coiffées de traits plats impliquent leur immobilisation. Dans les PS : les **teintes de vert** identifient des progéniteurs qui ont adopté un phénotype basal (au contact d'ECM, de stroma); les **traits courbes en pointillé bleu** identifient des progéniteurs qui viennent d'adopter un phénotype basal permettant le pavage; les **espaces blancs non bordés de gris** sont des lacunes divisant des progéniteurs multipotents (peu cohésifs entre eux) ou des progéniteurs multipotents et des progéniteurs ayant acquis un phénotype de pavage; les **espaces blancs bordés de gris foncé** identifient des lumières glandulaires naissantes, bordées de progéniteurs qui ont adopté un phénotype luminal. Le **violet** identifie le mésenchyme de soutien mammaire foetal.

N.B. La taille de certains éléments de la figure a été exagérée pour fins de clarté.

D'après notre modèle, l'initiation de la morphogenèse du sein foetal (deuxième trimestre gestationnel) ferait appel aux mécanismes de croissance suivants :

- 1- de petites condensations de cellules supra-basales se formeraient à l'aspect baso-latéral du BP; un stimulus possiblement mésenchymateux procurerait un contexte propice à la prolifération de cellules basales du BP. En MO, certaines de ces cellules semblent vacuolées (Figure 13 en G et S). En IHC, ces cellules supra-basales présentent un profil antigénique différent des cellules de PB qui les entourent (résultats d'IHC pour le CD10, le CD44v6, la KRT14, la KRT17, la VIM, le p63, le Ki67 et la KRT19 aux Figures 11 à 13). L'examen de coupes tissulaires sériées (spécimens âgés de 20 semaines et plus) confirme que ces regroupements sont associés à l'origine des PS. Ces agglomérations cellulaires supra-basales contiendraient les progéniteurs multipotents «initiaux» du sein. Leur position dans les PS le suggère, tout comme plusieurs facettes de leur profil antigénique - des indices documentés de multipotence/pluripotence (ex. réactions positives pour le CD10^{238,357,358}, la KRT17^{277,368,369}, la KRT19 et le Ki67; co-marquage pour des kératines et la VIM^{6,11,157,201,277}; absence de réaction pour le p63^{291,370}). Tel que le souligne la Figure 12, de nombreuses similitudes existent d'ailleurs entre les caractéristiques morphologiques et antigéniques des cellules de ces agglomérations et les progéniteurs multipotents de la peau (renflements pileux) et les cellules d'amplification transitoire des poils (matrice pileuse);
- 2- les progéniteurs multipotents proliféreraient rapidement et déformeraient l'aspect basal du BP, ceci s'accompagnant d'un remodelage local de la lame basale. Comme toutes les PS de nos spécimens reposent sur des lames basales ininterrompues positives pour la LN5 et le CollVII, les progéniteurs synthétisent vraisemblablement des constituants d'ECM au contact des différentes couches du mésenchyme qu'ils rencontrent;
- 3- d'après le concept proposé par Sapino et coll.²⁷⁹, les progéniteurs adopteraient un phénotype «de pavage» lorsque repoussés en périphérie des fronts de croissance (ex. à l'aspect basal de protubérances de BP, puis à l'extrémité des PS qui en émergent). L'intensité et la distribution des marquages obtenus pour le 67LR, l' α 6, la β 1, la β 4, la KRT14, le CollIV, le CollVII et la LN5 dans les PS de nos spécimens suggèrent l'établissement de nombreux complexes d'adhésion cellule-ECM par les progéniteurs qui adoptent un phénotype basal. Ces réactions sont légèrement plus faibles et moins polarisées à l'aspect baso-latéral des cellules basales de l'extrémité *versus* des flancs des

PS; de ce fait, des variations du ratio «adhésions cellule-ECM : adhésions cellule-cellule» pourraient influencer la croissance en altérant la capacité de pavage de progéniteurs mammaires. Nos résultats pour le Ki67 s'accordent avec l'hypothèse selon laquelle les cellules supra-basales/centrales de PS seraient des progéniteurs de fort potentiel prolifératif. D'autres chercheurs ont observé une distribution similaire de cellules positives pour le marqueur de prolifération MIB-1 dans le sein foetal¹⁷⁶;

- 4- successivement repoussés en périphérie du front de croissance épithéliale puis dépassés par le contingent de progéniteurs qui continue sa route, certains progéniteurs adopteraient donc des phénotypes basaux associés à une activité de pavage. Leurs propriétés seraient largement dépendantes de la composition du mésenchyme local, ce que suggèrent les variations phénotypiques marquées associées aux jonctions tPS-ePS, par exemple (frontières mésenchymateuses M3-M4 et M3'-M4' de la Figure 34);
- 5- les progéniteurs centraux, peu cohésifs entre eux, généreraient des lacunes au centre des PS; ils n'adopteraient des propriétés luminales et ne transformeraient ces lacunes en lumières naissantes qu'en présence de progéniteurs périphériques de propriétés basales bien particulières, i.e. inductrices de polarisation. L'intervention d'une telle cascade de signalisation baso-apicale s'accorderait avec la découverte du contrôle largement myoépithélial de la différenciation luminale mammaire, une capacité démontrée^{44,160} mais encore souvent ignorée des CMEM humaines. En fait, le phénotype des cellules centrales des PS de nos spécimens s'accorde mal avec l'idée que l'ouverture des lumières glandulaires fœtales repose principalement sur des phénomènes de lyse cellulaire¹⁶⁷(cité par¹⁶¹)/d'apoptose³⁷¹. Le caractère peu cohésif des progéniteurs mammaires du centre des PS pourrait être à l'origine de l'idée courante voulant qu'une desquamation cellulaire¹⁶⁶(cité par¹⁶²) déclenche leur formation.

Lorsqu'exposés *de novo* à différents mésenchymes, les progéniteurs épithéliaux adopteraient donc transitoirement des propriétés basales plus ou moins compatibles avec une activité de «pavage». La permissivité des mésenchymes vis-à-vis de ce processus aurait un impact déterminant sur la morphogenèse glandulaire.

Des mésenchymes «permissifs» seraient rapidement pénétrés; les structures épithéliales, non freinées dans leur avance, y adopteraient une conformation tubulaire aux

extrémités peu renflées. D'après notre modèle, les couches M2/M2' et M3/M3' du mésenchyme de soutien mammaire foetal seraient de ce type. Aussi, aucun embranchement glandulaire n'a été rapporté dans la littérature dans l'équivalent des couches M2/M2' et M3/M3' du mésenchyme de soutien mammaire foetal. D'après Hughes, la couche M3/M3' représente la forme immature du stroma extra-lobulaire du sein adulte¹⁷. Chez nos spécimens, les couches M2/M2' et M3/M3' sont pratiquement dépourvues de fibroblastes positifs pour le CD34, mais présentent de nombreuses structures vasculaires fortement marquées pour cet antigène : il pourrait s'agir de caractéristiques mésenchymateuses favorisant l'adoption d'un phénomène de pavage – et donc une pénétration de stromas par des éléments glandulaires mammaires.

Les progéniteurs épithéliaux mammaires pourraient aussi rencontrer des mésenchymes non permissifs vis-à-vis de l'adoption de ce comportement de pavage; ces mésenchymes bloqueraient l'avance des structures épithéliales. Les éléments glandulaires freinés acquerraient une forme arrondie, leurs progéniteurs centraux poursuivant leur prolifération. Interagissant avec leur micro-environnement, les progéniteurs ayant adopté un phénotype basal amorceraient le remodelage. Après un temps de latence variable, ce remodelage pourrait permettre une reprise d'activité de pavage et du processus de croissance épithéliale; son ampleur serait par contre réduite, la portion mésenchymateuse remodelée déterminant l'orientation et l'étendue de la nouvelle poussée de croissance. Certains éléments glandulaires pourraient donc traverser une couche de mésenchyme non permissif au terme de plusieurs poussées de croissance peu importantes. L'atteinte d'un second mésenchyme, plus permissif, se traduirait par une ré-adoption d'un mode de croissance plus «tubulaire»; une telle alternance de modes de croissance pourrait expliquer, par exemple, le comportement des PS à la sortie du mésenchyme M1/M1' du sein foetal (et possiblement contribuer à la variabilité de l'architecture de foyers tumoraux dans le sein pathologique). En résumé, des mésenchymes non permissifs vis-à-vis de l'état de pavage bloqueraient la croissance; lorsque focalement remodelés par les cellules basales de l'épithélium, ils occasionneraient un développement glandulaire ramifié reflétant une succession de cycles de «croissance - arrêt - renflement épithélial et remodelage».

D'après nos observations et la littérature, les couches M1/M1' et M4/M4' du mésenchyme de soutien mammaire foetal seraient justement «peu permissives». Bien que nos travaux ne le confirment pas, Hughes indique en effet que plusieurs excroissances foetales peuvent partager la même origine au niveau du primordium mamelonaire¹⁷ (ramifications au niveau de la couche M1/M1'). Selon nos données, la progression de la croissance dans la couche M4/M4' impliquerait aussi une succession de poussées de croissance à petite échelle, ceci rappelant la succession des cycles «croissance-latence» en physiologie pileuse^{107,372}. Chez nos spécimens, les couches M1/M1' et M4/M4' sont enrichies en fibroblastes CD34(+). Il pourrait s'agir d'une caractéristique de mésenchymes peu permissifs vis-à-vis du phénomène de pavage, soit de mésenchymes freinant la croissance d'éléments glandulaires mammaires.

Ce modèle réitère l'importance des interactions épithélio-stromales au cours de la morphogenèse mammaire *in utero*, mais en se basant sur des données obtenues dans le sein foetal plutôt qu'à l'aide de systèmes simulant celui-ci^{46,273,279,373,374,375}. La définition des CMEM présentée plus tôt offre une vision plus dynamique de celles-ci; tel que mentionné précédemment, cette définition implique que la rigidité des schèmes de pensée actuels - et non la validité de données qu'ils présentent comme irréconciliables - serait à l'origine de nombreuses controverses propres à la littérature sur le sein foetal.

Ce modèle s'accorde, enfin, avec les données visuelles d'études antérieures de microscopie électronique (quoique ces données n'y aient pas été approfondies ou interprétées comme ci-dessus), notamment des illustrations :

- 1- de cellules épithéliales foetales plus différenciées au pourtour de lumières naissantes qu'autour d'espaces inter-cellulaires les divisant, ceux-ci étant pourtant importants¹¹⁸;
- 2- de structures d'adhésions cellule-cellule et cellule-ECM très nombreuses dans les cellules au cytoplasme clair en position périphérique¹¹⁷ – des progéniteurs en cours de différenciation basale, selon notre modèle;
- 3- de structures d'adhésion peu nombreuses au pourtour des cellules centrales présentant de nombreuses interdigitations et un cytoplasme foncé en l'absence de lumières¹¹⁷ – des progéniteurs multipotents, selon notre modèle;

- 4- du peu de structures d'adhésion établies entre des cellules basales claires et des cellules supra-basales au cytoplasme foncé qui les séparent; un peu en retrait de la lame basale, les membranes des cellules supra-basales démontrent de rares ébauches d'hémidesmosome¹¹⁷ - des progéniteurs adoptant un phénotype de pavage entre des progéniteurs poursuivant leur différenciation basale).

Troisième partie : implications de nos travaux pour la sénologie fondamentale et appliquée

D'un point de vue technique, nos travaux démontrent que les études descriptives de tissus, en particulier celles de tissus humains normaux, ont plus que jamais leur place en recherche bio-médicale comme en clinique^{229,230,376}. Contrairement à d'autres approches, l'IHC conventionnelle sur tissus permet de préserver et d'analyser des informations spatiales qui tardent à être considérées comme physiologiquement cruciales malgré la multiplication de preuves à cet effet^{42,51,52,377,378}; la fiabilité de l'IHC et son efficacité dépendent, comme pour toute autre technique, du respect de certaines mesures:

- 1- sélectionner des échantillons tissulaires de sein d'après des critères bien définis, relever toute dérogation au processus de sélection; à ce titre, nos données s'opposent à l'utilisation de tissus péri-lésionnels comme source d'échantillons de tissus «normaux»;
- 2- préparer les échantillons tissulaires mammaires uniformément dès leur prélèvement, relever toute dérogation au processus de préparation;
- 3- utiliser des réactifs de composition fixe;
- 4- utiliser des protocoles de pré-traitement et d'IHC standards et recourir le plus souvent possible à l'automatisation;
- 5- utiliser des contrôles positif-négatif adéquats; nos travaux suggèrent que la multiplication souvent très informative de contrôles positifs pourrait être possible en clinique comme en recherche par l'utilisation de *microarrays* tissulaires de contrôle (Annexe III);
- 6- utiliser des anticorps primaires ciblant «le moins possible» d'entités moléculaires distinctes selon l'état «actuel» des connaissances à un moment donné. À ce titre, nos travaux illustrent clairement l'impact négatif à court, moyen et long terme de l'emploi de *cocktails* comme les *cocktails* anti-kératines, leurs «spécificités» variables, inégales et incomplètes masquant des réalités nouvellement reconnues comme pertinentes – et possiblement déterminantes – en pathologie appliquée (Discussion, section Une reconnaissance entravée);
- 7- documenter extensivement les marquages obtenus malgré l'état «actuel» des connaissances, c'est-à-dire de ne pas passer sous silence un bruit de fond de caractère non aléatoire ou tout aspect imprévu d'une réaction donnée (ex. marquage

cytoplasmique actuellement non rapporté pour les récepteurs d'oestrogènes; marquage nucléaire typiquement ignoré pour la VIM; polarisation de la distribution d'IF non mentionnée).

Nos travaux soulignent l'intérêt de recourir à des marquages multiples. Notre technique impliquant le DAB, le BCIP/NBT et le safran permettrait d'ailleurs d'intégrer la réalisation de doubles-marquages durables à la routine hospitalière (pour deux anticorps ne nécessitant pas de pré-traitements ou des pré-traitements semblables; voir l'Annexe V; ex. Figure 11 de F à H; Figure 15 en C et D). Faisant appel à des réactifs et à de l'équipement usuels, cette technique génère des résultats particulièrement informatifs; elle permet d'utiliser une quantité moindre d'un matériel parfois peu abondant et peut même être réalisée en deux temps si les conditions l'exigent (ex. marquages effectués à quelques heures ou quelques mois d'intervalle, si nécessaire).

Enfin, selon nous, la documentation de structures spécifiques «suivies» sur des coupes sériées ne devrait pas être facultative pour la publication de résultats d'IHC en sénologie.

Implications théoriques et pratiques pour la sénologie

Notre objectif principal était de contribuer à la caractérisation de la CMEM humaine, notamment dans le but d'explorer les fondements biologiques de pratiques de pathologie basées sur sa localisation par IHC. Les résultats de notre caractérisation corroborent, complètent et contredisent diverses données de la littérature concernant les propriétés encore méconnues et controversées des CMEM dans le sein foetal, adulte normal et pathologique. Notre discussion a déjà souligné plusieurs implications de nos travaux dans chacun de ces contextes:

- 1- **sein foetal** : l'importance de distinguer le primordium mammaire du primordium mamelonaire, les propriétés antigéniques de seins foetaux étant confondues avec celles de mamelons immatures dans la littérature récente^{169,170}. Ces études antérieures visaient à identifier des marqueurs d'IHC «particulièrement importants» pour l'analyse de lésions du sein adulte. Nos travaux indiquent que les cellules mamelonnaires basales réagissent de manière souvent opposée à celle des cellules mammaires basales, chez le foetus comme chez l'adulte. Contrairement aux études

citées ci-dessus, nos travaux présentent la KRT14 et la VIM comme des marqueurs particulièrement informatifs pour l'analyse de phénotypes épithéliaux mammaires humains;

- 2- **sein adulte normal au repos** : la nécessité de redéfinir les CMEM humaines. Par leur caractère réductionniste, les définitions actuelles des cellules basales de l'épithélium du sein entravent la reconnaissance de leur importance physiologique : les définitions qui les présentent comme les éléments terminalement différenciés d'une ou deux populations cellulaires homogènes freinent cette reconnaissance, menant au rejet de marqueurs d'IHC susceptibles de dévoiler l'aspect malléable de leurs propriétés. L'idée voulant que leurs propriétés soient «hétérogènes» est également dommageable, suggérant que l'étude des propriétés des CMEM est peu utile^{1,158} (variations présentées comme aléatoires, indéchiffrables). Nos travaux indiquent la nécessité de reconnaître aux «CMEM» une importance physiologique au moins égale à celle des «CLUM» - et très différente; ils s'opposent à la sous-représentation d'attributs jugés «basaux» dans les études, plutôt rares, qui font appel à des techniques récentes et à des tissus mammaires véritablement normaux³⁷⁹. Ils réitèrent que les propriétés de tissus mammaires péri-lésionnels d'aspect normal ne peuvent être considérées comme représentatives des propriétés du sein adulte normal au repos, remettant en question les conclusions de nombreuses études d'IHC traitant du sein pathologique (biais d'interprétation découlant de l'usage de contrôles positifs peu représentatifs de la «normalité»);
- 3- **sein pathologique** : l'importance de reconnaître que les CMEM résiduelles, péri-lésionnelles et pathologiques ne forment pas des populations cellulaires homogènes. Cette constatation remet en cause les critères utilisés pour évaluer l'efficacité des marqueurs de CMEM employés en clinique, mais aussi le bien-fondé de pratiques courantes de pathologie mammaire. En effet, ces dernières pourraient être à l'origine de diagnostics erronés (pratiques reposant sur la localisation de certaines formes de CMEM résiduelles seulement; recours à des marqueurs ne mettant pas en évidence des cellules d'aspect basal qui seraient associées à l'adoption de comportements tumoraux agressifs). Il apparaît donc important de documenter les rôles physio-pathologiques de cellules présentant des caractéristiques «myoépithéliales» - et non seulement «luminales» - en clinique comme en recherche, notamment dans les études épigénétiques, de génomique et de

protéomique de carcinomes mammaires^{380,381,382,383,384} où les caractéristiques d'états basaux tendent à être sous-représentées. Enfin, contrairement aux affirmations de certains chercheurs²⁰³, nos données de carcinomes myoépithéliaux «classiques» confirment le caractère souvent agressif de telles entités^{192,194,195,344,385,386,387}.

Les sections suivantes présentent certaines implications des observations et réflexions permises par l'articulation des trois volets de notre caractérisation. Nos résultats et leurs implications illustrent l'intérêt de devis expérimentaux élaborés en fonction de la triade «fœtal normal – adulte normal – pathologique»; dans le cadre de nos travaux, ce principe a permis de compléter, de corroborer et de réfuter plusieurs données de la littérature, de supporter la pertinence pour la médecine humaine d'hypothèses explorées récemment en sciences de la vie, de remettre en question le bien-fondé de concepts et de pratiques actuelles de pathologie et d'introduire des outils/techniques additionnels de diagnostic en milieu hospitalier.

Étudier des fonctions et potentiels plutôt que des populations cellulaires?

Nos observations de CMEM proliférant activement, impliquées dans le déroulement de mitoses asymétriques, rejoignent la réflexion de Blau et coll. (2001) : il pourrait être plus pertinent de parler de «fonction et/ou potentiel souche» plutôt que de «cellules ou populations souches» chez l'humain et l'animal³⁸⁸. D'après leurs observations, différents types cellulaires souvent considérés comme «terminalement différenciés» feraient en fait preuve de capacités progénitrices dans des contextes physiologiques normaux spécifiques. Selon ce concept de fonction et/ou potentiel souche, l'identification consensuelle d'une population souche de l'épithélium du sein serait donc bien plus «qu'une simple question de temps»¹⁰⁰, cette entité théorique ne correspondant possiblement pas à une réalité biologique.

De fait, la comparaison des résultats d'IHC obtenus dans nos spécimens de sein fœtal, adulte normal et pathologique suggère que la plupart de nos antigènes-cibles seraient davantage des marqueurs de fonction et/ou de potentiel cellulaires (aspect temporaire) que d'appartenance à une population définie par des critères stricts (aspect immuable). Comme notre redéfinition de la CMEM, cette constatation suggère que les «populations cellulaires du sein» seraient des entités théoriques biologiquement peu significatives du fait qu'elles

regroupent des cellules sur la base de critères arbitraires et rarement permanents. Cette constatation n'est pas nouvelle : en physiologie comme en pathologie mammaire, de nombreuses publications en font mention depuis plusieurs années (voir notamment^{99,267,280,355,379,389,390}).

Nos observations de MO et d'IHC suggèrent par ailleurs l'existence de «profils de jonction épithélio-stromale»; en effet, tel qu'observé pour les antigènes-cibles inclus à titre de marqueurs de CMEM, les marquages obtenus pour nos marqueurs de lame basale mammaire, de CLUM et de fibroblastes présentent des variations quantitatives et qualitatives non aléatoires (nombreuses variations coordonnées des attributs des constituants de cette unité fonctionnelle décrite par Ozzello³⁴). Nos travaux indiquent qu'une approche de la physiologie mammaire axée sur des «unités physiologiques» peut faciliter l'articulation d'informations qui semblent discordantes selon des approches axées sur des «populations cellulaires»¹⁰⁰, rendant ainsi fonctionnelles des connaissances de sénologie déjà acquises mais non exploitées parce qu'elles demeuraient controversées.

Nos propos rejoignent les conclusions d'un nombre grandissant d'études à l'effet que le phénotype de cellules épithéliales du sein dépend davantage de leur micro-environnement que de leur bagage génétique/épigénétique; ces conclusions découlent par exemple:

- 1- de la découverte de multiples altérations génétiques partagées par des CMEM et des CLUM humaines normales¹¹⁴ ;
- 2- de l'influence déterminante de la composition biochimique, mais aussi de l'architecture du micro-environnement et des forces mécaniques qui s'y génèrent sur les propriétés de CMEM et de CLUM^{45,46,47,51,362,391,392,393,394,395}(réf. revues récentes^{378,396});
- 3- de la description de «réversion phénotypique» de certaines cellules métastatiques^{397,398} soit, par exemple, l'adoption de phénotypes peu agressifs et leur formation de nodules tumoraux d'aspect *in situ* au niveau de ganglions axillaires. Ce phénomène de réversion peut être reproduit *in vitro* par de simples variations de milieu de culture^{46,393} : certains stimuli micro-environnementaux suffisent ainsi à provoquer l'adoption de phénotypes normaux par des cellules malignes pourtant lourdement hypothéquées aux plans génétique et épigénétique³⁹⁹. Des résultats

similaires ont été obtenus à l'aide de la lignée épithéliale mammaire humaine MDA-MB-231, d'aspect myoépithélial⁴⁰⁰. Quelques équipes de recherche envisagent d'exploiter ce phénomène de «réversion phénotypique» pour traiter des tumeurs solides^{393,399,400,401,402}, cette approche s'étant déjà avérée efficace dans d'autres contextes (traitement de certaines formes de leucémie⁴⁰³).

En fait, l'influence du micro-environnement sur le phénotype de cellules épithéliales mammaires serait telle qu'elle se traduirait parfois par l'adoption de phénotypes mésenchymateux («transition épithéliale-à-mésenchymateuse» ou EMT; angl. *epithelial-mesenchymal transition*). Ce processus, important au cours de l'organogenèse normale *in utero*, pourrait l'être également chez l'adulte. En effet, un nombre limité mais croissant de publications indiquent que la genèse de stromas lésionnels peut impliquer une EMT dans divers organes matures^{404,405,406,407,408,409,410,411,412}. Des études démontrent que le stroma de certains cancers du sein renferme des cellules d'allure fibroblastique dérivées de cellules carcinomateuses^{359,413,414}. Ces données, compatibles avec les conclusions d'analyses génétiques et d'études d'IHC impliquant diverses lésions mammaires^{5,209,407,415,416,417}, viennent appuyer, chez l'humain, l'hypothèse émise en 1981 par Dulbecco et coll.⁴¹⁸ chez le rat (lignée cellulaire RAMA25). L'importance de telles transitions demeure incertaine en pathologie mammaire appliquée : selon certains, elles seraient impliquées dans «18% des cas de tumeurs mammaires»⁴¹³. La possibilité que ces phénomènes pathologiques résultent de l'altération de processus physiologiques est présentement étudiée dans le rein⁴⁰⁹ mais très peu dans le sein^{419,420} : en effet, l'hypothèse selon laquelle les CMEM normales seraient le reflet d'EMT partielles *physiologiques* tarde à être considérée. Le déroulement d'EMT partielles est pourtant invoqué pour expliquer l'adoption d'attributs «mésenchymateux» par différentes cellules épithéliales normales cultivées *in vitro*⁴²¹. L'implication de la S100A4 dans les EMT a été dévoilée relativement récemment (elle y est habituellement appelée «Fsp1»; angl. *fibroblast-specific protein-1*; voir l'Annexe VIII) : son expression serait très précoce dans le cadre de tels processus, d'où sa distribution à la fois épithéliale et mésenchymateuse. Dans l'épithélium mammaire normal, sa distribution irrégulière mais préférentiellement basale⁴²² vient raviver un très vieux débat : celui de la nature – épithéliale *versus* mésenchymateuse - des CMEM humaines. Depuis près de vingt ans, la sénologie n'a pas remis en question la nature épithéliale et l'origine ectodermique des CMEM humaines «parce qu'elles expriment des kératines». Entre-temps, de nombreux

résultats sont pourtant venus ébranler la théorie soutenant cet argument. L'idée voulant que les CMEM du sein soient engagées dans un programme unique de différenciation spécifique, de même que leur réputation fortement ancrée de «cellules terminalement différenciées», n'admettent pas la possibilité que les CMEM adoptent simplement des états plutôt épithéliaux ou plutôt mésenchymateux dans différents contextes. Ceci freine l'étude d'hypothèses qui ne semblent pourtant pas sans fondements expérimentaux ou dénuées d'intérêt clinique (ex. possibilité d'une implication d'EMT dans la genèse de lésions mammaires non néoplasiques et de néoplasmes résistants aux thérapies conventionnelles^{413,414,423,424,425}).

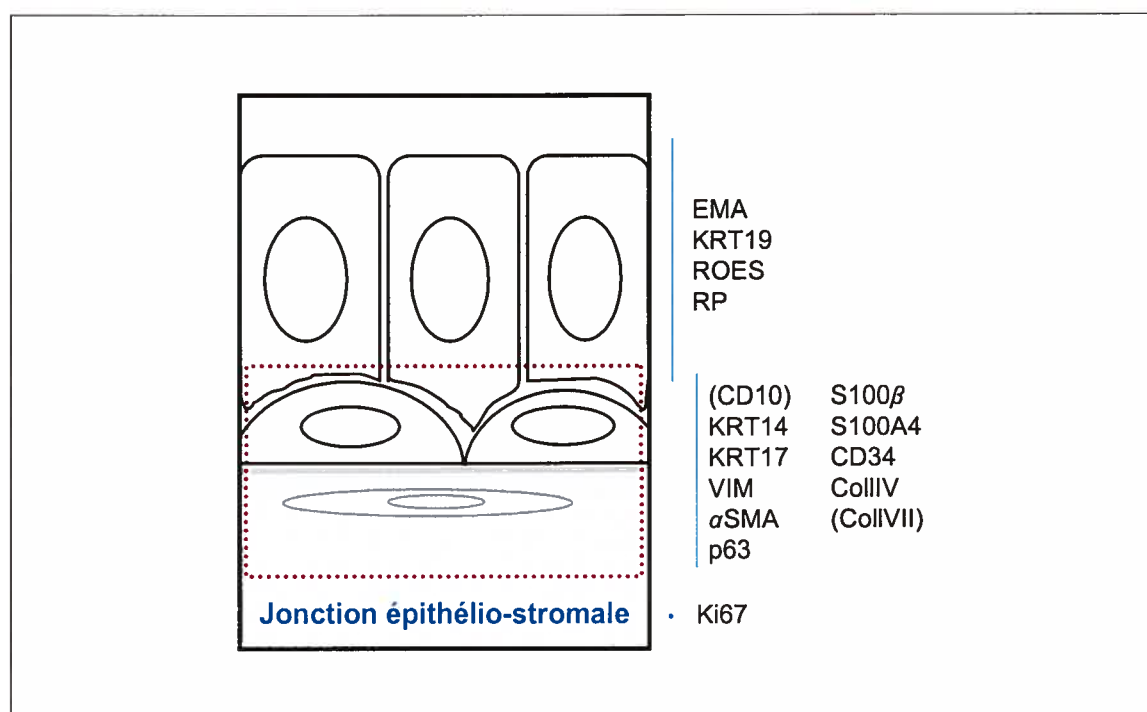
D'après nos observations de MO et d'IHC (principalement pour la VIM, l' α SMA, la S100A4 et le CD34), des processus d'EMT pourraient intervenir dans la genèse de multiples lésions mammaires (ex. cas T1 d'hyperplasie mammaire floride, Figure 16 en J; cas T4 de fibroadénome de forme intra-canaliculaire, Figure 19 en C et I). Nos résultats d'IHC pour la VIM et la S100A4 suggèrent par ailleurs le déroulement de tels processus dans certains éléments glandulaires de TDLU du sein adulte normal au repos (ex. Figure 14 en M, Figure 15 de J à L).

Notre redéfinition des «CMEM humaines» s'accorde avec la vision plus «fonctionnelle» que «cellulaire» de la sénologie véhiculée par la littérature traitant de la plasticité du phénotype des cellules épithéliales mammaires, de processus de réversion et de phénomènes d'EMT dans le sein. Nous croyons que l'adoption de batteries d'anticorps permettant une documentation plus extensive de la jonction épithélio-stromale pourrait faciliter l'intégration de cette vision «fonctionnelle» en pratique courante, permettant l'optimisation ou le développement *de novo* d'outils de diagnostic, de pronostic et d'approches thérapeutiques^{340,391,426}

La batterie d'IHC illustrée à la Figure 35 s'est avérée hautement informative dans le cadre de nos travaux (résultats non montrés pour les récepteurs d'oestrogènes ou ROES et les récepteurs de progestérone ou PR ; collaboration en cours avec les Drs André Tremblay et Cheri Deal du Centre de recherche de l'Hôpital Sainte-Justine). La distribution épithéliale basale du CD10 et la spécificité du CollVII pour les lames basales épithéliales justifieraient de les inclure à cette batterie, mais à condition de disposer d'anticorps fiables

pour utilisation sur tissus fixés et enrobés en paraffine (pour que tous les marquages soient réalisés sur coupes sériées). Nos travaux ne nient pas l'intérêt de documenter les propriétés de cellules d'aspect luminal et ne suggèrent pas l'abandon des marqueurs actuellement utilisés en milieu hospitalier – à l'exception des *cocktails* d'anti-kératines. Ils prônent par contre l'utilisation, en pratique courante, de batteries permettant l'analyse de profils de jonction épithélio-stromale; à notre avis, les données ainsi générées en clinique seraient particulièrement susceptibles de faciliter l'exploitation, en pathologie mammaire appliquée, de percées scientifiques récentes.

Figure 35 Batterie d'anticorps suggérée



Une meilleure documentation de la jonction épithélio-stromale du sein, en clinique, accélérerait de surcroît l'étude des mécanismes d'action et des effets de traitements usuels sur les différents constituants inertes et cellulaires du sein (autrement freinée par l'accès limité à des tissus humains pour seules fins de recherche). À la lumière de publications récentes, il nous semblerait par exemple important de vérifier si l'administration prophylactique de modulateurs d'oestrogènes peut favoriser l'émergence de certains types de cancer. Cette pratique vise à maintenir quiescentes d'éventuelles «CLUM altérées»; or, certains carcinomes dériveraient en fait de l'altération de *progéniteurs pluripotents*^{105,427,428}. Si l'on considère les faits ci-dessous, l'administration de modulateurs d'oestrogènes

pourrait provoquer l'adoption de propriétés basales plutôt que luminales par des progéniteurs anormaux, favorisant ensuite leur prolifération et l'émergence de carcinomes partiellement myoépithéliaux particulièrement agressifs:

- 1- des conditions de culture qui inhibent la prolifération de CLUM ont un effet diamétralement opposé sur la prolifération de CMEM *in vitro*³⁶⁴;;
- 2- des CMEM, même normales, présentent des potentiels prolifératif et invasif très supérieurs à ceux de CLUM dans de nombreux contextes²¹⁶;
- 3- une proportion importante de carcinomes myoépithéliaux sont à l'origine d'échecs thérapeutiques (multiples récurrences, dissémination rapide et survie typiquement courte); l'administration de modulateurs d'oestrogènes et la radiothérapie ne parviennent souvent pas à freiner la croissance de ces entités^{187,192,195,385,386} (tel que démontré pour le cas T16¹⁹⁴);
- 4- les CMEM sont particulièrement résistantes à l'apoptose (résistance possiblement liée à leur capacité de synthèse d'ECM et de retrait du cycle cellulaire ainsi qu'à leur adoption d'une forme plus étalée que celles des CLUM^{51,52,392}).

À l'heure actuelle, nos travaux ont déjà permis d'introduire la KRT14 comme marqueur additionnel de CMEM pathologiques en milieu hospitalier. Depuis, de façon étonnante, un nombre élevé de carcinomes de phénotype partiellement basal ont été diagnostiqués. Ces données cliniques préliminaires semblent confirmer que les carcinomes mammaires «à composante myoépithéliale» ne seraient pas tant rares que rarement reconnus chez l'humain. Par ailleurs, certains de ces carcinomes présentent des cellules d'un profil antigénique inattendu, soit un profil «luminal-myoépithélial» suggérant qu'elles dérivent de progéniteurs multipotents de l'épithélium du sein (collaboration en cours avec le Dr Walter Schürch, Département de pathologie du CHUM). Mentionnée ci-dessus, la participation de progéniteurs multipotents au développement de cancers du sein est envisagée depuis la confirmation de la persistance de «cellules souches» dans l'épithélium du sein adulte; en revanche, ceux-ci ont rarement été mis en évidence en contexte clinique^{195,267}. La batterie d'anticorps décrite à la Figure 35 permettrait d'en localiser certaines formes qui semblent, d'après nos résultats préliminaires, impliquées dans la genèse de tumeurs agressives.

Avenues de recherche

Nos observations sont à l'origine d'hypothèses de recherche rarement envisagées en sénologie. Certaines d'entre elles ont fait l'objet de remarques dans la première partie de cette discussion, par exemple :

- 1- **sein foetal** : le moment de l'initiation de la morphogenèse du sein pourrait différer d'un individu à l'autre; un tel décalage pourrait expliquer certaines différences inter-individuelles du développement mammaire. Par ailleurs, un découplage entre les développements mammaires et osseux pourrait expliquer les succès mitigés d'études qui visent à associer un risque de développement de cancer du sein accru à certaines données morphométriques prises en post-partum (ex. corrélations modestement positives établies avec la longueur du tronc et celle de la jambe, chez 4286 femmes, dans le cadre de la British Women Heart and Health Study⁴²⁹);
- 2- **sein adulte** : la CMEM humaine et les éosinophiles pourraient être impliqués, chez l'humain comme chez le rongeur, dans la médiation d'interactions épithélio-stromales cruciales pour la croissance mammaire normale; l'étude de ce «partenariat cellulaire» pourrait être pertinente en oncologie puisque le stroma tumoral qui entoure les fronts d'invasion de certains carcinomes est enrichi en éosinophiles³¹⁸;
- 3- **sein adulte** : certaines variations non aléatoires de propriétés des constituants mammaires pourraient découler de l'inactivation de chromosomes X distincts dans le sein normal comme pathologique. L'existence de ces territoires d'inactivation, dans le sein normal de la femme adulte, récuserait les interprétations de nombreuses études basées sur la détermination du caractère monoclonal *versus* polyclonal de carcinomes mammaires^{96,97}. L'appartenance à un tel territoire d'éléments glandulaires non continus pourrait contribuer au caractère multi-focal/multi-centrique de certaines lésions mammaires (ex. territoires plus à risque de cancérisation si le X actif est porteur d'anomalies – concept étendu «d'effet de champ de cancérisation»¹⁹). L'évolution de phénomènes réactionnels tissulaires pourrait également différer à la frontière de territoires dont les X actifs diffèrent *versus* au centre de telles régions.

Avant de conclure, nous explorerons quelques avenues de recherche additionnelles ouvertes par nos travaux. Certaines impliquent les CMEM directement, d'autres

indirectement parce qu'elles intéressent des éléments et/ou des phénomènes de leur micro-environnement. Dans la dernière des sous-sections suivantes, nous discuterons de la version préliminaire d'un modèle probabiliste de la physiologie mammaire.

Un nouveau compartiment stromal?

Un filet de mésenchyme pauvrement collagénisé et bien vascularisé s'interpose irrégulièrement entre la lame basale de la plupart des CE et le stroma extra-lobulaire du sein adulte normal au repos. Difficile à localiser à l'aide de colorations de routine, il présente une distribution presque continue en IHC : sur nos coupes marquées au CD34, ce «stroma péri-canalair» se caractérise en effet par un ratio «fibroblastes et structures vasculaires : ECM» élevé. Autour de CE normaux de fort calibre, il semble ne contenir que de très minces prolongements cellulaires CD34(+). Ces prolongements sont disposés de manière rigoureusement parallèle à la lame basale épithéliale. Ce stroma est typiquement plus abondant autour de plus petits CE (Figure 14 en T).

Les composantes de ce stroma péri-canalair et du stroma intra-lobulaire semblent être en parfaite continuité au niveau des CT. Malgré des similarités morphologiques, ces deux compartiments mésenchymateux semblent par contre physiologiquement distincts : les altérations du stroma intra-lobulaire liées au statut menstruel des patientes ne sont pas observées au niveau du stroma péri-canalair. Cette constatation n'est pas sans rappeler les observations d'Ozzello et coll. : les fibroblastes qui entourent les CE et TDLU du sein ont des capacités fonctionnelles très différentes malgré leurs attributs ultrastructuraux similaires³⁴; leur production de polysaccharides (une capacité fibroblastique modulée par les oestrogènes⁴³⁰) semble qualitativement et quantitativement différente⁴³¹, par exemple.

Fibroblastes mammaires, CD34 et défense de l'hôte

Par microscopie électronique, Ozzello a démontré que des fibroblastes délimitants mammaires entourent les acini et les CT des TDLU mais aussi les CE du sein adulte normal³⁴. Établissant de nombreux contacts entre eux, les fibroblastes délimitants du sein formeraient une couche régulière et fenestrée autour de la lame basale mammaire^{34,432}. Sur nos coupes de sein normal, au niveau des stromas péri-canalair et intra-lobulaire du sein, des fibroblastes CD34(+) de forme plane et incurvée forment des strates autour des éléments glandulaires mammaires (ex. Figure 27 en B1). Contrairement aux colorations de

routine, le marquage pour le CD34 permet de les localiser lorsque coupés transversalement (minces filets positifs en forme de croissants, disposés de manière concentrique autour des CE, des CT et des acini du sein adulte). L'adoption d'une configuration fibroblastique plane, occasionnellement mentionnée dans la littérature sur le sein^{163,433}, pourrait expliquer pourquoi des fibroblastes mammaires présentent des prolongements d'une minceur parfois remarquable à l'ultrastructure³⁴. Nos observations du sein adulte normal confirment que de nombreux macrophages et lymphocytes s'associent étroitement à ces prolongements cellulaires : se basant sur des observations similaires, quelques chercheurs ont émis l'hypothèse d'une participation des fibroblastes délimitants à une forme sommaire de surveillance immunitaire dans le sein^{432,433,434}.

Le stroma associé aux fronts d'infiltration de la majorité de nos cas de carcinome mammaire – exception faite du cas T12 - présente un nombre élevé de structures vasculaires CD34(+), mais très peu de fibroblastes CD34(+) (Figure 22 en I); en revanche, la plupart des infiltrats lymphocytaires associés à ces composantes invasives s'organisent autour de cellules fusiformes positives pour le CD34 (non montré). Cette observation s'accorderait également avec la thèse d'une implication de fibroblastes CD34(+) vis-à-vis de la défense immunitaire de l'hôte - cette fois face au cancer. Nous employons par contre le terme «fibroblastes» sous toutes réserves puisque dans la littérature, ces cellules stromales aplaties CD34(+) sont tantôt décrites comme des fibroblastes^{34,432,433}, tantôt comme des cellules endothéliales des «portions ouvertes» du système lymphatique^{434,435}.

Tel qu'indiqué ci-dessus, le stroma associé au carcinome lobulaire infiltrant du cas T12 se démarque de celui des autres cas à l'étude, surtout par une quasi-absence de cellules inflammatoires et un nombre élevé de fibroblastes positifs pour le CD34; une forte proportion de cellules invasives y sont étroitement associées à ces fibroblastes CD34(+). Cette persistance de fibroblastes semblerait liée à l'adoption de profils d'infiltration «en cible» et «en file indienne» par ces cellules cancéreuses (Figure 23 en K). Nos observations suggèrent que ces fibroblastes, disposés de manière relativement concentrique autour de structures glandulaires altérées, pourraient faire dévier les cellules invasives ou leur servir de substrat migratoire (possibilité d'une expression de molécules de surface impliquées dans la migration de lymphocytes par des cellules de carcinomes mammaires; ex. le CD44v6^{240,436}). Nous croyons que cette seconde hypothèse mériterait d'être approfondie, les

fronts d'invasion de ce carcinome lobulaire adoptant un aspect très différent en l'absence de tels fibroblastes CD34(+) (amas cellulaires irréguliers et compacts).

Des anastomoses canalaire

Une anastomose est une réunion, une fusion de deux structures. De rares études rapportent l'existence d'anastomoses entre des structures canalaire de seins pathologiques : par reconstruction tridimensionnelle informatisée de tissus mammaires, ces études visaient à déterminer l'importance de l'envahissement rétrograde de l'arbre mammaire par des «carcinomes intra-canaire». Ishikawa et coll.⁴³⁷ suggèrent que ces anastomoses, absentes du sein normal, seraient des «atypies structurales» secondaires au développement de certaines formes de carcinomes mammaires. Ces auteurs ne remettent donc pas en question le paradigme selon lequel le caractère dichotome des canaux mammaires normaux s'établit au moment de leur création par «bourgeoisement»; ce paradigme suppose que les éléments glandulaires retrouvés en aval d'une division sont physiquement indépendants. Ohtake et coll. proposent au contraire que l'arbre mammaire normal présenterait des anastomoses⁴³⁸, ces chercheurs soulignant que les CE et/ou TDLU reliés par des anastomoses ne sont pas obligatoirement altérés. Un article récent de cette équipe rapporte la présence d'anastomoses dans 25% des segments mammaires d'un sein entier³⁰ présentant, cependant, un carcinome intra-canaire; fréquentes au niveau de CE périphériques, les anastomoses seraient systématiquement absentes de la région péri-mamelonnaire normale. Ces auteurs ne proposent pas de mécanismes susceptibles d'expliquer leurs observations.

Notre examen de coupes sériées indique que des agencements glandulaires comme ceux illustrés à la Figure 23 en G (cas T12) résultent parfois de la présence de structures canalaire parallèles, connectées latéralement entre elles en de nombreux points. Nos travaux suggèrent donc l'existence d'anastomoses entre des structures canalaire du sein adulte normal au repos (cas N11 et N12) et pathologique (cas T2, T3, T4 et T12). Plusieurs de ces ensembles structuraux présentent des cellules supra-basales, luminales et/ou supra-luminales fortement positives pour la KRT14, la KRT17 et la VIM. Le phénomène d'«angiogenèse intussusceptive» a été étudié dans le lit vasculaire mammaire murin normal et pathologique⁴³⁹; il s'agit d'une division de vaisseaux existants, des mouvements orchestrés des cellules endothéliales menant à l'invagination de parois opposées, à leur fusion puis à leur perforation par des colonnes de stroma (voir la revue de littérature de

2003 de Djonov et coll.⁴⁴⁰). Ce processus permet une multiplication rapide de vaisseaux sanguins malgré des taux de prolifération cellulaire presque nuls. L'hypothèse selon laquelle les anastomoses entre structures *épithéliales* du sein découleraient d'un phénomène de remodelage analogue à l'intussusception angiogénique mériterait, à notre avis, d'être envisagée : vu leurs capacités de migration²¹⁶, de synthèse/remodelage de lames basales^{44,373} et de régulation de la polarisation de l'épithélium mammaire entier¹⁶⁰, les CMEM pourraient jouer un rôle de premier plan dans un tel processus.

La peau, ses annexes et la pathologie mammaire

Jusqu'ici, malgré le lien développemental indéniable qui relie le sein à la peau et ses annexes, peu d'études ont exploré la pertinence d'observations faites en dermatologie pour la pathologie mammaire. Depuis 1999, cette avenue de recherche a souffert de la polémique engendrée par un article de James et coll., publié par la revue *Nature*⁴⁴¹; d'après ces auteurs, l'analyse de profils de diffraction de rayons X par des poils du cuir chevelu et de la région pubienne permettrait un dépistage fiable et facile des cancers du sein. Quoique des publications additionnelles de ces chercheurs aient ré-affirmé la validité de cet outil pour le dépistage de carcinomes du sein⁴⁴² et même du côlon⁴⁴³, aucune source indépendante n'appuie, à ce jour, leurs affirmations^{444,445,446}.

Quelques mois avant que cette controverse ne débute, Kopelovich et coll. soulignaient la pertinence d'étudier certaines annexes de la peau en sénologie. Selon ces auteurs, le terme «effet de champs» devrait désigner toute hausse d'incidence de cancérisation et de *risque de cancérisation* au niveau de tissus anatomiquement ou *fonctionnellement* liés. Ainsi, la muqueuse pharyngée, l'endomètre, les follicules pileux du cuir chevelu et les glandes sudoripares situées le long des lignes mammaires théoriques de l'adulte pourraient agir, respectivement, à titre de substituts anatomiques/fonctionnels d'analyse du risque de cancérisation du poumon, de l'ovaire, de la prostate et du sein¹⁹.

Nos travaux n'appuient pas directement les affirmations de Kopelovich et coll. concernant le sein; nos observations supportent tout de même certaines de leurs prémisses : nos résultats d'IHC sur coupes sériées combinant sein et peau révèlent que diverses propriétés du sein foetal, adulte normal et pathologique présentent des similarités frappantes avec certaines propriétés de la peau – et des poils – recouvrant cette glande (voir

les Figures 11, 12, 16, 17 et 27). La Figure 27 met notamment en évidence des similarités «sein - peau/annexes» marquées chez une jeune femme en santé et chez deux patientes présentant des hyperplasies mammaires d'aspects distincts (cas N8, en B1 et B2; cas T1, en C1 et C2; cas T2, en D1 et D2). La comparaison de ces trois cas suggère une association entre les propriétés des éléments glandulaires mammaires, de la peau et même de structures vasculaires du derme profond pour chacun de ces cas. Ainsi, nos travaux mettent en lumière un potentiel informatif non exploité, en sénologie, de l'analyse simultanée d'échantillons tissulaires mammaires et cutanés (peau du sein) par IHC. À notre avis, cette pratique pourrait faciliter l'intégration des visions anatomique et moléculaire de la pathologie mammaire en milieu hospitalier : elle pourrait, par exemple, faciliter l'identification de voies physiologiques mammaires perturbées en recherche comme en clinique (mise à profit de découvertes concernant la peau et les poils humains¹⁰⁷). Son implantation serait facile et peu coûteuse (les pièces de chirurgies mammaires à visée curatrice comprennent habituellement des lambeaux cutanés; la préparation de blocs incluant des fragments de peau et de sein évite de dupliquer les manipulations et fournit, de surcroît, un contrôle interne «personnalisé» d'IHC).

Réversion au niveau de métastases... et de primaires?

Le phénomène de réversion tumorale mentionné plus tôt remet quelque peu en question l'importance accordée à la «préservation d'un caractère différencié» en oncologie mammaire. Ce phénomène, encore peu documenté quoique possiblement fréquent (ex. métastases comportant des cellules de grade peu élevé dans 21% de 200 cas de carcinomes mammaires de haut grade³⁹⁷), est analysé depuis quelques années en sciences fondamentales. Nous croyons que son existence justifie de poursuivre la caractérisation des CMEM résiduelles et péri-lésionnelles; en effet, des CMEM et des structures glandulaires couramment jugées *résiduelles* pourraient théoriquement tirer leur origine de la réversion plus ou moins durable de cellules carcinomateuses. Selon plusieurs études, le contact de cellules cancéreuses avec des tissus sains ou avec certaines formes de stroma tumoral - un tissu typiquement hétérogène, i.e. une source de micro-environnements distincts - pourrait provoquer une réversion affectant profondément divers aspect du comportement des cellules concernées (ex. immobilisation, arrêt de prolifération, ré-adoption d'un phénotype différencié parallèlement à l'élaboration de structures glandulaires d'aspect relativement normal, correctement polarisées^{378,399}).

Cette hypothèse de «présence» sans «persistance» de CMEM résiduelles et péri-lésionnelles pourrait contribuer à expliquer:

- 1- le regroupement préférentiel de cellules carcinomateuses de profil partiellement basal au niveau de fronts d'invasion^{9,125,201,234,235,242} (ex. KRT17 dans le cas T10; Figure 22 en B);
- 2- le caractère multi-focal et/ou multi-centrique de lésions mammaires^{96,97,101,102,103,104};
- 3- le partage d'altérations génétiques par les cellules de foyers tumoraux et de structures péri-lésionnelles d'aspect presque normal¹¹⁴ (foyers et structures péri-lésionnelles parfois très distants);
- 4- pourquoi certaines structures glandulaires péri-lésionnelles occupant une position curieusement périphérique, isolées au milieu de fronts d'invasion riches en cellules de défense, présentent souvent un aspect étonnement normal.

Selon cette hypothèse, la démonstration d'une marge d'excision tumorale saine pourrait nécessiter l'analyse du génotype – et non seulement du phénotype – des cellules épithéliales mammaires retrouvées en périphérie des pièces de chirurgie. Nous proposons par ailleurs qu'aux sites de tumorectomies ou de mastectomies partielles, la persistance de cellules épithéliales de phénotype normal mais de génotype anormal pourrait être à l'origine d'un mécanisme encore non envisagé de récidives locales: la «dé-réversion» de telles cellules, à plus ou moins court terme, secondaire à des altérations micro-environnementales occasionnées par l'acte chirurgical (ex. exposition *de novo* à de fortes concentrations d'hydrocarbures aromatiques polycycliques, générés localement par électro-cautérisation et potentiellement mutagènes lorsqu'ils sont métabolisés⁴⁴⁷).

Nous croyons que cette hypothèse de «réversion au niveau de primaires» mérite aussi d'être explorée parce que des pratiques nouvelles pourraient découler de l'analyse de composantes d'ECM capables de susciter un tel phénomène, par exemple :

- 1- l'application de composés «pro-réversion» synthétiques, résistants à la lyse enzymatique, dans toute cavité créée par une chirurgie ou une biopsie mammaire;
- 2- le développement de méthodes de contrôle d'hémorragie limitant l'altération des tissus et la création de carcinogènes persistants aux sites de chirurgies - un recours à des colles physiologiques⁴⁴⁸ plutôt qu'à l'électro-cautérisation, par exemple.

Vers un modèle probabiliste de la physiologie mammaire

Conforme aux paradigmes d'un domaine de connaissance donné, un modèle est par définition une représentation simplifiée d'un processus ou d'un système. Il vise à en faciliter la compréhension. Certains modèles tentent de résumer des réalités complexes même si elles ne sont que partiellement comprises; ces modèles naissent d'un besoin d'utiliser les connaissances disponibles sur ces réalités. Malgré le développement d'outils d'analyse sophistiqués, de nombreuses questions relatives à ces réalités peuvent rester sans réponse, souvent pendant des années.

Certaines réponses nécessitent d'adapter les modèles développés jusque-là, d'abandonner certains usages des connaissances acquises et d'en développer de nouveaux. Dans certains cas, par contre, des réponses ne sont pas immédiatement reconnues comme telles parce qu'elles contredisent des paradigmes: elles peuvent occasionner des débats interminables puisqu'elles ne peuvent être expliquées par les modèles courants ni par de nouveaux modèles basés sur les paradigmes fautifs. Des percées technologiques sont parfois nécessaires pour remettre des concepts de base en question et faciliter leur rejet *théorique*. Le rejet *effectif* de ces concepts et des modèles qu'ils supportaient, par contre, peut s'avérer particulièrement difficile si ces concepts et modèles :

- 1- concernent un domaine vis-à-vis duquel un grand nombre d'individus éprouvent des besoins considérés comme importants;
- 2- servent de fondements à des usages de connaissances très répandus, qui comblent «au moins partiellement» ces besoins;
- 3- servent de fondements à de nombreux schèmes de pensée de ce domaine (ex. systèmes de classification des connaissances);
- 4- ont été si longtemps utilisés que le vocabulaire du domaine y fait appel de manière souvent implicite.

Depuis plusieurs décennies, malgré l'introduction de la microscopie électronique, des colorations enzymatiques, de l'IHC, puis de techniques de biologie moléculaire de plus en plus sophistiquées, de nombreuses questions de sénologie demeurent sans réponse. Nos moyens technologiques nous révèlent l'extraordinaire complexité de cet organe mais sans nous en donner une compréhension «suffisante» : chaque année, de nombreuses femmes

meurent d'un cancer du sein, souvent au terme d'une lutte éprouvante qui peut durer de quelques mois à plusieurs années. Ni la chirurgie, ni les traitements adjuvants ne garantissent une survie sans récurrences, sans inquiétude. En pathologie mammaire, les observations inexplicables, les controverses irrésolues, les succès thérapeutiques mitigés et les échecs thérapeutiques répétés confirment les limites de nos modèles, classifications et principes/pratiques de traitement actuels. Leur ré-évaluation est cependant délicate puisqu'ils ont un impact majeur sur la santé et même la vie de beaucoup de femmes. Des concepts identifiés comme simplistes ou erronés par un nombre grandissant de chercheurs et de cliniciens entravent par ailleurs cette ré-évaluation (ex. *two-cell concept*; concept de différenciation terminale). Ces concepts limitatifs retardent par exemple la reconnaissance de l'importance physiologique des CMEM puisqu'ils sont incompatibles avec certaines de leurs propriétés. Ainsi, la vision selon laquelle la *maturation* de *chaque* cellule épithéliale du sein normal mènerait à son adoption d'un état de *différenciation terminale* n'admet pas la plasticité requise des CMEM pour une médiation efficace des interactions épithélio-stromales du sein normal (ni, d'ailleurs, l'existence de phénomènes de trans-différenciation ou de réversion phénotypique dans le sein normal et pathologique^{405,420,449,450}).

Comme notre redéfinition des CMEM humaines, notre modèle d'initiation de la morphogenèse du sein *in utero* s'appuie sur une vision de la sénologie qui diffère sensiblement de celle actuellement privilégiée dans la littérature médicale :

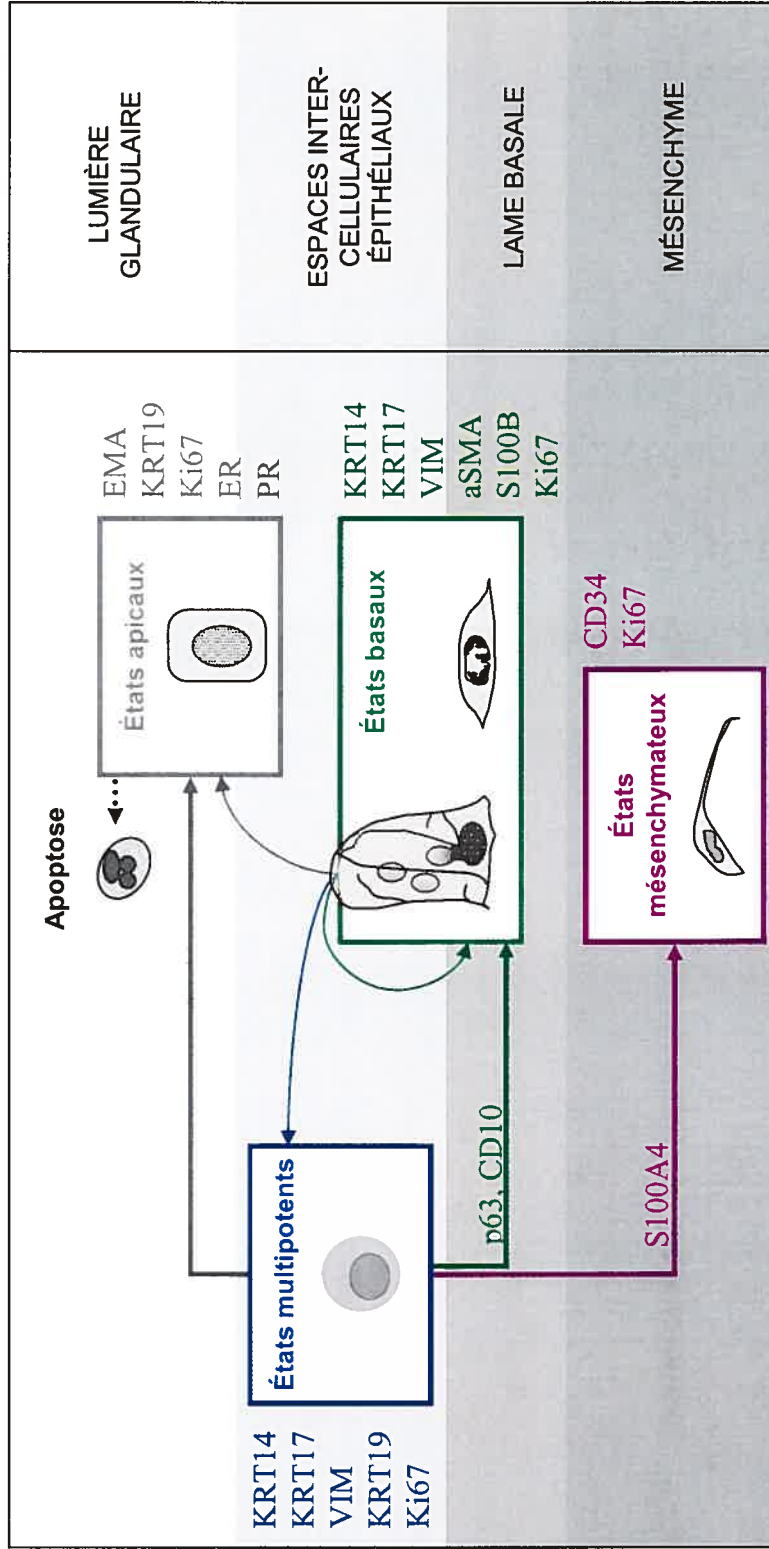
- 1- elle rejette les concepts de «programmes de différenciation», d'«états de différenciation terminale» et de «populations cellulaires». Les schèmes de pensée basés sur ces concepts réductionnistes n'admettent pas la plasticité des constituants du sein malgré qu'elle soit démontrée en recherche comme en clinique^{405,420}. La vision développée ici accorde plus d'importance aux dynamiques qui s'établissent entre les constituants mammaires (capacités de prolifération et de différenciation actualisées et latentes; comportements qui en résultent) qu'à leur caractérisation individuelle (origine ectodermique, mésodermique ou endodermique; nature luminale, myoépithéliale, souche, fibroblastique, etc.);
- 2- elle s'intéresse autant – sinon plus - à l'impact physiologique de l'espace qu'à celui du temps. Elle souligne ainsi l'apport physiologique déterminant des interactions épithélio-stromales (physiologie glandulaire) et des interactions cellule-micro-environnement (physiologie tissulaire) dans le sein. Cette approche spatio-

temporelle, non «déterministe», permet de reconnaître la validité d'observations de phénomènes qui semblent contradictoires lorsque présumés séquentiels (i.e. interprétés comme des étapes d'un programme de différenciation unique, pré-établi) mais non lorsque considérés comme concomitants et mutuellement exclusifs (i.e. interprétés comme des options d'entités de potentiels - et non de destinées - déterminés).

Nos travaux sur les CMEM humaines démontrent que cette vision plus «confuse» de la physiologie mammaire parvient à décrire des aspects de la complexité du sein qui échappent aux approches médicales traditionnelles. Tel que mentionné plus tôt (section Redéfinition des cellules myoépithéliales du sein), les approches «par logique floue» reposent sur l'utilisation de notions et définitions peu rigides; exploitées depuis longtemps dans le domaine de l'intelligence artificielle, elles font leur entrée en médecine de façon sûre mais un peu tardive^{366,367,451,452,453,454,455,456,457,458,459,460,461,462,463,464}. La force de telles approches ressemble, de prime abord, à une faiblesse. En effet, elles s'avèrent particulièrement adaptées à la description de phénomènes biologiques en raison de leur caractère malléable : elles tolèrent un degré d'imprécision permettant l'intégration des facettes typiquement multiples des phénomènes étudiés par les sciences de la vie (tel que décrit en 1969 par Zadeh, cité par Steiman³⁶⁶). En sénologie, via la bio-informatique, les approches «par logique floue» ouvrent notamment la voie au diagnostic assisté par ordinateur. Nos travaux soulignent le risque que des concepts désuets limitent les progrès effectués en ce sens, la réputation de «cellule accessoire» des CMEM humaines risquant par exemple de se traduire par des biais de programmation de logiciels.

Le modèle de la Figure 36 tente de résumer notre vision «par logique floue» de la physiologie mammaire. Cette version préliminaire s'appuie sur les observations décrites dans cette thèse, sur notre revue de la littérature de domaines médicaux et para-médicaux ainsi que sur certaines hypothèses générées par nos travaux (ex. EMT comme phénomène physiologique et non seulement pathologique). La validation de ce modèle fait présentement l'objet de collaborations.

Figure 36 Potentiels de transformation envisagés de constituants mammaires humains



Les flèches illustrent des potentiels de transformation réalisés, en voie de l'être ou latents de constituants du sein d'états multipotents (bleu) ou basaux (vert); le gris désigne des états apicaux, le violet identifie des états mésenchymateux et le noir, une mort par apoptose. Batterie d'immunohistochimie (proposée dans la discussion): les antigènes-cibles inscrits au-dessus de flèches pourraient être des marqueurs de transformations et ceux inscrits à côté d'encadrés, des marqueurs de fonctions/potentiels souvent – et non « systématiquement » – adoptés par des représentants des états de même couleur. La lame basale mammaire serait souvent immunoréactive pour le CollIV et le CollVII.

Explication du modèle envisagé

Le code de couleurs des flèches et encadrés de la Figure 36 ressemble à celui du modèle d'initiation de la morphogenèse du sein foetal (états épithéliaux multipotents : **bleu**; état épithéliaux basaux : **vert**; états épithéliaux apicaux : **gris foncé**; états mésenchymateux : **violet**). La mort cellulaire par apoptose y est indiquée en **noir**.

Tel que mentionné au moment de redéfinir «la CMEM humaine», l'épithélium mammaire humain contiendrait des progéniteurs multipotents capables d'adopter des états viables distincts (états épithéliaux multipotents, basaux et apicaux; états mésenchymateux); bien qu'à des degrés différents, les constituants mammaires moduleraient et seraient continuellement modulés par leur micro-environnement via des interactions de nature biochimique, spatiale, physique et autres. Dans ce modèle, les **flèches** illustrent des possibilités de transformation (potentiels cellulaires réalisés, ou en voie de l'être, ou latents); elles n'impliquent pas qu'une cellule donnée adopte successivement les états indiqués. Le terme «état» est utilisé au pluriel pour indiquer que les constituants mammaires demeurent uniques même s'ils adoptent des profils parfois similaires.

En effet, à un instant précis de son existence, les propriétés d'un constituant mammaire donné dépendraient :

- 1- de ses propriétés «de naissance» ou «initiales» (c'est-à-dire de sa composition génétique, épigénétique, protéique, etc., au moment de son individualisation comme cellule-fille);
- 2- du contexte micro-environnemental de sa naissance;
- 3- de son «historique» cellulaire propre.

Le terme *historique* désigne ici la suite d'événements auxquels tout constituant mammaire donné est exposé entre sa naissance et l'instant où il est étudié, événements responsables du cumul d'altérations plus ou moins durables de ses propriétés initiales. Issus de progéniteurs aux propriétés plus ou moins dissemblables exposés à des micro-environnements divers, chaque constituant mammaire serait donc unique. Comme processus physiologiques, les poussées de croissance mammaires ne seraient pas non plus itératives (impact de *l'historique* des constituants cellulaires impliqués sur leur

déroulement); chaque poussée de croissance accentuerait de surcroît ces divergences en «ajoutant des chapitres» aux historiques des constituants mammaires. Les mécanismes de réparation de l'ADN s'opposeraient à cette divergence de propriétés, certaines marques épigénétiques l'accroissant plutôt de façon plus ou moins réversible. L'exposition de progéniteurs de propriétés analogues à des micro-environnements similaires se traduirait néanmoins par leur adoption d'états relativement uniformes en présence de micro-environnements homogènes, d'où la possibilité de discuter de ces constituants en termes d'«états» généraux.

Les représentants des états encadrés à la Figure 36 conserveraient des potentiels de prolifération et de différenciation non nuls. Ces deux types de potentiels seraient préservés et sollicités indépendamment, tel que suggéré par nos observations (présence de figures de division cellulaire dans des cellules de position et de profils phénotypiques différents) et par la littérature (ex. phénotypes «intermédiaires» variables adoptés par des CMEM et des CLUM «terminalement différenciées» mises en culture^{99,267,280,355,379,389,390}). Certains contextes physiologiques favoriseraient le déroulement de processus trans-différenciation, de réversion phénotypique et d'EMT.

Ce modèle ne prévoit pas une représentation égale et fixe, dans le temps, des états illustrés : à un moment donné, le nombre et la variété de leurs représentants dépendraient plutôt des interactions épithélio-stromales et cellule-micro-environnement établies focalement. Certains états seraient donc sous-représentés dans certaines portions de l'arbre glandulaire et/ou pendant certaines phases du cycle mammaire (transformations intra- et inter-états inégalement favorisées en présence de micro-environnements différenciant par leurs propriétés biochimiques, architecturales ou par les forces physiques qui s'y génèrent). Le micro-environnement fourni par le stroma intra-lobulaire en période lutéale, par exemple, serait particulièrement propice à la vacuolisation extrême de représentants d'états basaux. La sollicitation vraisemblablement concomitante de leur potentiel prolifératif favoriserait le déroulement de mitoses asymétriques; les «options d'états» des cellules mère-fille et fille(s) impliquées dépendraient principalement des propriétés de leur micro-environnement immédiat respectif.

Ces mitoses asymétriques permettraient la genèse *de novo* de représentants d'états multipotents (approchant le concept actuel de «cellules souches» de par leur potentiel multipotent effectif) ; tel qu'indiqué à la Figure 36, chacun d'eux pourrait :

- 1- conserver son statut multipotent à plus ou moins long terme, ce qu'indique la **mince flèche bleue** au niveau des espaces inter-cellulaires épithéliaux ;
- 2- adopter un état apical, ce qu'indique la **mince flèche grise** traversant la frontière entre les espaces inter-cellulaires et la lumière glandulaire ;
- 3- adopter un état basal, ce qu'indique la **mince flèche verte** traversant la frontière entre les espaces inter-cellulaires épithéliaux et la lame basale.

En effet, l'adoption ou la conservation de certains états par les progéniteurs multipotents mammaires dépendrait largement de leur exposition ou non-exposition à des stimuli micro-environnementaux causant leur polarisation. L'épithélium du sein adulte normal au repos présenterait quatre régions particulièrement significatives à cet égard :

- 1- les espaces inter-cellulaires épithéliaux : micro-environnement permissif vis-à-vis du maintien d'états multipotents parce que pauvre en stimuli pro-polarisation;
- 2- la frontière entre la lame basale épithéliale et les espaces inter-cellulaires épithéliaux : micro-environnement riche en stimuli inertes pro-polarisation basale (ex. laminine 1^{44,160} de l'ECM basale), provoquant l'adoption ou le maintien d'états basaux. La disparition subséquente de ces stimuli entraînerait rarement la mort de représentants d'états basaux, ceux-ci étant habituellement capables de les re-synthétiser;
- 3- la frontière entre les espaces inter-cellulaires épithéliaux et la surface apicale de progéniteurs ayant adopté certains états basaux : micro-environnement riche en stimuli cellulaires pro-polarisation basale (ex. membranes apicales de certains représentants d'états basaux¹⁰⁵), provoquant l'adoption ou le maintien d'états apicaux. La disparition subséquente de ces stimuli, non compensée (ex. par une ECM basale), entraînerait souvent la mort par apoptose de représentants d'états apicaux;
- 4- la frontière entre l'épithélium mammaire et la lumière glandulaire : micro-environnement facilitant l'adoption d'états apicaux, mais possiblement insuffisant pour la provoquer. Il présenterait des stimuli pro-polarisation apicale qui seraient de nature inerte (ex. mucine-1⁴⁶⁵ de l'ECM apicale⁴⁶⁶) et/ou mécanique (absence de

contacts cellulaires); la disparition subséquente de ces stimuli entraînerait rarement la mort de représentants d'états apicaux.

L'architecture caractéristique de l'épithélium glandulaire du sein dépendrait largement de la présence ou de l'absence des signaux pro-polarisation décrits ci-dessus dans le micro-environnement de progéniteurs multipotents naissants^{42,364}. Notre modèle n'indique pas mais ne s'oppose pas non plus à l'idée que des interactions cellule-cellule soient nécessaires et suffisantes pour amorcer cette structuration si des représentants d'états multipotents prolifèrent sans rencontrer de stimuli pro-polarisation. Des progéniteurs mammaires isolés, maintenus artificiellement en suspension, peuvent en effet générer des mammosphères creuses³⁶⁰; la formation de ces structures s'accompagne par contre très précocement d'une synthèse d'ECM. Bien que de telles conditions semblent peu représentatives de contextes physiologiques normaux dans le sein adulte, elles pourraient cependant l'être d'un contexte pathologique (ex. représentants altérés d'états multipotents ne reconnaissant plus certains signaux pro-polarisation de leur micro-environnement).

Les représentants d'états basaux agiraient en tant que «réservoirs de progéniteurs». Ce potentiel ne deviendrait effectif qu'en des conditions micro-environnementales spécifiques, à l'instar du potentiel de germination de semences végétales, en quelque sorte (profil cellulaire pluri-nucléé et vacuolisé de gauche). Les figures de mitose asymétrique seraient des marqueurs morphologiques de la réalisation de ce potentiel progéniteur. Un marquage positif pour le Ki67, moins spécifique d'un point de vue fonctionnel, indiquerait simplement qu'une cellule donnée est activement engagée dans un processus de prolifération (sans égards à son état ou au type de prolifération en cours). Dans l'encadré des états basaux, le profil cellulaire fusiforme à noyau unique symbolise les états basaux pour lesquels cette capacité de «réservoir de progéniteur» est latente. D'après nos observations, outre certaines caractéristiques morphologiques (ex. vacuolisation, multiples noyaux), les représentants d'états basaux dotés d'une capacité progénitrice en train de s'actualiser se démarqueraient immunohistochimiquement de ceux de capacité franchement latente (ex. polarisation basale prononcée et intensité souvent plus faible du marquage pour l' α SMA). Les profils cellulaires regroupés dans le cadre unique des états basaux illustrent donc les extrêmes d'un continuum d'états associés à des capacités variables. Nos observations ne s'opposent pas à ce qu'une telle relation «réservoir-progéniteur» lie

certaines états apicaux et multipotents⁴⁶⁷. Elles ne le suggèrent par contre pas (d'où l'absence de flèche partant de l'encadré des premiers vers l'encadré des seconds), peut-être en raison du nombre insuffisant ou de la nature des antigènes luminaux ciblés par nos travaux. Il est cependant aussi possible que le contingent de cellules présentant un potentiel progéniteur occupe une position plus basale qu'apicale dans l'épithélium de la glande mammaire comme dans celui d'autres organes (ex. peau¹⁰⁷, côlon⁴⁶⁸, prostate⁴⁶⁹).

Des modèles antérieurs ont attribué une position basale/supra-basale aux progéniteurs du sein, mais sans les associer aussi «intimement» aux CMEM. Une telle association pourrait expliquer les controverses entourant les propriétés de «la» population épithéliale souche du sein adulte (ex. cellules décrites tantôt comme de grandes cellules claires⁹⁸ tantôt comme de petites cellules épithéliales d'aspect monotone⁹⁹), par exemple. Aussi, la position exacte occupée par les progéniteurs «ultimes» du sein adulte demeure au coeur de vifs débats, certains modèles affirmant qu'ils font partie du compartiment basal/supra-basal^{98,155} et d'autres, du compartiment luminal⁴⁷⁰. Notre modèle pourrait réconcilier ces visions : l'adoption et la conservation d'états multipotents seraient permises par les espaces inter-cellulaires épithéliaux plutôt que par un compartiment épithélial «classique» donné.

Enfin, nos analyses d'IHC ciblaient peu les états mésenchymateux et ne ciblaient pas l'état apoptotique. Tel que discuté précédemment, certaines de nos données et la littérature suggèrent que certains constituants mammaires mésenchymateux dériveraient de constituants épithéliaux dans le sein normal – une hypothèse à confirmer. La relation préférentielle proposée par notre modèle entre l'apoptose et les états apicaux s'accorde avec certaines données publiées sur les CLUM^{83,121,371}. De plus, les CMEM sont reconnues pour leur résistance à l'apoptose qui serait liée à leur capacité de synthèse d'ECM, à leur capacité de retrait du cycle cellulaire et, possiblement, à leur adoption d'une forme plus étalée que celle des CLUM^{51,52,392}. Une analyse d'IHC incluant des marqueurs d'apoptose permettrait de vérifier cet aspect du modèle.

Autres contextes

Compatible avec notre modèle d'initiation de la morphogenèse *in utero*, ce second modèle établirait une continuité entre des phénomènes et contextes physiologiques étudiés séparément, par exemple:

- 1- la «disparition de CMEM» dans les TDLU en période de gestation et d'allaitement⁴⁷¹ : contexte physiologique favorisant l'adoption d'états multipotents et apicaux plutôt que d'états basaux;
- 2- l'aspect particulier de l'arbre mammaire de femmes ménopausées âgées, cet ensemble de structures glandulaires variablement atrophiées, d'allure principalement canalaire, ne comportant souvent plus que des CMEM^{20,95} : contexte physiologique favorisant le maintien d'états basaux, mais non l'adoption ou le maintien d'états apicaux et multipotents. La chute des niveaux plasmatiques d'hormones stéroïdiennes pourrait être compensée focalement par l'aromatation de dépôts graisseux mammaires^{31,472}, d'où le maintien d'états apicaux et possiblement multipotents dans certains éléments glandulaires;
- 3- les activités de croissance et de sécrétion du sein, essentiellement nulles chez l'enfant pré-pubère^{161,163} bien qu'elles soient typiquement importantes juste avant la naissance, à l'adolescence et en phase lutéale chez la femme pré-ménopausée : les variations des taux sériques d'hormones stéroïdiennes impliquées par ces contextes physiologiques favoriseraient, respectivement, l'adoption d'états apicaux et multipotents, l'adoption d'états basaux, puis à nouveau l'adoption d'états apicaux et multipotents.

L'approche physiologique véhiculée par nos modèles implique que chez le fœtus, le développement mammaire ne serait pas le fruit d'un enchaînement «pré-déterminé» d'étapes définies : il s'agirait d'un enchaînement de comportements cellulaires devenu «plus probable», au terme de milliers d'années de sélection naturelle, parce qu'efficace pour produire une glande essentielle à la survie de l'espèce (dans un contexte naturel, cela s'entend). Le développement de carcinomes obéirait aux mêmes règles biologiques sans être régi par une telle pression sélective; il récapitulerait plus ou moins imparfaitement les enchaînements de «croissance normale» en raison, par exemple, des historiques plus longs des constituants mammaires (possibilité d'un cumul d'insultes) et de différences de

contexte hormonal (ex. hormones d'origine «personnelle» plutôt que «maternelle»). Les comportements adoptés *focalement* par des cellules carcinomateuses ne seraient pas nécessairement chaotiques, ce que suggèrent d'ailleurs :

- 1- les phénomènes de réversion^{397,398,399};
- 2- l'aspect organoïde de foyers carcinomateux décrits dans cette thèse (ex. cas d'adénomyoépithéliome malin) et par d'autres^{362,395,396,426};
- 3- les ressemblances souvent frappantes entre les PS de nos spécimens fœtaux et certains regroupements de cellules cancéreuses - notamment ces «morules» retrouvées dans plusieurs organes (ex. utérus^{473,474,475,476}, ovaires⁴⁷⁷, côlon^{478,479,480}, thyroïde⁴⁸¹) dont le sein^{482,483,484}. Ces structures se démarquent habituellement des foyers cancéreux qui les abritent par leur architecture sphéroïde, mais aussi par leur comportement et leur profil antigénique distinctifs⁴⁸⁵. Nous en avons repéré dans les fronts d'invasion de trois carcinomes de notre cohorte (cas T7, Figure 21 en H; cas T10 non montré; cas T14, Figure 25 en C, D et L à gauche). En MO et en IHC, leurs attributs sont très similaires à ceux des agglomérations cellulaires supra-basales à l'origine de PS fœtales (ex. cas F9 et F12 : Figure 13, à gauche en G et R). Nos observations appuient celles d'autres chercheurs, soulignant le caractère «foetal»⁴⁸¹ de ces regroupements de cellules carcinomateuses morphologiquement uniformes⁴⁷⁷. Rappelant les mammosphères de progéniteurs du sein cultivées en suspension^{105,360}, les agglomérations cellulaires à l'origine de PS fœtales et les morules de carcinomes pourraient être composées de représentants d'états multipotents interprétant leur micro-environnement comme «dépourvu de stimuli pro-polarisation».

Sans être prédictif, le modèle proposé à la Figure 36 propose d'aborder différemment l'étude d'entités et de phénomènes pathologiques encore peu compris en pathologie mammaire. Le partage d'altérations génétiques par les composantes épithéliale et mésenchymateuse de fibroadénomes et de carcinomes mammaires^{413,417,423}, par exemple, pourrait simplement trahir l'existence encore peu documentée de processus d'EMT dans le sein. Les insultes ainsi partagées seraient acquises à maturité plutôt qu'*in utero*, d'où leur manifestation «surprenamment tardive»; certaines insultes ne se manifesteraient qu'à l'adoption d'un état mésenchymateux ou épithélial, d'où la découverte «imprévue» d'altérations de CMEM et de CLUM dans certains cas de fibroadénomes, ou d'altérations

de fibroblastes dans certains cas de carcinomes du sein, respectivement. D'après ce modèle, enfin, une incompatibilité fonctionnelle naturelle ou acquise entre constituants mammaires pourrait être à l'origine de lésions mammaires (ex. des changements fibrokystiques pourraient résulter d'insultes cellulaires ou simplement d'une régulation d'EMT moins efficace aux frontières de territoires d'inactivation d'X distincts - d'où le caractère multifocal et la difficulté d'identifier «les insultes» responsables de tels phénomènes).

En somme, ce modèle propose que les phénomènes de croissance observés dans le sein fœtal, adulte normal et pathologique font partie d'un *continuum* dont la complexité ne gagne pas à être morcelée pour être comprise. Il présente chaque poussée de croissance comme une récapitulation imparfaite des poussées de croissance qui l'ont précédée. Ceci expliquerait les nombreux parallèles décrits entre l'embryogenèse et la carcinogenèse mammaire; les parallèles entre l'état adulte de repos et la carcinogenèse ne seraient pas moins nombreux, mais plus difficilement acceptés parce que contraires à de nombreux paradigmes actuels. La vision de la sénologie véhiculée par notre redéfinition des CMEM humaines et par nos modèles suggère donc d'étendre considérablement la théorie de Knudson sur la carcinogenèse⁴⁸⁶, le «normal» et le «pathologique» devenant les pôles d'un *continuum* de fonctionnalité. La carcinogenèse résulterait de l'incompatibilité naturelle ou acquise, dans certains contextes physiologiques, de protagonistes assurant la réalisation de fonctions diverses – que cette incompatibilité découle ou non de l'accumulation d'insultes spécifiques (ex. impliquant des proto-oncogènes) par une seule cellule.

CONCLUSION

Nos travaux sur la CMEM humaine visaient à déterminer si le faible nombre et la spécificité des marqueurs myoépithéliaux utilisés en sénologie contribuent à masquer l'importance physiologique de ce type cellulaire. Cette étude a été réalisée dans conditions expérimentales reproduisant le plus fidèlement possible le contexte de travail en milieu hospitalier, à l'aide d'échantillons de tissu mammaire humain formant une triade «fœtal normal – adulte normal – pathologique».

Notre emploi de techniques conventionnelles et de pointe nous aura permis de compléter, de confirmer et de préciser plusieurs affirmations de la littérature concernant cette cellule méconnue de l'épithélium glandulaire du sein. Ainsi, nos travaux apportent des précisions inédites sur les propriétés des précurseurs fœtaux de CMEM au cours du deuxième trimestre de gestation. Par exemple, d'après nos données, la localisation par IHC de l' α SMA n'est pas un marqueur très précoce de l'adoption d'un phénotype basal par des cellules épithéliales de la glande mammaire immature - contrairement à la localisation par IHC de la vimentine, de la S100 β , de la KRT14 ou encore de la KRT17. Le volet «fœtal» de notre étude souligne par ailleurs qu'il y a risque de confondre les primordia mamelonnaire et mammaire humains à ces âges, ce qui pourrait contribuer à expliquer certaines informations discordantes de la littérature. Dans le cadre du volet «pathologique» de l'étude, nous avons documenté extensivement le profil antigénique des CMEM de carcinomes myoépithéliaux malins rarissimes, particulièrement agressifs.

L'étude parallèle d'échantillons de sein adulte normal et pathologique nous a permis de comparer l'efficacité respective des 15 antigènes suivants en tant que marqueurs de CMEM : 67LR, α 6, β 1, β 4, CD10, CD44v6, KRT14, KRT17, VIM, GFAP, α SMA, CNN1, S100 β , S100A4 et p63. Tous ces marqueurs reconnus ou putatifs ont démontré au moins l'une des limitations suivantes : un manque de sensibilité (67LR, CD10, CD44v6, KRT14, KRT17, VIM, GFAP, CNN1, S100 β , S100A4 et p63), un manque de spécificité inter-tissulaire (67LR, α 6, β 1, β 4, CD44v6, VIM, α SMA, CNN1, S100 β et S100A4) et/ou un manque de spécificité intra-tissulaire (67LR, α 6, β 1, β 4, CD44v6, VIM, S100 β et S100A4). Quoique privilégiés en pathologie mammaire diagnostique, les marquages pour l' α SMA, la CNN1 et le p63 nous apparaissent moins sensibles que ce que la littérature

prédit. D'après ces données, la recherche par IHC de CMEM à des fins diagnostiques bénéficierait tant d'un accroissement du nombre d'antigènes myoépithéliaux ciblés par les batteries d'anticorps utilisées en pratique courante que de leur diversification (ex. cibler des récepteurs membranaires et des FI individuellement et non seulement des protéines associées à la différenciation de type musculaire lisse). À moyen terme, nos travaux devraient permettre d'optimiser les batteries d'anticorps utilisées à des fins de diagnostic en pathologie mammaire.

Notre documentation des propriétés de la CMEM humaine visait à optimiser la recherche par IHC de ce type cellulaire à des fins diagnostiques, mais aussi à approfondir certains aspects encore sous-documentés/controversés de sa biologie. De fait, nos efforts de caractérisation ont mis en évidence des variations inattendues, non aléatoires du phénotype de la CMEM humaine. Certaines de ces variations semblent présentes dans le sein foetal, adulte normal et pathologique; elles s'accompagnent fréquemment de variations de propriétés d'autres constituants de la jonction épithélio-stromale mammaire, d'où l'intérêt de documenter simultanément plusieurs éléments de cette unité fonctionnelle en sénologie. Les variations de l'immunophénotype myoépithélial suggèrent la co-existence de CMEM et de CLUM similaires mais non identiques à l'intérieur de compartiments anatomiques/histologiques du sein normal et pathologique. Nos résultats d'IHC, de colorations enzymatiques et de RT-PCR indiquent que des différences existent entre les CMEM des CE et des TDLU du sein adulte normal au repos qui ne sont pas strictement morphologiques.

Selon la présente étude, les cellules basales de l'épithélium du sein ne seraient pas les membres d'une population homogène de cellules terminalement différenciées et physiologiquement accessoires, mais plutôt des constituants mammaires uniques, dotés de potentiels de différenciation et de prolifération non nuls; ces potentiels leur permettraient de remplir des rôles variés et physiologiquement cruciaux dans différents contextes physiologiques et pathologiques.

Plus qu'une simple curiosité, la «double-nature» malléable des CMEM témoignerait de leur rôle séminal au cœur de la jonction épithélio-stromale mammaire. D'après nos observations de CMEM du sein foetal, adulte normal et pathologique, de nombreuses

controverses entourant les CMEM humaines découleraient du fait qu'elles agissent à titre de «charnières» physiologiques et conceptuelles, en sénologie. Ceci expliquerait leur importance... et la difficulté de mettre cette dernière en évidence. La plasticité des CMEM dévoilée par nos travaux et par ceux d'autres chercheurs remet en question leur réputation d'«alliées de l'hôte» et le bien-fondé de certaines pratiques actuelles en pathologie mammaire diagnostique. En effet, nos travaux suggèrent que l'utilisation inconsidérée de certains marqueurs de CMEM pourrait conduire à des erreurs diagnostiques.

Nos travaux redéfinissent la CMEM humaine comme une composante physiologique essentielle du sein normal et pathologique; l'étude de sa complexité sous-estimée nous amène à envisager la sénologie sous un angle plus probabiliste que déterministe. D'après nous, en plus de favoriser le développement d'outils cliniques à partir de résultats expérimentaux, la médecine «translationnelle» devra vraisemblablement contribuer à renverser certains paradigmes et à modifier certaines façons de penser et d'agir, en pathologie mammaire. Il ne s'agit pas de faire table rase des pratiques et connaissances actuelles, mais bien de réexaminer les schèmes de pensée existants pour favoriser une articulation plus fonctionnelle des acquis présents et futurs de la sénologie fondamentale et appliquée. À notre avis, de par les ressources humaines et matérielles dont ils disposent, les centres de recherche d'hôpitaux universitaires sont appelés à jouer un rôle de premier plan dans le virage translationnel entrepris par la médecine.

REMERCIEMENTS

Formation

Dr Louis A. Gaboury, directeur

Dr Luc L. Oigny, co-directeur

ainsi que...

Dre Claire Landry

Mme Danielle Grimard

Dr Walter Schürch

Mme Nancy Grégoire

Support financier

CRSNG (FJ/MSc)

Montreal Breast Cancer Foundation

Fondation de l'Hôpital Sainte-Justine (FJ/PhD)

Département de pathologie et biologie cellulaire de

l'Université de Montréal (FJ/PhD)

Accès aux spécimens

Dr André Robidoux

Dr Gilles Beaugard

Dr Richard Moufarrège

Mme Chantale Asselin, infirmière

Aide pour la collecte de spécimens

Dr Lydia Oudi

Dr Claude Grenier

Dr Karim Ouallouch

Dr Linda Abed

Conseils techniques

Dr Martin Bourbonnière

M. Denis Rodrigue

Mme Andrée de Montigny

M. Som Chatterjee

Échanges

Dr Hugo Soudeyns

Dr Gilles Tremblay

Dr Cheri Deal

Dr Dorothée Bouron-Dal Soglio

Mme Catherine Hamelin

Collaboration

Membres des départements de pathologie de l'Hôpital Notre-Dame et de l'Hôtel-Dieu du CHUM, du département de pathologie et du Centre de recherche de l'Hôpital Sainte-Justine, du département de pathologie et biologie cellulaire de l'Université de Montréal, ainsi que Mmes Veronika Jolicoeur et Lucie Jolicoeur (révision).

À ma famille, à Janine et Michel, à Julie

et à tous les autres qui m'ont appuyée par leurs encouragements:

Merci de tout coeur!

SOURCES DOCUMENTAIRES

- (1) Dabbs, D. J. Diagnostic Immunohistochemistry of the Breast. In *Diagnostic Immunohistochemistry*; Dabbs, D. J., Ed.; Churchill-Livingstone: Philadelphia, 2002; Chapter 17.
- (2) Skalli, O.; Ropraz, P.; Trzeciak, A.; Benzoni, G.; Gillessen, D.; Gabbiani, G. A Monoclonal Antibody Against Alpha-Smooth Muscle Actin: a New Probe for Smooth Muscle Differentiation. *J. Cell Biol.* **1986**, *103*, 2787-2796.
- (3) Gugliotta, P.; Sapino, A.; Macri, L.; Skalli, O.; Gabbiani, G.; Bussolati, G. Specific Demonstration of Myoepithelial Cells by Anti-Alpha Smooth Muscle Actin Antibody. *J. Histochem. Cytochem.* **1988**, *36*, 659-663.
- (4) Perou, C. M.; Sorlie, T.; Eisen, M. B.; van de, R. M.; Jeffrey, S. S.; Rees, C. A.; Pollack, J. R.; Ross, D. T.; Johnsen, H.; Akslen, L. A.; Fluge, O.; Pergamenschikov, A.; Williams, C.; Zhu, S. X.; Lonning, P. E.; Borresen-Dale, A. L.; Brown, P. O.; Botstein, D. Molecular Portraits of Human Breast Tumours. *Nature* **2000**, *406*, 747-752.
- (5) Jones, C.; Nomni, A. V.; Fulford, L.; Merrett, S.; Chaggar, R.; Eusebi, V.; Lakhani, S. R. CGH Analysis of Ductal Carcinoma of the Breast With Basaloid/Myoepithelial Cell Differentiation. *Br. J. Cancer* **2001**, *85*, 422-427.
- (6) Raymond, W. A.; Leong, A. S. Co-Expression of Cytokeratin and Vimentin Intermediate Filament Proteins in Benign and Neoplastic Breast Epithelium. *J. Pathol.* **1989**, *157*, 299-306.
- (7) Raymond, W. A.; Leong, A. S. Vimentin--a New Prognostic Parameter in Breast Carcinoma? *J. Pathol.* **1989**, *158*, 107-114.
- (8) Domagala, W.; Lasota, J.; Bartkowiak, J.; Weber, K.; Osborn, M. Vimentin Is Preferentially Expressed in Human Breast Carcinomas With Low Estrogen Receptor and High Ki-67 Growth Fraction. *Am. J. Pathol.* **1990**, *136*, 219-227.
- (9) Domagala, W.; Wozniak, L.; Lasota, J.; Weber, K.; Osborn, M. Vimentin Is Preferentially Expressed in High-Grade Ductal and Medullary, but Not in Lobular Breast Carcinomas. *Am. J. Pathol.* **1990**, *137*, 1059-1064.
- (10) Domagala, W.; Lasota, J.; Dukowicz, A.; Markiewski, M.; Striker, G.; Weber, K.; Osborn, M. Vimentin Expression Appears to Be Associated With Poor Prognosis in Node-Negative Ductal NOS Breast Carcinomas. *Am. J. Pathol.* **1990**, *137*, 1299-1304.
- (11) Domagala, W.; Striker, G.; Szadowska, A.; Dukowicz, A.; Harezga, B.; Osborn, M. P53 Protein and Vimentin in Invasive Ductal NOS Breast Carcinoma-- Relationship With Survival and Sites of Metastases. *Eur. J. Cancer* **1994**, *30A*, 1527-1534.
- (12) Damiani, S.; Riccioni, L.; Pasquinelli, G.; Eusebi, V. Poorly Differentiated Myoepithelial Cell Rich Carcinoma of the Breast. *Histopathology* **1997**, *30*, 542-548.
- (13) Damiani, S.; Ludvikova, M.; Tomasic, G.; Bianchi, S.; Gown, A. M.; Eusebi, V. Myoepithelial Cells and Basal Lamina in Poorly Differentiated in Situ Duct Carcinoma of the Breast. An Immunocytochemical Study. *Virchows Arch.* **1999**, *434*, 227-234.

- (14) Vorherr, H. *The Breast. Morphology, Physiology and Lactation*; Academic Press: New York, 1974; pp 1-282.
- (15) Nalbandov, A. V. *Reproductive Physiology of Mammals and Birds*; W.H. Freeman and Company: San Francisco, 1976; pp 1-334.
- (16) *The Mammary Gland. Development, Regulation, and Function*; Plenum Press: New York, 1987; pp 1-625.
- (17) Hughes, E. S. R. *The Development of the Mammary Gland. Ann. R. Coll. Surg. Engl.* **1949**, *6*, 99-119.
- (18) Sakakura, T. *Mammary Embryogenesis. In The Mammary Gland. Development, Regulation, and Function*; Neville, M. C., Daniel, C. W., Eds.; Plenum Press: New York, 1987; Chapter 2.
- (19) Kopelovich, L.; Henson, D. E.; Gazdar, A. F.; Dunn, B.; Srivastava, S.; Kelloff, G. J.; Greenwald, P. *Surrogate Anatomic/Functional Sites for Evaluating Cancer Risk: an Extension of the Field Effect. Clin. Cancer Res.* **1999**, *5*, 3899-3905.
- (20) Tavassoli, F. A. *Pathology of the Breast*; McGraw-Hill: New York, 1999; pp 1-874.
- (21) Hart, J. E. *Endocrine Pathology of Estrogens: Species Differences. Pharmacol. Ther.* **1990**, *47*, 203-218.
- (22) Moore, C. J.; Pruess-Schwartz, D.; Mauthe, R. J.; Gould, M. N.; Baird, W. M. *Interspecies Differences in the Major DNA Adducts Formed From Benzo(a)Pyrene but Not 7,12-Dimethylbenz(a)Anthracene in Rat and Human Mammary Cell Cultures. Cancer Res.* **1987**, *47*, 4402-4406.
- (23) Cardiff, R. D.; Wellings, S. R. *The Comparative Pathology of Human and Mouse Mammary Glands. J. Mammary. Gland. Biol. Neoplasia.* **1999**, *4*, 105-122.
- (24) Dincer, Z.; Jasani, B.; Haywood, S.; Mullins, J. E.; Fuentealba, I. C. *Metallothionein Expression in Canine and Feline Mammary and Melanotic Tumours. J. Comp Pathol.* **2001**, *125*, 130-136.
- (25) Hovey, R. C.; Trott, J. F.; Vonderhaar, B. K. *Establishing a Framework for the Functional Mammary Gland: From Endocrinology to Morphology. J. Mammary. Gland. Biol. Neoplasia.* **2002**, *7*, 17-38.
- (26) Wellings, S. R.; Jensen, H. M.; Marcum, R. G. *An Atlas of Subgross Pathology of the Human Breast With Special Reference to Possible Precancerous Lesions. J. Natl. Cancer Inst.* **1975**, *55*, 231-273.
- (27) Faverly, D.; Holland, R.; Burgers, L. *An Original Stereomicroscopic Analysis of the Mammary Glandular Tree. Virchows Arch. A Pathol. Anat. Histopathol.* **1992**, *421*, 115-119.
- (28) McCarty, K. S.; Tucker, J. A. *Breast. In Histology for Pathologists*; Sternberg, S. S., Ed.; Raven Press, Ltd.: New York, 1992; Chapter 46.

- (29) Moffat, D. F.; Going, J. J. Three Dimensional Anatomy of Complete Duct Systems in Human Breast: Pathological and Developmental Implications. *J. Clin. Pathol.* **1996**, *49*, 48-52.
- (30) Ohtake, T.; Kimijima, I.; Fukushima, T.; Yasuda, M.; Sekikawa, K.; Takenoshita, S.; Abe, R. Computer-Assisted Complete Three-Dimensional Reconstruction of the Mammary Ductal/Lobular Systems: Implications of Ductal Anastomoses for Breast-Conserving Surgery. *Cancer* **2001**, *91*, 2263-2272.
- (31) Nimrod, A.; Ryan, K. J. Aromatization of Androgens by Human Abdominal and Breast Fat Tissue. *J. Clin. Endocrinol. Metab* **1975**, *40*, 367-372.
- (32) Delyspere, J. P.; Verdonck, L.; Vermeulen, A. Fat Tissue: a Steroid Reservoir and Site of Steroid Metabolism. *J. Clin. Endocrinol. Metab* **1985**, *61*, 564-570.
- (33) Atherton, A. J.; Monaghan, P.; Warburton, M. J.; Robertson, D.; Kenny, A. J.; Gusterson, B. A. Dipeptidyl Peptidase IV Expression Identifies a Functional Sub-Population of Breast Fibroblasts. *Int. J. Cancer* **1992**, *50*, 15-19.
- (34) Ozzello, L. Epithelial-Stromal Junction of Normal and Dysplastic Mammary Glands. *Cancer* **1970**, *25*, 586-600.
- (35) Timpl, R. Macromolecular Organization of Basement Membranes. *Curr. Opin. Cell Biol.* **1996**, *8*, 618-624.
- (36) Ekblom, P.; Timpl, R. Cell-to-Cell Contact and Extracellular Matrix. A Multifaceted Approach Emerging. *Curr. Opin. Cell Biol.* **1996**, *8*, 599-601.
- (37) Borradori, L.; Sonnenberg, A. Hemidesmosomes: Roles in Adhesion, Signaling and Human Diseases. *Curr. Opin. Cell Biol.* **1996**, *8*, 647-656.
- (38) Green, K. J.; Jones, J. C. Desmosomes and Hemidesmosomes: Structure and Function of Molecular Components. *FASEB J.* **1996**, *10*, 871-881.
- (39) Stahl, S.; Weitzman, S.; Jones, J. C. The Role of Laminin-5 and Its Receptors in Mammary Epithelial Cell Branching Morphogenesis. *J. Cell Sci.* **1997**, *110* (Pt 1), 55-63.
- (40) Borradori, L.; Sonnenberg, A. Structure and Function of Hemidesmosomes: More Than Simple Adhesion Complexes. *J. Invest Dermatol.* **1999**, *112*, 411-418.
- (41) Nievers, M. G.; Schaapveld, R. Q.; Sonnenberg, A. Biology and Function of Hemidesmosomes. *Matrix Biol.* **1999**, *18*, 5-17.
- (42) Boudreau, N.; Bissell, M. J. Extracellular Matrix Signaling: Integration of Form and Function in Normal and Malignant Cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* **1998**, *10*, 640-646.
- (43) Smoller, B. R.; Kohler S Subepidermal Vesicular Dermatitis. In *Textbook of Dermatopathology*; Barnhill, R. L., Ed.; McGraw-Hill: New York, 1998; Chapter 8.
- (44) Slade, M. J.; Coope, R. C.; Gomm, J. J.; Coombes, R. C. The Human Mammary Gland Basement Membrane Is Integral to the Polarity of Luminal Epithelial Cells. *Exp. Cell Res.* **1999**, *247*, 267-278.

- (45) Ingber, D. E. Tensegrity: the Architectural Basis of Cellular Mechanotransduction. *Annu. Rev. Physiol* **1997**, *59*, 575-599.
- (46) Schmeichel, K. L.; Weaver, V. M.; Bissell, M. J. Structural Cues From the Tissue Microenvironment Are Essential Determinants of the Human Mammary Epithelial Cell Phenotype. *J. Mammary. Gland. Biol. Neoplasia*. **1998**, *3*, 201-213.
- (47) Weaver, V. M.; Bissell, M. J. Functional Culture Models to Study Mechanisms Governing Apoptosis in Normal and Malignant Mammary Epithelial Cells. *J. Mammary. Gland. Biol. Neoplasia*. **1999**, *4*, 193-201.
- (48) Fu, H. L.; Moss, J.; Shore, I.; Slade, M. J.; Coombes, R. C. Ultrastructural Localization of Laminin and Type IV Collagen in Normal Human Breast. *Ultrastruct. Pathol.* **2002**, *26*, 77-80.
- (49) Frisch, S. M.; Ruoslahti, E. Integrins and Anoikis. *Curr. Opin. Cell Biol.* **1997**, *9*, 701-706.
- (50) Frisch, S. M.; Sreaton, R. A. Anoikis Mechanisms. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2001**, *13*, 555-562.
- (51) Boudreau, N.; Werb, Z.; Bissell, M. J. Suppression of Apoptosis by Basement Membrane Requires Three- Dimensional Tissue Organization and Withdrawal From the Cell Cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **1996**, *93*, 3509-3513.
- (52) Chen, C. S.; Mrksich, M.; Huang, S.; Whitesides, G. M.; Ingber, D. E. Geometric Control of Cell Life and Death. *Science* **1997**, *276*, 1425-1428.
- (53) Geske, F. J.; Lieberman, R.; Strange, R.; Gerschenson, L. E. Early Stages of P53-Induced Apoptosis Are Reversible. *Cell Death. Differ.* **2001**, *8*, 182-191.
- (54) Geske, F. J.; Gerschenson, L. E. The Biology of Apoptosis. *Hum. Pathol.* **2001**, *32*, 1029-1038.
- (55) Ferguson, D. J.; Anderson, T. J. Morphological Evaluation of Cell Turnover in Relation to the Menstrual Cycle in the "Resting" Human Breast. *Br. J. Cancer* **1981**, *44*, 177-181.
- (56) Vogel, P. M.; Georgiade, N. G.; Fetter, B. F.; Vogel, F. S.; McCarty, K. S., Jr. The Correlation of Histologic Changes in the Human Breast With the Menstrual Cycle. *Am. J. Pathol.* **1981**, *104*, 23-34.
- (57) Longacre, T. A.; Bartow, S. A. A Correlative Morphologic Study of Human Breast and Endometrium in the Menstrual Cycle. *Am. J. Surg. Pathol.* **1986**, *10*, 382-393.
- (58) Soderqvist, G.; Isaksson, E.; von Schoultz, B.; Carlstrom, K.; Tani, E.; Skoog, L. Proliferation of Breast Epithelial Cells in Healthy Women During the Menstrual Cycle. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **1997**, *176*, 123-128.
- (59) Ramakrishnan, R.; Khan, S. A.; Badve, S. Morphological Changes in Breast Tissue With Menstrual Cycle. *Mod. Pathol.* **2002**, *15*, 1348-1356.
- (60) Meyer, J. S. Cell Proliferation in Normal Human Breast Ducts, Fibroadenomas, and Other Ductal Hyperplasias Measured by Nuclear Labeling With Tritiated Thymidine. Effects of Menstrual Phase, Age, and Oral Contraceptive Hormones. *Hum. Pathol.* **1977**, *8*, 67-81.

- (61) Russo, J.; Calaf, G.; Roi, L.; Russo, I. H. Influence of Age and Gland Topography on Cell Kinetics of Normal Human Breast Tissue. *J. Natl. Cancer Inst.* **1987**, *78*, 413-418.
- (62) Potten, C. S.; Watson, R. J.; Williams, G. T.; Tickle, S.; Roberts, S. A.; Harris, M.; Howell, A. The Effect of Age and Menstrual Cycle Upon Proliferative Activity of the Normal Human Breast. *Br. J. Cancer* **1988**, *58*, 163-170.
- (63) Christov, K.; Chew, K. L.; Ljung, B. M.; Waldman, F. M.; Duarte, L. A.; Goodson, W. H., III; Smith, H. S.; Mayall, B. H. Proliferation of Normal Breast Epithelial Cells As Shown by in Vivo Labeling With Bromodeoxyuridine. *Am. J. Pathol.* **1991**, *138*, 1371-1377.
- (64) Simpson, H. W.; Cornelissen, G.; Katinas, G.; Halberg, F. Meta-Analysis of Sequential Luteal-Cycle-Associated Changes in Human Breast Tissue. *Breast Cancer Res. Treat.* **2000**, *63*, 171-173.
- (65) Fanger, H.; Ree, H. J. Cyclic Changes of the Human Mammary Gland Epithelium in Relation to the Menstrual Cycle - an Ultrastructural Study. *Cancer* **1974**, *34*, 574-585.
- (66) Fowler, P. A.; Casey, C. E.; Cameron, G. G.; Foster, M. A.; Knight, C. H. Cyclic Changes in Composition and Volume of the Breast During the Menstrual Cycle, Measured by Magnetic Resonance Imaging. *Br. J. Obstet. Gynaecol.* **1990**, *97*, 595-602.
- (67) Russo, J.; Hu, Y. F.; Silva, I. D.; Russo, I. H. Cancer Risk Related to Mammary Gland Structure and Development. *Microsc. Res. Tech.* **2001**, *52*, 204-223.
- (68) Russo, J.; Lynch, H.; Russo, I. H. Mammary Gland Architecture As a Determining Factor in the Susceptibility of the Human Breast to Cancer. *Breast J.* **2001**, *7*, 278-291.
- (69) Wellings, S. R. A Hypothesis of the Origin of Human Breast Cancer From the Terminal Ductal Lobular Unit. *Pathol. Res. Pract.* **1980**, *166*, 515-535.
- (70) Ferguson, J. E.; Schor, A. M.; Howell, A.; Ferguson, M. W. Changes in the Extracellular Matrix of the Normal Human Breast During the Menstrual Cycle. *Cell Tissue Res.* **1992**, *268*, 167-177.
- (71) Gompel, A.; Sabourin, J. C.; Martin, A.; Yaneva, H.; Audouin, J.; Decroix, Y.; Poitout, P. Bcl-2 Expression in Normal Endometrium During the Menstrual Cycle. *Am. J. Pathol.* **1994**, *144*, 1195-1202.
- (72) Sabourin, J. C.; Martin, A.; Baruch, J.; Truc, J. B.; Gompel, A.; Poitout, P. Bcl-2 Expression in Normal Breast Tissue During the Menstrual Cycle. *Int. J. Cancer* **1994**, *59*, 1-6.
- (73) Gompel, A.; Martin, A.; Simon, P.; Schoevaert, D.; Plu-Bureau; Hugol, D.; Audouin, J.; Leygue, E.; Truc, J. B.; Poitout, P. Epidermal Growth Factor Receptor and C-ErbB-2 Expression in Normal Breast Tissue During the Menstrual Cycle. *Breast Cancer Res. Treat.* **1996**, *38*, 227-235.
- (74) Ferrer-Roca, O.; Ribera, F.; Sanchez, L.; Estevez, M. Estradiol, Progesterone and Steroid Receptors. Benign Cycling Versus Malignant Non Cycling Cells. *Adv. Clin. Path.* **1997**, *1*, 75-84.

- (75) Ferrieres, G.; Cuny, M.; Simony-Lafontaine, J.; Jacquemier, J.; Rouleau, C.; Guilleux, F.; Grenier, J.; Rouanet, P.; Pujol, H.; Jeanteur, P.; Escot, C. Variation of Bcl-2 Expression in Breast Ducts and Lobules in Relation to Plasma Progesterone Levels: Overexpression and Absence of Variation in Fibroadenomas. *J. Pathol.* **1997**, *183*, 204-211.
- (76) Khan, S. A.; Gonchoroff, N. J.; Miller, L. E. Expression of PS2, C-ErbB-2, and Cathepsin D During the Menstrual Cycle in Human Breast Cancers. *Ann. Surg. Oncol.* **1997**, *4*, 462-469.
- (77) Cooper, L. S.; Gillett, C. E.; Smith, P.; Fentiman, I. S.; Barnes, D. M. Cell Proliferation Measured by MIB1 and Timing of Surgery for Breast Cancer. *Br. J. Cancer* **1998**, *77*, 1502-1507.
- (78) Balsari, A.; Casalini, P.; Tagliabue, E.; Greco, M.; Pilotti, S.; Agresti, R.; Giovanazzi, R.; Alasio, L.; Rumio, C.; Cascinelli, N.; Colnaghi, M. I.; Menard, S. Fluctuation of HER2 Expression in Breast Carcinomas During the Menstrual Cycle. *Am. J. Pathol.* **1999**, *155*, 1543-1547.
- (79) Karbowski, B.; Jackisch, C.; Deppe, B.; Schneider, H. P. [Relationship of Estrogen and Progesterone Receptors to the Menstrual Cycle and Menopausal Status at the Time of Breast Surgery]. *Zentralbl. Gynakol.* **1999**, *121*, 367-374.
- (80) Feuerhake, F.; Sigg, W.; Hofter, E. A.; Dimpfl, T.; Welsch, U. Immunohistochemical Analysis of Bcl-2 and Bax Expression in Relation to Cell Turnover and Epithelial Differentiation Markers in the Non-Lactating Human Mammary Gland Epithelium. *Cell Tissue Res.* **2000**, *299*, 47-58.
- (81) Khan, S. A.; Yee, K. A.; Kaplan, C.; Siddiqui, J. F. Estrogen Receptor Alpha Expression in Normal Human Breast Epithelium Is Consistent Over Time. *Int. J. Cancer* **2002**, *102*, 334-337.
- (82) Dabrosin, C. Increase of Free Insulin-Like Growth Factor-1 in Normal Human Breast in Vivo Late in the Menstrual Cycle. *Breast Cancer Res. Treat.* **2003**, *80*, 193-198.
- (83) Feuerhake, F.; Sigg, W.; Hofter, E. A.; Unterberger, P.; Welsch, U. Cell Proliferation, Apoptosis, and Expression of Bcl-2 and Bax in Non-Lactating Human Breast Epithelium in Relation to the Menstrual Cycle and Reproductive History. *Breast Cancer Res. Treat.* **2003**, *77*, 37-48.
- (84) Khan, S. A.; Rogers, M. A.; Khurana, K. K.; Meguid, M. M.; Numann, P. J. Estrogen Receptor Expression in Benign Breast Epithelium and Breast Cancer Risk. *J. Natl. Cancer Inst.* **1998**, *90*, 37-42.
- (85) Badwe, R. A.; Gregory, W. M.; Chaudary, M. A.; Richards, M. A.; Bentley, A. E.; Rubens, R. D.; Fentiman, I. S. Timing of Surgery During Menstrual Cycle and Survival of Premenopausal Women With Operable Breast Cancer. *Lancet* **1991**, *337*, 1261-1264.
- (86) Badwe, R. A.; Mitra, I.; Havaldar, R. Timing of Surgery During the Menstrual Cycle and Prognosis of Breast Cancer. *J. Biosci.* **2000**, *25*, 113-120.
- (87) Donegan, W. L.; Shah, D. Prognosis of Patients With Breast Cancer Related to the Timing of Operation. *Arch. Surg.* **1993**, *128*, 309-313.

- (88) Singhal, H.; Potter, C.; Osborne, M. P. No Effect of Timing of Biopsy in the Menstrual Cycle on Incidence of Bone Marrow Micrometastasis in Patients With Breast Cancer. *Ann. Surg. Oncol.* **1997**, *4*, 503-505.
- (89) Milella, M.; Nistico, C.; Ferraresi, V.; Vaccaro, A.; Fabi, A.; D'Ottavio, A. M.; Botti, C.; Giannarelli, D.; Lopez, M.; Cortesi, E.; Foggi, C. M.; Antimi, M.; Terzoli, E.; Cognetti, F.; Papaldo, P. Breast Cancer and Timing of Surgery During Menstrual Cycle: a 5-Year Analysis of 248 Premenopausal Women. *Breast Cancer Res. Treat.* **1999**, *55*, 259-266.
- (90) Nomura, Y.; Kataoka, A.; Tsutsui, S.; Murakami, S.; Takenaka, Y. Lack of Correlation Between Timing of Surgery in Relation to the Menstrual Cycle and Prognosis of Premenopausal Patients With Early Breast Cancer. *Eur. J. Cancer* **1999**, *35*, 1326-1330.
- (91) Blaustein, R. L. Fine-Needle Aspiration of a Metastatic Breast Carcinoma in the Lung With Melanin Pigmentation: a Case Report. *Diagn. Cytopathol.* **1990**, *6*, 364-365.
- (92) Ruffolo, E. F.; Koerner, F. C.; Maluf, H. M. Metaplastic Carcinoma of the Breast With Melanocytic Differentiation. *Mod. Pathol.* **1997**, *10*, 592-596.
- (93) *The Breast*; Churchill-Livingstone: Philadelphie, 1998; pp 1-552.
- (94) Eusebi, V.; Foschini, M. P. Rare Carcinomas of the Breast. In *The Breast*; Elston, C. W., Ellis, I. O., Eds.; Churchill-Livingstone: Philadelphie, 1998; Vol. 13, Chapter 16.
- (95) *Breast Pathology*; Lippincott-Raven Publishers: Philadelphie, 1997; pp 1-907.
- (96) Tsai, Y. C.; Lu, Y.; Nichols, P. W.; Zlotnikov, G.; Jones, P. A.; Smith, H. S. Contiguous Patches of Normal Human Mammary Epithelium Derived From a Single Stem Cell: Implications for Breast Carcinogenesis. *Cancer Res.* **1996**, *56*, 402-404.
- (97) Novelli, M.; Cossu, A.; Oukrif, D.; Quaglia, A.; Lakhani, S.; Poulosom, R.; Sasiemi, P.; Carta, P.; Contini, M.; Pasca, A.; Palmieri, G.; Bodmer, W.; Tanda, F.; Wright, N. X-Inactivation Patch Size in Human Female Tissue Confounds the Assessment of Tumor Clonality. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **2003**, *100*, 3311-3314.
- (98) Smith, C. A.; Monaghan, P.; Neville, A. M. Basal Clear Cells of the Normal Human Breast. *Virchows Arch. A Pathol. Anat. Histopathol.* **1984**, *402*, 319-329.
- (99) Ferguson, D. J. Ultrastructural Characterisation of the Proliferative (Stem?) Cells Within the Parenchyma of the Normal "Resting" Breast. *Virchows Arch. A Pathol. Anat. Histopathol.* **1985**, *407*, 379-385.
- (100) Smalley, M.; Ashworth, A. Stem Cells and Breast Cancer: A Field in Transit. *Nat. Rev. Cancer* **2003**, *3*, 832-844.
- (101) Noguchi, S.; Aihara, T.; Koyama, H.; Motomura, K.; Inaji, H.; Imaoka, S. Discrimination Between Multicentric and Multifocal Carcinomas of the Breast Through Clonal Analysis. *Cancer* **1994**, *74*, 872-877.
- (102) Sharpe, C. R. A Developmental Hypothesis to Explain the Multicentricity of Breast Cancer. *CMAJ.* **1998**, *159*, 55-59.
- (103) Cairns, J. Somatic Stem Cells and the Kinetics of Mutagenesis and Carcinogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **2002**, *99*, 10567-10570.

- (104) Frank, S. A.; Nowak, M. A. Cell Biology: Developmental Predisposition to Cancer. *Nature* **2003**, *422*, 494.
- (105) Dontu, G.; Al Hajj, M.; Abdallah, W. M.; Clarke, M. F.; Wicha, M. S. Stem Cells in Normal Breast Development and Breast Cancer. *Cell Prolif.* **2003**, *36 Suppl 1*, 59-72.
- (106) Cotsarelis, G.; Sun, T. T.; Lavker, R. M. Label-Retaining Cells Reside in the Bulge Area of Pilosebaceous Unit: Implications for Follicular Stem Cells, Hair Cycle, and Skin Carcinogenesis. *Cell* **1990**, *61*, 1329-1337.
- (107) Fuchs, E.; Raghavan, S. Getting Under the Skin of Epidermal Morphogenesis. *Nat. Rev. Genet.* **2002**, *3*, 199-209.
- (108) Jacquemier, J. D.; Hassoun, J.; Torrente, M.; Martin, P. M. Distribution of Estrogen and Progesterone Receptors in Healthy Tissue Adjacent to Breast Lesions at Various Stages--Immunohistochemical Study of 107 Cases. *Breast Cancer Res. Treat.* **1990**, *15*, 109-117.
- (109) Allan, D. J.; Howell, A.; Roberts, S. A.; Williams, G. T.; Watson, R. J.; Coyne, J. D.; Clarke, R. B.; Laidlaw, I. J.; Potten, C. S. Reduction in Apoptosis Relative to Mitosis in Histologically Normal Epithelium Accompanies Fibrocystic Change and Carcinoma of the Premenopausal Human Breast. *J. Pathol.* **1992**, *167*, 25-32.
- (110) Schor, A. M.; Rushton, G.; Ferguson, J. E.; Howell, A.; Redford, J.; Schor, S. L. Phenotypic Heterogeneity in Breast Fibroblasts: Functional Anomaly in Fibroblasts From Histologically Normal Tissue Adjacent to Carcinoma. *Int. J. Cancer* **1994**, *59*, 25-32.
- (111) Deng, G.; Lu, Y.; Zlotnikov, G.; Thor, A. D.; Smith, H. S. Loss of Heterozygosity in Normal Tissue Adjacent to Breast Carcinomas. *Science* **1996**, *274*, 2057-2059.
- (112) Hassan, H. I.; Walker, R. A. Decreased Apoptosis in Non-Involved Tissue From Cancer-Containing Breasts. *J. Pathol.* **1998**, *184*, 258-264.
- (113) Hassan, H. I.; Walker, R. A. Altered Expression of Epidermal Growth Factor Receptor in Non-Involved Tissue of Cancer-Containing Breasts. *Breast* **2001**, *10*, 318-324.
- (114) Lakhani, S. R.; Chaggar, R.; Davies, S.; Jones, C.; Collins, N.; Odel, C.; Stratton, M. R.; O'Hare, M. J. Genetic Alterations in 'Normal' Luminal and Myoepithelial Cells of the Breast. *J. Pathol.* **1999**, *189*, 496-503.
- (115) Tannenbaum, M.; Weiss, M.; Marx, A. J. Ultrastructure of the Human Mammary Ductule. *Cancer* **1969**, *23*, 958-978.
- (116) Hamperl, H. The Myothenia (Myoepithelial Cells). Normal State; Regressive Changes; Hyperplasia; Tumors. *Curr. Top. Pathol.* **1970**, *53*, 161-220.
- (117) Tobon, H.; Salazar, H. Ultrastructure of the Human Mammary Gland. I. Development of the Fetal Gland Throughout Gestation. *J. Clin. Endocrinol. Metab* **1974**, *39*, 443-456.
- (118) Salazar, H.; Tobon, H.; Josimovich, J. B. Developmental, Gestational and Postgestational Modifications of the Human Breast. *Clin. Obstet. Gynecol.* **1975**, *18*, 113-137.
- (119) Stirling, J. W.; Chandler, J. A. Ultrastructural Studies of the Female Breast: I. 9 + 0 Cilia in Myoepithelial Cells. *Anat. Rec.* **1976**, *186*, 413-416.

- (120) Stirling, J. W.; Chandler, J. A. The Fine Structure of Ducts and Subareolar Ducts in the Resting Gland of the Female Breast. *Virchows Arch. A Pathol. Anat. Histol.* **1977**, *373*, 119-132.
- (121) Ferguson, D. J.; Anderson, T. J. Ultrastructural Observations on Cell Death by Apoptosis in the "Resting" Human Breast. *Virchows Arch. A Pathol. Anat. Histol.* **1981**, *393*, 193-203.
- (122) Watson, R. J.; Eyden, B. P.; Howell, A.; Sellwood, R. A. Ultrastructural Observations on the Basal Lamina in the Normal Human Breast. *J. Anat.* **1988**, *156*, 1-10.
- (123) Barbareschi, M.; Pecciarini, L.; Cangi, M. G.; Macri, E.; Rizzo, A.; Viale, G.; Doglioni, C. P63, a P53 Homologue, Is a Selective Nuclear Marker of Myoepithelial Cells of the Human Breast. *Am. J. Surg. Pathol.* **2001**, *25*, 1054-1060.
- (124) Speirs, V.; Skliris, G. P.; Burdall, S. E.; Carder, P. J. Distinct Expression Patterns of ER Alpha and ER Beta in Normal Human Mammary Gland. *J. Clin. Pathol.* **2002**, *55*, 371-374.
- (125) Guelstein, V. I.; Tchypysheva, T. A.; Ermilova, V. D.; Litvinova, L. V.; Troyanovsky, S. M.; Bannikov, G. A. Monoclonal Antibody Mapping of Keratins 8 and 17 and of Vimentin in Normal Human Mammary Gland, Benign Tumors, Dysplasias and Breast Cancer. *Int. J. Cancer* **1988**, *42*, 147-153.
- (126) Gould, V. E.; Koukoulis, G. K.; Jansson, D. S.; Nagle, R. B.; Franke, W. W.; Moll, R. Coexpression Patterns of Vimentin and Glial Filament Protein With Cytokeratins in the Normal, Hyperplastic, and Neoplastic Breast. *Am. J. Pathol.* **1990**, *137*, 1143-1155.
- (127) Koukoulis, G. K.; Virtanen, I.; Korhonen, M.; Laitinen, L.; Quaranta, V.; Gould, V. E. Immunohistochemical Localization of Integrins in the Normal, Hyperplastic, and Neoplastic Breast. Correlations With Their Functions As Receptors and Cell Adhesion Molecules. *Am. J. Pathol.* **1991**, *139*, 787-799.
- (128) Rasbridge, S. A.; Gillett, C. E.; Sampson, S. A.; Walsh, F. S.; Millis, R. R. Epithelial (E-) and Placental (P-) Cadherin Cell Adhesion Molecule Expression in Breast Carcinoma. *J. Pathol.* **1993**, *169*, 245-250.
- (129) Ichihara, S.; Koshikawa, T.; Nakamura, S.; Yatabe, Y.; Kato, K. Epithelial Hyperplasia of Usual Type Expresses Both S100-Alpha and S100- Beta in a Heterogeneous Pattern but Ductal Carcinoma in Situ Can Express Only S100-Alpha in a Monotonous Pattern. *Histopathology* **1997**, *30*, 533-541.
- (130) Jarasch, E. D.; Nagle, R. B.; Kaufmann, M.; Maurer, C.; Bocker, W. J. Differential Diagnosis of Benign Epithelial Proliferations and Carcinomas of the Breast Using Antibodies to Cytokeratins. *Hum. Pathol.* **1988**, *19*, 276-289.
- (131) Viale, G.; Gambacorta, M.; Coggi, G.; Dell'Orto, P.; Milani, M.; Doglioni, C. Glial Fibrillary Acidic Protein Immunoreactivity in Normal and Diseased Human Breast. *Virchows Arch. A Pathol. Anat. Histopathol.* **1991**, *418*, 339-348.
- (132) Wetzels, R. H.; Kuijpers, H. J.; Lane, E. B.; Leigh, I. M.; Troyanovsky, S. M.; Holland, R.; van Haelst, U. J.; Ramaekers, F. C. Basal Cell-Specific and Hyperproliferation-Related Keratins in Human Breast Cancer. *Am. J. Pathol.* **1991**, *138*, 751-763.

- (133) Natali, P. G.; Nicotra, M. R.; Bigotti, A.; De Martino, C. Localization of the Alpha 6 and Beta 4 Integrin Subunits in Normal Human Non-Lymphoid Tissues. *J. Cell Sci.* **1992**, *103* (Pt 4), 1243-1247.
- (134) Bocker, W.; Bier, B.; Freytag, G.; Brommelkamp, B.; Jarasch, E. D.; Edel, G.; Dockhorn-Dworniczak, B.; Schmid, K. W. An Immunohistochemical Study of the Breast Using Antibodies to Basal and Luminal Keratins, Alpha-Smooth Muscle Actin, Vimentin, Collagen IV and Laminin. Part I: Normal Breast and Benign Proliferative Lesions. *Virchows Arch. A Pathol. Anat. Histopathol.* **1992**, *421*, 315-322.
- (135) Lazard, D.; Sastre, X.; Frid, M. G.; Glukhova, M. A.; Thiery, J. P.; Koteliansky, V. E. Expression of Smooth Muscle-Specific Proteins in Myoepithelium and Stromal Myofibroblasts of Normal and Malignant Human Breast Tissue. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **1993**, *90*, 999-1003.
- (136) Friedrichs, K.; Ruiz, P.; Franke, F.; Gille, I.; Terpe, H. J.; Imhof, B. A. High Expression Level of Alpha 6 Integrin in Human Breast Carcinoma Is Correlated With Reduced Survival. *Cancer Res.* **1995**, *55*, 901-906.
- (137) Glukhova, M.; Koteliansky, V.; Sastre, X.; Thiery, J. P. Adhesion Systems in Normal Breast and in Invasive Breast Carcinoma. *Am. J. Pathol.* **1995**, *146*, 706-716.
- (138) Palacios, J.; Benito, N.; Pizarro, A.; Suarez, A.; Espada, J.; Cano, A.; Gamallo, C. Anomalous Expression of P-Cadherin in Breast Carcinoma. Correlation With E-Cadherin Expression and Pathological Features. *Am. J. Pathol.* **1995**, *146*, 605-612.
- (139) Liu, Q. Y.; Niranjana, B.; Gomes, P.; Gomm, J. J.; Davies, D.; Coombes, R. C.; Buluwela, L. Inhibitory Effects of Activin on the Growth and Morphogenesis of Primary and Transformed Mammary Epithelial Cells. *Cancer Res.* **1996**, *56*, 1155-1163.
- (140) Jamieson, S.; Going, J. J.; D'Arcy, R.; George, W. D. Expression of Gap Junction Proteins Connexin 26 and Connexin 43 in Normal Human Breast and in Breast Tumours. *J. Pathol.* **1998**, *184*, 37-43.
- (141) Rudland, P. S.; Barraclough, R.; Fernig, D. G.; Smith, C. A. Growth and Differentiation of the Normal Mammary Gland and Its Tumours. *Biochem. Soc. Symp.* **1998**, *63*, 1-20.
- (142) Viacava, P.; Naccarato, A. G.; Collecchi, P.; Menard, S.; Castronovo, V.; Bevilacqua, G. The Spectrum of 67-KD Laminin Receptor Expression in Breast Carcinoma Progression. *J. Pathol.* **1997**, *182*, 36-44.
- (143) Wu, H.; Montone, K. T. Cortactin Localization in Actin-Containing Adult and Fetal Tissues. *J. Histochem. Cytochem.* **1998**, *46*, 1189-1191.
- (144) Reis-Filho, J. S.; Milanezi, F.; Schmitt, F. C. Maspin Is Expressed in the Nuclei of Breast Myoepithelial Cells. *J. Pathol.* **2002**, *197*, 272-273.
- (145) Silver, I. A. Myoepithelial Cells in the Mammary and Parotid Glands. *J. Physiol* **1954**, *125*, 8-9P.
- (146) Joshi, K.; Smith, J. A.; Perusinghe, N.; Monaghan, P. Cell Proliferation in the Human Mammary Epithelium. Differential Contribution by Epithelial and Myoepithelial Cells. *Am. J. Pathol.* **1986**, *124*, 199-206.

- (147) Linzell, J. L. Some Observations on the Contractile Tissue of the Mammary Glands. *J. Physiol* **1955**, *130*, 257-267.
- (148) Kimura, T.; Ito, Y.; Einspanier, A.; Tohya, K.; Nobunaga, T.; Tokugawa, Y.; Takemura, M.; Kubota, Y.; Ivell, R.; Matsuura, N.; Saji, F.; Murata, Y. Expression and Immunolocalization of the Oxytocin Receptor in Human Lactating and Non-Lactating Mammary Glands. *Hum. Reprod.* **1998**, *13*, 2645-2653.
- (149) Functional Histology. A Text and Colour Atlas.; Churchill Livingstone: Londres, 1987; pp 1-348.
- (150) Sapino, A.; Macri, L.; Tonda, L.; Bussolati, G. Oxytocin Enhances Myoepithelial Cell Differentiation and Proliferation in the Mouse Mammary Gland. *Endocrinology* **1993**, *133*, 838-842.
- (151) Bussolati, G.; Cassoni, P.; Ghisolfi, G.; Negro, F.; Sapino, A. Immunolocalization and Gene Expression of Oxytocin Receptors in Carcinomas and Non-Neoplastic Tissues of the Breast. *Am. J. Pathol.* **1996**, *148*, 1895-1903.
- (152) Dempsey, E. Observations on the Cytochemical Cytology of the Mammary Gland. *Am. J. Anat.* **1947**, *81*, 309-341.
- (153) Gabbiani, G.; Csank-Brassert, J.; Schneeberger, J. C.; Kapanci, Y.; Trenchev, P.; Holborow, E. J. Contractile Proteins in Human Cancer Cells. Immunofluorescent and Electron Microscopic Study. *Am. J. Pathol.* **1976**, *83*, 457-474.
- (154) Jones, C.; Foschini, M. P.; Chaggar, R.; Lu, Y. J.; Wells, D.; Shipley, J. M.; Eusebi, V.; Lakhani, S. R. Comparative Genomic Hybridization Analysis of Myoepithelial Carcinoma of the Breast. *Lab Invest* **2000**, *80*, 831-836.
- (155) Dulbecco, R.; Allen, W. R.; Bologna, M.; Bowman, M. Marker Evolution During the Development of the Rat Mammary Gland: Stem Cells Identified by Markers and the Role of Myoepithelial Cells. *Cancer Res.* **1986**, *46*, 2449-2456.
- (156) Deugnier, M. A.; Moiseyeva, E. P.; Thiery, J. P.; Glukhova, M. Myoepithelial Cell Differentiation in the Developing Mammary Gland: Progressive Acquisition of Smooth Muscle Phenotype. *Dev. Dyn.* **1995**, *204*, 107-117.
- (157) Smith, G. H.; Chepko, G. Mammary Epithelial Stem Cells. *Microsc. Res. Tech.* **2001**, *52*, 190-203.
- (158) Lakhani, S. R.; O'Hare, M. J. The Mammary Myoepithelial Cell--Cinderella or Ugly Sister? *Breast Cancer Res.* **2001**, *3*, 1-4.
- (159) Deugnier, M. A.; Teuliere, J.; Faraldo, M. M.; Thiery, J. P.; Glukhova, M. The Importance of Being a Myoepithelial Cell. *Breast Cancer Res.* **2002**, *4*, 224-230.
- (160) Gudjonsson, T.; Ronnov-Jessen, L.; Villadsen, R.; Rank, F.; Bissell, M. J.; Petersen, O. W. Normal and Tumor-Derived Myoepithelial Cells Differ in Their Ability to Interact With Luminal Breast Epithelial Cells for Polarity and Basement Membrane Deposition. *J. Cell Sci.* **2002**, *115*, 39-50.

- (161) Russo, J.; Russo, I. H. Development of the Human Mammary Gland. In *The Mammary Gland. Development, Regulation, and Function*; Neville, M. C., Daniel, C. W., Eds.; Plenum Press: New York, 1987; Chapter 3.
- (162) Laurence, D. J.; Monaghan, P.; Gusterson, B. A. The Development of the Normal Human Breast. *Oxf Rev. Reprod. Biol.* **1991**, *13*, 149-174.
- (163) Howard, B. A.; Gusterson, B. A. Human Breast Development. *J. Mammary. Gland. Biol. Neoplasia.* **2000**, *5*, 119-137.
- (164) Langman, J. *Embryologie Médicale*; Masson et Cie: Paris, 1965; pp 1-344.
- (165) Kellokumpu-Lehtinen, P.; Johansson, R. M.; Pelliniemi, L. J. Ultrastructure of Human Fetal Mammary Gland. *Anat. Rec.* **1987**, *218*, 66-72.
- (166) Dawson, E. K. A Histological Study of the Normal Mamma in Relation to Tumour Growth. *Edinburgh Medical Journal* **1934**, *41*, 653-683.
- (167) Dabelow, A. Die Milchdrüse. In *Handbuch Der Mikroskopischen Anatomie Des Menschen*; Bargmann, W., Ed.; Springer-Verlag: Berlin, 1957; Vol. 3, Chapter 3.
- (168) Anbazhagan, R.; Gusterson, B. A. Ultrastructure and Immunohistochemistry of the Embryonic Type of Fat Identified in the Human Infant Breast. *Anat. Rec.* **1995**, *241*, 129-135.
- (169) Anbazhagan, R.; Osin, P. P.; Bartkova, J.; Nathan, B.; Lane, E. B.; Gusterson, B. A. The Development of Epithelial Phenotypes in the Human Fetal and Infant Breast. *J. Pathol.* **1998**, *184*, 197-206.
- (170) Osin, P. P.; Anbazhagan, R.; Bartkova, J.; Nathan, B.; Gusterson, B. A. Breast Development Gives Insights into Breast Disease. *Histopathology* **1998**, *33*, 275-283.
- (171) Sakakura, T. New Aspects of Stroma-Parenchyma Relations in Mammary Gland Differentiation. *Int. Rev. Cytol.* **1991**, *125*, 165-202.
- (172) Jolicoeur, F.; Gaboury, L. A.; Oligny, L. L. Basal Cells of Second Trimester Fetal Breasts: Immunohistochemical Study of Myoepithelial Precursors. *Pediatr. Dev. Pathol.* **2003**, *6*, 398-413.
- (173) Anbazhagan, R.; Bartkova, J.; Stamp, G.; Pignatelli, M.; Gusterson, B.; Bartek, J. Expression of Integrin Subunits in the Human Infant Breast Correlates With Morphogenesis and Differentiation. *J. Pathol.* **1995**, *176*, 227-232.
- (174) Rudland, P. S.; Hughes, C. M. Immunocytochemical Identification of Cell Types in Human Mammary Gland: Variations in Cellular Markers Are Dependent on Glandular Topography and Differentiation. *J. Histochem. Cytochem.* **1989**, *37*, 1087-1100.
- (175) Pechoux, C.; Clezardin, P.; Dante, R.; Serre, C. M.; Clerget, M.; Bertin, N.; Lawler, J.; Delmas, P. D.; Vauzelle, J. L.; Frappart, L. Localization of Thrombospondin, CD36 and CD51 During Prenatal Development of the Human Mammary Gland. *Differentiation* **1994**, *57*, 133-141.

- (176) Naccarato, A. G.; Viacava, P.; Vignati, S.; Fanelli, G.; Bonadio, A. G.; Montruccoli, G.; Bevilacqua, G. Bio-Morphological Events in the Development of the Human Female Mammary Gland From Fetal Age to Puberty. *Virchows Arch.* **2000**, *436*, 431-438.
- (177) De Potter, C. R.; Van Daele, S.; Van de Vijver, M. J.; Pauwels, C.; Maertens, G.; De Boever, J.; Vandekerckhove, D.; Roels, H. The Expression of the Neu Oncogene Product in Breast Lesions and in Normal Fetal and Adult Human Tissues. *Histopathology* **1989**, *15*, 351-362.
- (178) Nathan, B.; Anbazhagan, R.; Clarkson, P.; Bartkova, J.; Gusterson, B. Expression of BCL-2 in the Developing Human Fetal and Infant Breast. *Histopathology* **1994**, *24*, 73-76.
- (179) Gould, V. E.; Koukoulis, G. K.; Virtanen, I. Extracellular Matrix Proteins and Their Receptors in the Normal, Hyperplastic and Neoplastic Breast. *Cell Differ. Dev.* **1990**, *32*, 409-416.
- (180) Azzopardi, J. G. Problems in Breast Pathology; Saunders: Philadelphia, 1979; pp 1-244.
- (181) Page, D. L.; Anderson, T. J. Diagnostic Histopathology of the Breast; Churchill-Livingstone: New York, 1987; pp 1-362.
- (182) Cotran, R. S.; Kumar, V.; Robbins, S. L. Robbins Pathologic Basis of Disease; W.B. Saunders Company: Philadelphia, 1994; pp 1-1400.
- (183) Silverman, J. S.; Tamsen, A. Mammary Fibroadenoma and Some Phyllodes Tumour Stroma Are Composed of CD34+ Fibroblasts and Factor XIIIa+ Dendrophages. *Histopathology* **1996**, *29*, 411-419.
- (184) Moore, T.; Lee, A. H. Expression of CD34 and Bcl-2 in Phyllodes Tumours, Fibroadenomas and Spindle Cell Lesions of the Breast. *Histopathology* **2001**, *38*, 62-67.
- (185) Kermarec, J.; Plouvier, S.; Duplay, H.; Daniel, R. [Myoepithelial Cell Breast Tumor. Ultrastructural Study]. *Arch. Anat. Pathol. (Paris)* **1973**, *21*, 225-231.
- (186) Erlandson, R. A.; Rosen, P. P. Infiltrating Myoepithelioma of the Breast. *Am. J. Surg. Pathol.* **1982**, *6*, 785-793.
- (187) Schurch, W.; Potvin, C.; Seemayer, T. A. Malignant Myoepithelioma (Myoepithelial Carcinoma) of the Breast: an Ultrastructural and Immunocytochemical Study. *Ultrastruct. Pathol.* **1985**, *8*, 1-11.
- (188) Thorner, P. S.; Kahn, H. J.; Baumal, R.; Lee, K.; Moffatt, W. Malignant Myoepithelioma of the Breast. An Immunohistochemical Study by Light and Electron Microscopy. *Cancer* **1986**, *57*, 745-750.
- (189) Bigotti, G.; Di Giorgio, C. G. Myoepithelioma of the Breast: Histologic, Immunologic, and Electromicroscopic Appearance. *J. Surg. Oncol.* **1986**, *32*, 58-64.
- (190) Ermilova, V. D.; Kondakova, T. I.; Filippova, N. A.; Gel'shtein, V. I.; Chipysheva, T. A. [Malignant Myoepithelioma of the Breast (Histological, Immunomorphological and Electron Microscopic Study)]. *Arkh. Patol.* **1988**, *50*, 53-57.

- (191) Tavassoli, F. A. Myoepithelial Lesions of the Breast. Myoepitheliosis, Adenomyoepithelioma, and Myoepithelial Carcinoma. *Am. J. Surg. Pathol.* **1991**, *15*, 554-568.
- (192) Lakhani, S. R.; O'Hare, M. J.; Monaghan, P.; Winehouse, J.; Gazet, J. C.; Sloane, J. P. Malignant Myoepithelioma (Myoepithelial Carcinoma) of the Breast: a Detailed Cytokeratin Study. *J. Clin. Pathol.* **1995**, *48*, 164-167.
- (193) Scarpellini, F.; Usellini, L.; Foschini, M. P. [Malignant Myoepithelioma Associated With in Situ and Invasive Ductal Carcinoma. Description of a Case and Review of the Literature]. *Pathologica* **1997**, *89*, 420-424.
- (194) Jolicoeur, F.; Seemayer, T. A.; Gabbiani, G.; Robidoux, A.; Gaboury, L.; Oligny, L. L.; Schurch, W. Multifocal, Nascent, and Invasive Myoepithelial Carcinoma (Malignant Myoepithelioma) of the Breast: an Immunohistochemical and Ultrastructural Study. *Int. J. Surg. Pathol.* **2002**, *10*, 281-291.
- (195) Loose, J. H.; Patchefsky, A. S.; Hollander, I. J.; Lavin, L. S.; Cooper, H. S.; Katz, S. M. Adenomyoepithelioma of the Breast. A Spectrum of Biologic Behavior. *Am. J. Surg. Pathol.* **1992**, *16*, 868-876.
- (196) Black, M. M.; Kwon, S. Precancerous Mastopathie: Structural and Biological Considerations. *Pathol. Res. Pract.* **1980**, *166*, 491-514.
- (197) Bocker, W.; Bier, B.; Freytag, G.; Brommelkamp, B.; Jarasch, E. D.; Edel, G.; Dockhorn-Dworniczak, B.; Schmid, K. W. An Immunohistochemical Study of the Breast Using Antibodies to Basal and Luminal Keratins, Alpha-Smooth Muscle Actin, Vimentin, Collagen IV and Laminin. Part II: Epitheliosis and Ductal Carcinoma in Situ. *Virchows Arch. A Pathol. Anat. Histopathol.* **1992**, *421*, 323-330.
- (198) Leinster, S. J. Impact of Molecular Biology on the Clinical Management of Breast Cancer. *Biochem. Soc. Symp.* **1998**, *63*, 185-191.
- (199) Rosen, P. P. Precancerous Breast Lesions: Epidemiological, Pathological, and Clinical Considerations. In *Breast Pathology*; Lippincott-Raven Publishers: Philadelphie, 1997; Chapter 10.
- (200) Halter, S. A.; Glick, A. D. Basement Membrane Changes in Human Breast Tissue in Explant Culture: a Morphometric and Ultrastructural Study. *Ultrastruct. Pathol.* **1983**, *4*, 23-34.
- (201) Santini, D.; Ceccarelli, C.; Taffurelli, M.; Pileri, S.; Marrano, D. Differentiation Pathways in Primary Invasive Breast Carcinoma As Suggested by Intermediate Filament and Biopathological Marker Expression. *J. Pathol.* **1996**, *179*, 386-391.
- (202) Sternlicht, M. D.; Safarians, S.; Rivera, S. P.; Barsky, S. H. Characterizations of the Extracellular Matrix and Proteinase Inhibitor Content of Human Myoepithelial Tumors. *Lab Invest* **1996**, *74*, 781-796.
- (203) Sternlicht, M. D.; Barsky, S. H. The Myoepithelial Defense: a Host Defense Against Cancer. *Med. Hypotheses* **1997**, *48*, 37-46.
- (204) Sternlicht, M. D.; Kedeshian, P.; Shao, Z. M.; Safarians, S.; Barsky, S. H. The Human Myoepithelial Cell Is a Natural Tumor Suppressor. *Clin. Cancer Res.* **1997**, *3*, 1949-1958.

- (205) Nguyen, M.; Lee, M. C.; Wang, J. L.; Tomlinson, J. S.; Shao, Z. M.; Alpaugh, M. L.; Barsky, S. H. The Human Myoepithelial Cell Displays a Multifaceted Anti-Angiogenic Phenotype. *Oncogene* **2000**, *19*, 3449-3459.
- (206) Shao, Z. M.; Radziszewski, W. J.; Barsky, S. H. Tamoxifen Enhances Myoepithelial Cell Suppression of Human Breast Carcinoma Progression in Vitro by Two Different Effector Mechanisms. *Cancer Lett.* **2000**, *157*, 133-144.
- (207) Alpaugh, M. L.; Lee, M. C.; Nguyen, M.; Deato, M.; Dishakjian, L.; Barsky, S. H. Myoepithelial-Specific CD44 Shedding Contributes to the Anti-Invasive and Antiangiogenic Phenotype of Myoepithelial Cells. *Exp. Cell Res.* **2000**, *261*, 150-158.
- (208) Batsakis, J. G.; el Naggar, A. K. Myoepithelium in Salivary and Mammary Neoplasms Is Host-Friendly. *Adv. Anat. Pathol.* **1999**, *6*, 218-226.
- (209) Sorlie, T.; Perou, C. M.; Tibshirani, R.; Aas, T.; Geisler, S.; Johnsen, H.; Hastie, T.; Eisen, M. B.; van de, R. M.; Jeffrey, S. S.; Thorsen, T.; Quist, H.; Matese, J. C.; Brown, P. O.; Botstein, D.; Eystein, L. P.; Borresen-Dale, A. L. Gene Expression Patterns of Breast Carcinomas Distinguish Tumor Subclasses With Clinical Implications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **2001**, *98*, 10869-10874.
- (210) Hamperl, H. [The So-Called Lobular Carcinoma in Situ of the Breast. Pathological Histology of the Breast. V]. *Z. Krebsforsch. Klin. Onkol. Cancer Res. Clin. Oncol.* **1972**, *77*, 231-246.
- (211) Carter, D.; Yardley, J. H.; Shelley, W. M. Lobular Carcinoma of the Breast an Ultrastructural Comparison With Certain Duct Carcinomas and Benign Lesions. *Johns. Hopkins. Med. J.* **1969**, *125*, 25-32.
- (212) Ozzello, L. Proceedings: Electron Microscopic Study of Functional and Dysfunctional Human Mammary Glands. *J. Invest Dermatol.* **1974**, *63*, 19-26.
- (213) Pollack, J. R.; Sorlie, T.; Perou, C. M.; Rees, C. A.; Jeffrey, S. S.; Lonning, P. E.; Tibshirani, R.; Botstein, D.; Borresen-Dale, A. L.; Brown, P. O. Microarray Analysis Reveals a Major Direct Role of DNA Copy Number Alteration in the Transcriptional Program of Human Breast Tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **2002**, *99*, 12963-12968.
- (214) Chung, C. H.; Bernard, P. S.; Perou, C. M. Molecular Portraits and the Family Tree of Cancer. *Nat. Genet.* **2002**, *32 Suppl*, 533-540.
- (215) Sorlie, T.; Tibshirani, R.; Parker, J.; Hastie, T.; Marron, J. S.; Nobel, A.; Deng, S.; Johnsen, H.; Pesich, R.; Geisler, S.; Demeter, J.; Perou, C. M.; Lonning, P. E.; Brown, P. O.; Borresen-Dale, A. L.; Botstein, D. Repeated Observation of Breast Tumor Subtypes in Independent Gene Expression Data Sets. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **2003**, *100*, 8418-8423.
- (216) Gordon, L. A.; Mulligan, K. T.; Maxwell-Jones, H.; Adams, M.; Walker, R. A.; Jones, J. L. Breast Cell Invasive Potential Relates to the Myoepithelial Phenotype. *Int. J. Cancer* **2003**, *106*, 8-16.
- (217) Reis-Filho, J. S.; Milanezi, F.; Paredes, J.; Silva, P.; Pereira, E. M.; Maeda, S. A.; de Carvalho, L. V.; Schmitt, F. C. Novel and Classic Myoepithelial/Stem Cell Markers in Metaplastic Carcinomas of the Breast. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.* **2003**, *11*, 1-8.

- (218) Damjanovich, L.; Fulop, B.; Adany, R.; Nemes, Z. Integrin Expression on Normal and Neoplastic Human Breast Epithelium. *Acta Chir Hung.* **1997**, *36*, 69-71.
- (219) Bloom, H. J. G.; Richardson, W. W. Histologic Grading and Prognosis in Breast Cancer: a Study of 1709 Cases of Which 359 Have Been Followed for 15 Years. *Br. J. Cancer* **1957**, *2*, 353-377.
- (220) Elston, C. W.; Ellis, I. O. Pathological Prognostic Factors in Breast Cancer. I. The Value of Histological Grade in Breast Cancer: Experience From a Large Study With Long-Term Follow-Up. *Histopathology* **1991**, *19*, 403-410.
- (221) Biggs, R. The Myoepithelium in Certain Tumors of the Breast. *J. Path. Bact.* **1947**, *LIX*, 437-444.
- (222) Martin de las, M. J.; Espinosa de los, M. A.; Bautista, M. J.; Gomez-Villamandos, J. C.; Morales, C. Immunohistochemical Distribution Pattern of Intermediate Filament Proteins and Muscle Actin in Feline and Human Mammary Carcinomas. *J. Comp Pathol.* **1994**, *111*, 365-381.
- (223) Nagato, T.; Yoshida, H.; Yoshida, A.; Uehara, Y. A Scanning Electron Microscope Study of Myoepithelial Cells in Exocrine Glands. *Cell Tissue Res.* **1980**, *209*, 1-10.
- (224) Srigley, J. R.; Dardick, I.; Hartwick, R. W.; Klotz, L. Basal Epithelial Cells of Human Prostate Gland Are Not Myoepithelial Cells. A Comparative Immunohistochemical and Ultrastructural Study With the Human Salivary Gland. *Am. J. Pathol.* **1990**, *136*, 957-966.
- (225) Hayward, S. W.; Brody, J. R.; Cunha, G. R. An Edgewise Look at Basal Epithelial Cells: Three-Dimensional Views of the Rat Prostate, Mammary Gland and Salivary Gland. *Differentiation* **1996**, *60*, 219-227.
- (226) Foschini, M. P.; Scarpellini, F.; Gown, A. M.; Eusebi, V. Differential Expression of Myoepithelial Markers in Salivary, Sweat and Mammary Glands. *Int. J. Surg. Pathol.* **2000**, *8*, 29-37.
- (227) Hewlett, B. R. Comparison of TISSUFIX(TM) and Neutral Buffered Formaldehyde (NBF). 1-20. 2003. Unpublished Work
- (228) Diagnostic Immunohistochemistry; Churchill-Livingstone: Philadelphie, 2002; pp 1-673.
- (229) Taylor, C. R. The Total Test Approach to Standardization of Immunohistochemistry. *Arch. Pathol. Lab Med.* **2000**, *124*, 945-951.
- (230) O'Leary, T. J. Standardization in Immunohistochemistry. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.* **2001**, *9*, 3-8.
- (231) Clezardin, P.; Frappart, L.; Clerget, M.; Pechoux, C.; Delmas, P. D. Expression of Thrombospondin (TSP1) and Its Receptors (CD36 and CD51) in Normal, Hyperplastic, and Neoplastic Human Breast. *Cancer Res.* **1993**, *53*, 1421-1430.
- (232) Thomsen, L. L.; Miles, D. W.; Happerfield, L.; Bobrow, L. G.; Knowles, R. G.; Moncada, S. Nitric Oxide Synthase Activity in Human Breast Cancer. *Br. J. Cancer* **1995**, *72*, 41-44.

- (233) Martignone, S.; Menard, S.; Bufalino, R.; Cascinelli, N.; Pellegrini, R.; Tagliabue, E.; Andreola, S.; Rilke, F.; Colnaghi, M. I. Prognostic Significance of the 67-Kilodalton Laminin Receptor Expression in Human Breast Carcinomas. *J. Natl. Cancer Inst.* **1993**, *85*, 398-402.
- (234) Menard, S.; Tagliabue, E.; Colnaghi, M. I. The 67 KDa Laminin Receptor As a Prognostic Factor in Human Cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* **1998**, *52*, 137-145.
- (235) Mercurio, A. M.; Bachelder, R. E.; Chung, J.; O'Connor, K. L.; Rabinovitz, I.; Shaw, L. M.; Tani, T. Integrin Laminin Receptors and Breast Carcinoma Progression. *J. Mammary. Gland. Biol. Neoplasia.* **2001**, *6*, 299-309.
- (236) Tagliabue, E.; Ghirelli, C.; Squicciarini, P.; Aiello, P.; Colnaghi, M. I.; Menard, S. Prognostic Value of Alpha 6 Beta 4 Integrin Expression in Breast Carcinomas Is Affected by Laminin Production From Tumor Cells. *Clin. Cancer Res.* **1998**, *4*, 407-410.
- (237) Zutter, M. M.; Mazoujian, G.; Santoro, S. A. Decreased Expression of Integrin Adhesive Protein Receptors in Adenocarcinoma of the Breast. *Am. J. Pathol.* **1990**, *137*, 863-870.
- (238) Gusterson, B. A.; Monaghan, P.; Mahendran, R.; Ellis, J.; O'Hare, M. J. Identification of Myoepithelial Cells in Human and Rat Breasts by Anti- Common Acute Lymphoblastic Leukemia Antigen Antibody A12. *J. Natl. Cancer Inst.* **1986**, *77*, 343-349.
- (239) Ponta, H.; Sleeman, J.; Dall, P.; Moll, J.; Sherman, L.; Herrlich, P. CD44 Isoforms in Metastatic Cancer. *Invasion Metastasis* **1994**, *14*, 82-86.
- (240) Dall, P.; Heider, K. H.; Sinn, H. P.; Skroch-Angel, P.; Adolf, G.; Kaufmann, M.; Herrlich, P.; Ponta, H. Comparison of Immunohistochemistry and RT-PCR for Detection of CD44v-Expression, a New Prognostic Factor in Human Breast Cancer. *Int. J. Cancer* **1995**, *60*, 471-477.
- (241) Kaufmann, M.; Heider, K. H.; Sinn, H. P.; von Minckwitz, G.; Ponta, H.; Herrlich, P. CD44 Isoforms in Prognosis of Breast Cancer. *Lancet* **1995**, *346*, 502.
- (242) Malzahn, K.; Mitze, M.; Thoenes, M.; Moll, R. Biological and Prognostic Significance of Stratified Epithelial Cytokeratins in Infiltrating Ductal Breast Carcinomas. *Virchows Arch.* **1998**, *433*, 119-129.
- (243) Tsuda, H.; Takarabe, T.; Hasegawa, F.; Fukutomi, T.; Hirohashi, S. Large, Central Acellular Zones Indicating Myoepithelial Tumor Differentiation in High-Grade Invasive Ductal Carcinomas As Markers of Predisposition to Lung and Brain Metastases. *Am. J. Surg. Pathol.* **2000**, *24*, 197-202.
- (244) Lackie, J. M.; Dow, J. A. T. *The Dictionary of Cell & Molecular Biology*; Academic Press: Londres, 1999; pp 1-498.
- (245) O'Guin, W. M.; Schermer, A.; Lynch, M.; Sun, T. T. Differentiation-Specific Expression of Keratin Pairs. In *Cellular and Molecular Biology of Intermediate Filaments*; Goldman, R. D., Steinert, P. M., Eds.; Plenum Press: New York, 1990; Chapter 11.
- (246) Sommers, C. L.; Walker-Jones, D.; Heckford, S. E.; Worland, P.; Valverius, E.; Clark, R.; McCormick, F.; Stampfer, M.; Abularach, S.; Gelmann, E. P. Vimentin Rather Than Keratin Expression in Some Hormone-Independent Breast Cancer Cell Lines and in Oncogene-Transformed Mammary Epithelial Cells. *Cancer Res.* **1989**, *49*, 4258-4263.

- (247) Heatley, M.; Whiteside, C.; Maxwell, P.; Toner, P. Vimentin Expression in Benign and Malignant Breast Epithelium. *J. Clin. Pathol.* **1993**, *46*, 441-445.
- (248) Tsuda, H.; Takarabe, T.; Hasegawa, T.; Murata, T.; Hirohashi, S. Myoepithelial Differentiation in High-Grade Invasive Ductal Carcinomas With Large Central Acellular Zones. *Hum. Pathol.* **1999**, *30*, 1134-1139.
- (249) Ilg, E. C.; Schafer, B. W.; Heizmann, C. W. Expression Pattern of S100 Calcium-Binding Proteins in Human Tumors. *Int. J. Cancer* **1996**, *68*, 325-332.
- (250) Grigorian, M.; Ambartsumian, N.; Lykkesfeldt, A. E.; Bastholm, L.; Elling, F.; Georgiev, G.; Lukanidin, E. Effect of Mts1 (S100A4) Expression on the Progression of Human Breast Cancer Cells. *Int. J. Cancer* **1996**, *67*, 831-841.
- (251) Ribeiro-Silva, A.; Ramalho, L. N.; Garcia, S. B.; Zucoloto, S. Does the Correlation Between EBNA-1 and P63 Expression in Breast Carcinomas Provide a Clue to Tumorigenesis in Epstein-Barr Virus-Related Breast Malignancies? *Braz. J. Med. Biol. Res.* **2004**, *37*, 89-95.
- (252) Stefanou, D.; Batistatou, A.; Nonni, A.; Arkoumani, E.; Agnantis, N. J. P63 Expression in Benign and Malignant Breast Lesions. *Histol. Histopathol.* **2004**, *19*, 465-471.
- (253) Olapade-Olaopa, E. O.; MacKay, E. H.; Habib, F. K. Variability of Immunohistochemical Reactivity on Stored Paraffin Slides. *J. Clin. Pathol.* **1998**, *51*, 943.
- (254) Olapade-Olaopa, E. O.; Ogunbiyi, J. O.; MacKay, E. H.; Muronda, C. A.; Alonge, T. O.; Danso, A. P.; Moscatello, D. K.; Sandhu, D. P.; Shittu, O. B.; Terry, T. R.; Wong, A. J.; Habib, F. K. Further Characterization of Storage-Related Alterations in Immunoreactivity of Archival Tissue Sections and Its Implications for Collaborative Multicenter Immunohistochemical Studies. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.* **2001**, *9*, 261-266.
- (255) Natali, P. G.; Cavaliere, R.; Bigotti, A.; Nicotra, M. R.; Russo, C.; Ng, A. K.; Giacomini, P.; Ferrone, S. Antigenic Heterogeneity of Surgically Removed Primary and Autologous Metastatic Human Melanoma Lesions. *J. Immunol.* **1983**, *130*, 1462-1466.
- (256) Waha, A.; Sturne, C.; Kessler, A.; Koch, A.; Kreyer, E.; Fimmers, R.; Wiestler, O. D.; von Deimling, A.; Krebs, D.; Schmutzler, R. K. Expression of the ATM Gene Is Significantly Reduced in Sporadic Breast Carcinomas. *Int. J. Cancer* **1998**, *78*, 306-309.
- (257) Fellowes, V. S.; Husebekk, A.; Gress, R. E.; Vance, B. A. Minimal Residual Disease Detection in Breast Cancer: Improved Sensitivity Using Cytokeratin 19 and Epidermal Growth Factor Receptor RT-PCR. *Int. J. Oncol.* **2004**, *24*, 861-867.
- (258) Weiss, M. A.; Michael, J. G.; Pesce, A. J.; DiPersio, L. Heterogeneity of Beta 2-Microglobulin in Human Breast Carcinoma. *Lab Invest* **1981**, *45*, 46-57.
- (259) Sidky, K.; Walker, R. A. Beta 2-Microglobulin in Non-Malignant and Malignant Human Breast: a Feature of Differentiation. *J. Pathol.* **1984**, *142*, 135-140.
- (260) Governa, M.; Biguzzi, S. Beta2-Microglobulin Distribution in Human Normal Tissues. *Eur. J. Immunol.* **1976**, *6*, 830-832.

- (261) Benitez, R.; Godelaine, D.; Lopez-Nevot, M. A.; Brasseur, F.; Jimenez, P.; Marchand, M.; Oliva, M. R.; van Baren, N.; Cabrera, T.; Andry, G.; Landry, C.; Ruiz-Cabello, F.; Boon, T.; Garrido, F. Mutations of the Beta2-Microglobulin Gene Result in a Lack of HLA Class I Molecules on Melanoma Cells of Two Patients Immunized With MAGE Peptides. *Tissue Antigens* **1998**, *52*, 520-529.
- (262) Dubuis, J. M.; Deal, C. L.; Drews, R. T.; Goodyer, C. G.; Lagace, G.; Asa, S. L.; Van Vliet, G.; Collu, R. Mammosomatotroph Adenoma Causing Gigantism in an 8-Year Old Boy: a Possible Pathogenetic Mechanism. *Clin. Endocrinol. (Oxf)* **1995**, *42*, 539-549.
- (263) Kamalati, T.; Niranjana, B.; Atherton, A.; Anbazhagan, R.; Gusterson, B. Differentiation Antigens in Stromal and Epithelial Cells of the Breast. *Cancer Treat. Res.* **1996**, *83*, 227-242.
- (264) Metzgar, R. S.; Borowitz, M. J.; Jones, N. H.; Dowell, B. L. Distribution of Common Acute Lymphoblastic Leukemia Antigen in Nonhematopoietic Tissues. *J. Exp. Med.* **1981**, *154*, 1249-1254.
- (265) Mahendran, R.; McIlhinney, R.; O'Hare, M.; Monaghan, P.; Gusterson, B. Expression of the Common Acute Lymphoblastic Leukaemia Antigen (CALLA) in the Human Breast. *Mol. Cell Probes* **1989**, *3*, 39-44.
- (266) Stasiak, P. C.; Purkis, P. E.; Leigh, I. M.; Lane, E. B. Keratin 19: Predicted Amino Acid Sequence and Broad Tissue Distribution Suggest It Evolved From Keratinocyte Keratins. *J. Invest Dermatol.* **1989**, *92*, 707-716.
- (267) Purkis, P. E.; Steel, J. B.; Mackenzie, I. C.; Nathrath, W. B.; Leigh, I. M.; Lane, E. B. Antibody Markers of Basal Cells in Complex Epithelia. *J. Cell Sci.* **1990**, *97 (Pt 1)*, 39-50.
- (268) Haimoto, H.; Hosoda, S.; Kato, K. Differential Distribution of Immunoreactive S100-Alpha and S100-Beta Proteins in Normal Nonnervous Human Tissues. *Lab Invest* **1987**, *57*, 489-498.
- (269) Funahashi, H.; Koshikawa, T.; Ichihara, S.; Ohike, E.; Katoh, K. Different Distributions of Immunoreactive S100-Alpha and S100-Beta Protein Expression in Human Breast Cancer. *J. Surg. Oncol.* **1998**, *68*, 25-29.
- (270) Mitchell, D.; Ibrahim, S.; Gusterson, B. A. Improved Immunohistochemical Localization of Tissue Antigens Using Modified Methacarn Fixation. *J. Histochem. Cytochem.* **1985**, *33*, 491-495.
- (271) Hopwood, D. Fixatives and Fixation: a Review. *Histochem. J.* **1969**, *1*, 323-360.
- (272) Dulbecco, R.; Henahan, M.; Armstrong, B. Cell Types and Morphogenesis in the Mammary Gland. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **1982**, *79*, 7346-7350.
- (273) Williams, J. M.; Daniel, C. W. Mammary Ductal Elongation: Differentiation of Myoepithelium and Basal Lamina During Branching Morphogenesis. *Dev. Biol.* **1983**, *97*, 274-290.
- (274) Wicha, M. S.; Liotta, L. A.; Garbisa, S.; Kidwell, W. R. Basement Membrane Collagen Requirements for Attachment and Growth of Mammary Epithelium. *Exp. Cell Res.* **1979**, *124*, 181-190.

- (275) Ormerod, E. J.; Warburton, M. J.; Hughes, C.; Rudland, P. S. Synthesis of Basement Membrane Proteins by Rat Mammary Epithelial Cells. *Dev. Biol.* **1983**, *96*, 269-275.
- (276) Stirling, J. W.; Chandler, J. A. The Fine Structure of the Normal, Resting Terminal Ductal-Lobular Unit of the Female Breast. *Virchows Arch. A Pathol. Anat. Histol.* **1976**, *372*, 205-226.
- (277) Cellular and Molecular Biology of Intermediate Filaments; Plenum Press: New York, 1990.
- (278) Srinivasan, K.; Strickland, P.; Valdes, A.; Shin, G. C.; Hinck, L. Netrin-1/Neogenin Interaction Stabilizes Multipotent Progenitor Cap Cells During Mammary Gland Morphogenesis. *Dev. Cell* **2003**, *4*, 371-382.
- (279) Sapino, A.; Macri, L.; Gugliotta, P.; Pacchioni, D.; Liu, Y. J.; Medina, D.; Bussolati, G. Immunophenotypic Properties and Estrogen Dependency of Budding Cell Structures in the Developing Mouse Mammary Gland. *Differentiation* **1993**, *55*, 13-18.
- (280) Ormerod, E. J.; Rudland, P. S. Cellular Composition and Organization of Ductal Buds in Developing Rat Mammary Glands: Evidence for Morphological Intermediates Between Epithelial and Myoepithelial Cells. *Am. J. Anat.* **1984**, *170*, 631-652.
- (281) Klinowska, T. C.; Soriano, J. V.; Edwards, G. M.; Oliver, J. M.; Valentijn, A. J.; Montesano, R.; Streuli, C. H. Laminin and Beta1 Integrins Are Crucial for Normal Mammary Gland Development in the Mouse. *Dev. Biol.* **1999**, *215*, 13-32.
- (282) Zhang, R. R.; Man, Y. G.; Vang, R.; Saenger, J. S.; Barner, R.; Wheeler, D. T.; Liang, C. Y.; Vinh, T. N.; Bratthauer, G. L. A Subset of Morphologically Distinct Mammary Myoepithelial Cells Lacks Corresponding Immunophenotypic Markers. *Breast Cancer Res.* **2003**, *5*, R151-R156.
- (283) Durnberger, H.; Kratochwil, K. Specificity of Tissue Interaction and Origin of Mesenchymal Cells in the Androgen Response of the Embryonic Mammary Gland. *Cell* **1980**, *19*, 465-471.
- (284) Anbazhagan, R.; Bartek, J.; Monaghan, P.; Gusterson, B. A. Growth and Development of the Human Infant Breast. *Am. J. Anat.* **1991**, *192*, 407-417.
- (285) Going, J. J.; Anderson, T. J.; Battersby, S.; MacIntyre, C. C. Proliferative and Secretory Activity in Human Breast During Natural and Artificial Menstrual Cycles. *Am. J. Pathol.* **1988**, *130*, 193-204.
- (286) Kim, R. D.; Darling, C. E.; Cerwenka, H.; Chari, R. S. Hypoosmotic Stress Activates P38, ERK 1 and 2, and SAPK/JNK in Rat Hepatocytes. *J. Surg. Res.* **2000**, *90*, 58-66.
- (287) Kim, R. D.; Stein, G. S.; Chari, R. S. Impact of Cell Swelling on Proliferative Signal Transduction in the Liver. *J. Cell Biochem.* **2001**, *83*, 56-69.
- (288) Kim, R. D.; Roth, T. P.; Darling, C. E.; Ricciardi, R.; Schaffer, B. K.; Chari, R. S. Hypoosmotic Stress Stimulates Growth in HepG2 Cells Via Protein Kinase B-Dependent Activation of Activator Protein-1. *J. Gastrointest. Surg.* **2001**, *5*, 546-555.

- (289) Mills, A. A.; Zheng, B.; Wang, X. J.; Vogel, H.; Roop, D. R.; Bradley, A. P63 Is a P53 Homologue Required for Limb and Epidermal Morphogenesis. *Nature* **1999**, *398*, 708-713.
- (290) Yang, A.; Schweitzer, R.; Sun, D.; Kaghad, M.; Walker, N.; Bronson, R. T.; Tabin, C.; Sharpe, A.; Caput, D.; Crum, C.; McKeon, F. P63 Is Essential for Regenerative Proliferation in Limb, Craniofacial and Epithelial Development. *Nature* **1999**, *398*, 714-718.
- (291) Koster, M. I.; Kim, S.; Mills, A. A.; DeMayo, F. J.; Roop, D. R. P63 Is the Molecular Switch for Initiation of an Epithelial Stratification Program. *Genes Dev.* **2004**, *18*, 126-131.
- (292) Bocker, W.; Moll, R.; Poremba, C.; Holland, R.; Van Diest, P. J.; Dervan, P.; Burger, H.; Wai, D.; Ina, D. R.; Brandt, B.; Herbst, H.; Schmidt, A.; Lerch, M. M.; Buchwallow, I. B. Common Adult Stem Cells in the Human Breast Give Rise to Glandular and Myoepithelial Cell Lineages: a New Cell Biological Concept. *Lab Invest* **2002**, *82*, 737-746.
- (293) Clarke, R. B.; Anderson, E.; Howell, A.; Potten, C. S. Regulation of Human Breast Epithelial Stem Cells. *Cell Prolif.* **2003**, *36 Suppl 1*, 45-58.
- (294) Sorenson, S. C.; Asch, B. B.; Connolly, J. L.; Burstein, N. A.; Asch, H. L. Structural Distinctions Among Human Breast Epithelial Cells Revealed by the Monoclonal Antikeratin Antibodies AE1 and AE3. *J. Pathol.* **1987**, *153*, 151-162.
- (295) Walker, R. A. Breast Myoepithelium--the Ignored Cell. *J. Pathol.* **1988**, *156*, 5-6.
- (296) Batistatou, A.; Stefanou, D.; Arkoumani, E.; Agnantis, N. J. The Usefulness of P63 As a Marker of Breast Myoepithelial Cells. *In Vivo* **2003**, *17*, 573-576.
- (297) Martignone, S.; Pellegrini, R.; Villa, E.; Tandon, N. N.; Mastroianni, A.; Tagliabue, E.; Menard, S.; Colnaghi, M. I. Characterization of Two Monoclonal Antibodies Directed Against the 67 KDa High Affinity Laminin Receptor and Application for the Study of Breast Carcinoma Progression. *Clin. Exp. Metastasis* **1992**, *10*, 379-386.
- (298) Atherton, A. J.; Anbazhagan, R.; Monaghan, P.; Bartek, J.; Gusterson, B. A. Immunolocalisation of Cell Surface Peptidases in the Developing Human Breast. *Differentiation* **1994**, *56*, 101-106.
- (299) Fox, S. B.; Gatter, K. C.; Jackson, D. G.; Screaton, G. R.; Bell, M. V.; Bell, J. I.; Harris, A. L.; Simmons, D.; Fawcett, J. CD44 and Cancer Screening. *Lancet* **1993**, *342*, 548-549.
- (300) Friedrichs, K.; Franke, F.; Lisboa, B. W.; Kugler, G.; Gille, I.; Terpe, H. J.; Holzel, F.; Maass, H.; Gunthert, U. CD44 Isoforms Correlate With Cellular Differentiation but Not With Prognosis in Human Breast Cancer. *Cancer Res.* **1995**, *55*, 5424-5433.
- (301) Tsubura, A.; Okada, H.; Senzaki, H.; Hatano, T.; Morii, S. Keratin Expression in the Normal Breast and in Breast Carcinoma. *Histopathology* **1991**, *18*, 517-522.
- (302) Guelstein, V. I.; Tchypysheva, T. A.; Ermilova, V. D.; Ljubimov, A. V. Myoepithelial and Basement Membrane Antigens in Benign and Malignant Human Breast Tumors. *Int. J. Cancer* **1993**, *53*, 269-277.

- (303) Wang, N. P.; Wan, B. C.; Skelly, M.; Frid, M.; Glukhova, M. A.; Koteliansky, V. E. Antibodies to Novel Myoepithelium-Associated Proteins Distinguish Benign Lesions and Carcinoma in Situ From Invasive Carcinoma of the Breast. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.* **1997**, *5*, 141-151.
- (304) Di Como, C. J.; Urist, M. J.; Babayan, I.; Drobnjak, M.; Hedvat, C. V.; Teruya-Feldstein, J.; Pohar, K.; Hoos, A.; Cordon-Cardo, C. P63 Expression Profiles in Human Normal and Tumor Tissues. *Clin. Cancer Res.* **2002**, *8*, 494-501.
- (305) Troyanovsky, S. M.; Guelstein, V. I.; Tchipsysheva, T. A.; Krutovskikh, V. A.; Bannikov, G. A. Patterns of Expression of Keratin 17 in Human Epithelia: Dependency on Cell Position. *J. Cell Sci.* **1989**, *93 (Pt 3)*, 419-426.
- (306) Gown, A. M.; Boyd, H. C.; Chang, Y.; Ferguson, M.; Reichler, B.; Tippens, D. Smooth Muscle Cells Can Express Cytokeratins of "Simple" Epithelium. Immunocytochemical and Biochemical Studies in Vitro and in Vivo. *Am. J. Pathol.* **1988**, *132*, 223-232.
- (307) Coulombe, P. A.; Kopan, R.; Fuchs, E. Expression of Keratin K14 in the Epidermis and Hair Follicle: Insights into Complex Programs of Differentiation. *J. Cell Biol.* **1989**, *109*, 2295-2312.
- (308) Kopan, R.; Fuchs, E. A New Look into an Old Problem: Keratins As Tools to Investigate Determination, Morphogenesis, and Differentiation in Skin. *Genes Dev.* **1989**, *3*, 1-15.
- (309) Chen, P. C.; Chen, C. K.; Nicastrì, A. D.; Wait, R. B. Myoepithelial Carcinoma of the Breast With Distant Metastasis and Accompanied by Adenomyoepitheliomas. *Histopathology* **1994**, *24*, 543-548.
- (310) Maiorano, E.; Ricco, R.; Virgintino, D.; Lastilla, G. Infiltrating Myoepithelioma of the Breast. *Appl. Immunohistochem.* **1994**, *2*, 130-136.
- (311) Van Dorpe, J.; De Weer, F.; Bekaert, J.; Lauweryns, J.; Moerman, P. Malignant Myoepithelioma of the Breast. Case Report With Immunohistochemical Study. *Arch. Anat. Cytol. Pathol.* **1996**, *44*, 193-198.
- (312) Pearse, A. G. E. In *Histochemistry, Theoretical and Applied*; Churchill Livingstone: Edinburgh, 1968; Chapter 15.
- (313) Diallo, R.; Schaefer, K. L.; Poremba, C.; Shivazi, N.; Willmann, V.; Buerger, H.; Dockhorn-Dworniczak, B.; Boecker, W. Monoclonality in Normal Epithelium and in Hyperplastic and Neoplastic Lesions of the Breast. *J. Pathol.* **2001**, *193*, 27-32.
- (314) Gouon-Evans, V.; Rothenberg, M. E.; Pollard, J. W. Postnatal Mammary Gland Development Requires Macrophages and Eosinophils. *Development* **2000**, *127*, 2269-2282.
- (315) Gouon-Evans, V.; Lin, E. Y.; Pollard, J. W. Requirement of Macrophages and Eosinophils and Their Cytokines/Chemokines for Mammary Gland Development. *Breast Cancer Res.* **2002**, *4*, 155-164.
- (316) Lin, E. Y.; Gouon-Evans, V.; Nguyen, A. V.; Pollard, J. W. The Macrophage Growth Factor CSF-1 in Mammary Gland Development and Tumor Progression. *J. Mammary Gland. Biol. Neoplasia.* **2002**, *7*, 147-162.

- (317) Sferruzzi-Perri, A. N.; Robertson, S. A.; Dent, L. A. Interleukin-5 Transgene Expression and Eosinophilia Are Associated With Retarded Mammary Gland Development in Mice. *Biol. Reprod.* **2003**, *69*, 224-233.
- (318) Samoszuk, M. Eosinophils and Human Cancer. *Histol. Histopathol.* **1997**, *12*, 807-812.
- (319) Ali, S.; Kaur, J.; Patel, K. D. Intercellular Cell Adhesion Molecule-1, Vascular Cell Adhesion Molecule-1, and Regulated on Activation Normal T Cell Expressed and Secreted Are Expressed by Human Breast Carcinoma Cells and Support Eosinophil Adhesion and Activation. *Am. J. Pathol.* **2000**, *157*, 313-321.
- (320) Ahmed, A. The Myoepithelium in Human Breast Fibroadenoma. *J. Pathol.* **1974**, *114*, 135-138.
- (321) Ahmed, A. The Myoepithelium in Cystic Hyperplastic Mastopathy. *J. Pathol.* **1974**, *113*, 209-215.
- (322) Ahmed, A. The Myoepithelium in Human Breast Carcinoma. *J. Pathol.* **1974**, *113*, 129-135.
- (323) Gould, V. E.; Jao, W.; Battifora, H. Ultrastructural Analysis in the Differential Diagnosis of Breast Tumors. The Significance of Myoepithelial Cells, Basal Lamina, Intracytoplasmic Lumina and Secretory Granules. *Pathol. Res. Pract.* **1980**, *167*, 45-70.
- (324) Bussolati, G.; Botta, G.; Gugliotta, P. Actin-Rich (Myoepithelial) Cells in Ductal Carcinoma-in-Situ of the Breast. *Virchows Arch. B Cell Pathol. Incl. Mol. Pathol.* **1980**, *34*, 251-259.
- (325) Bussolati, G. Actin-Rich (Myoepithelial) Cells in Lobular Carcinoma in Situ of the Breast. *Virchows Arch. B Cell Pathol. Incl. Mol. Pathol.* **1980**, *32*, 165-176.
- (326) Gusterson, B. A.; Warburton, M. J.; Mitchell, D.; Ellison, M.; Neville, A. M.; Rudland, P. S. Distribution of Myoepithelial Cells and Basement Membrane Proteins in the Normal Breast and in Benign and Malignant Breast Diseases. *Cancer Res.* **1982**, *42*, 4763-4770.
- (327) Egan, M. J.; Newman, J.; Crocker, J.; Collard, M. Immunohistochemical Localization of S100 Protein in Benign and Malignant Conditions of the Breast. *Arch. Pathol. Lab Med.* **1987**, *111*, 28-31.
- (328) Nagle, R. B.; Bocker, W.; Davis, J. R.; Heid, H. W.; Kaufmann, M.; Lucas, D. O.; Jarasch, E. D. Characterization of Breast Carcinomas by Two Monoclonal Antibodies Distinguishing Myoepithelial From Luminal Epithelial Cells. *J. Histochem. Cytochem.* **1986**, *34*, 869-881.
- (329) Lazarides, E. Intermediate Filaments As Mechanical Integrators of Cellular Space. *Nature* **1980**, *283*, 249-256.
- (330) Gabbiani, G.; Kapanci, Y.; Barazzone, P.; Franke, W. W. Immunochemical Identification of Intermediate-Sized Filaments in Human Neoplastic Cells. A Diagnostic Aid for the Surgical Pathologist. *Am. J. Pathol.* **1981**, *104*, 206-216.
- (331) Moll, R.; Franke, W. W.; Schiller, D. L.; Geiger, B.; Krepler, R. The Catalog of Human Cytokeratins: Patterns of Expression in Normal Epithelia, Tumors and Cultured Cells. *Cell* **1982**, *31*, 11-24.

- (332) Osborn, M. Intermediate Filaments As Histologic Markers: an Overview. *J. Invest Dermatol.* **1983**, *81*, 104s-109s.
- (333) Miettinen, M.; Lehto, V. P.; Virtanen, I. Antibodies to Intermediate Filament Proteins in the Diagnosis and Classification of Human Tumors. *Ultrastruct. Pathol.* **1984**, *7*, 83-107.
- (334) Gould, V. E. Histogenesis and Differentiation: a Re-Evaluation of These Concepts As Criteria for the Classification of Tumors. *Hum. Pathol.* **1986**, *17*, 212-215.
- (335) Haigh, T.; Chen, C.; Jones, C. J.; Aplin, J. D. Studies of Mesenchymal Cells From 1st Trimester Human Placenta: Expression of Cytokeratin Outside the Trophoblast Lineage. *Placenta* **1999**, *20*, 615-625.
- (336) Bar, H.; Bea, F.; Blessing, E.; Watson, L.; Wende, P.; Kreuzer, J.; Kubler, W.; Jahn, L. Phosphorylation of Cytokeratin 8 and 18 in Human Vascular Smooth Muscle Cells of Atherosclerotic Lesions and Umbilical Cord Vessels. *Basic Res. Cardiol.* **2001**, *96*, 50-58.
- (337) Dwarakanath, S.; Lee, A. K.; Delellis, R. A.; Silverman, M. L.; Frasca, L.; Wolfe, H. J. S-100 Protein Positivity in Breast Carcinomas: a Potential Pitfall in Diagnostic Immunohistochemistry. *Hum. Pathol.* **1987**, *18*, 1144-1148.
- (338) Nayar, R.; Breland, C.; Bedrossian, U.; Masood, S.; DeFrias, D.; Bedrossian, C. W. Immunoreactivity of Ductal Cells With Putative Myoepithelial Markers: A Potential Pitfall in Breast Carcinoma. *Ann. Diagn. Pathol.* **1999**, *3*, 165-173.
- (339) Bose, S.; Derosa, C. M.; Ozzello, L. Immunostaining of Type IV Collagen and Smooth Muscle Actin As an Aid in the Diagnosis of Breast Lesions. *Breast J.* **1999**, *5*, 194-201.
- (340) Nielsen, H. L.; Gudjonsson, T.; Villadsen, R.; Ronnov-Jessen, L.; Petersen, O. W. Collagen Gel Contraction Serves to Rapidly Distinguish Epithelial- and Mesenchymal-Derived Cells Irrespective of Alpha-Smooth Muscle Actin Expression. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim* **2003**, *39*, 297-303.
- (341) Kaufmann, M.; Heider, K. H.; Sinn, H. P.; von Minckwitz, G.; Ponta, H.; Herrlich, P. CD44 Variant Exon Epitopes in Primary Breast Cancer and Length of Survival. *Lancet* **1995**, *345*, 615-619.
- (342) Maiorano, E.; Altini, M.; Favia, G. Clear Cell Tumors of the Salivary Glands, Jaws, and Oral Mucosa. *Semin. Diagn. Pathol.* **1997**, *14*, 203-212.
- (343) Rosen, P. P. Myoepithelial Neoplasms. In *Breast Pathology*; Lippincott-Raven Publishers: Philadelphia, 1997; Chapter 6.
- (344) Bult, P.; Verwiel, J. M.; Wobbes, T.; Kooy-Smits, M. M.; Biert, J.; Holland, R. Malignant Adenomyoepithelioma of the Breast With Metastasis in the Thyroid Gland 12 Years After Excision of the Primary Tumor. Case Report and Review of the Literature. *Virchows Arch.* **2000**, *436*, 158-166.
- (345) Tavassoli, F. A. Miscellaneous Lesions. In *Pathology of the Breast*; McGraw-Hill: New York, 1999; Chapter 15.

- (346) Bissell, M. J.; Radisky, D. C.; Rizki, A.; Weaver, V. M.; Petersen, O. W. The Organizing Principle: Microenvironmental Influences in the Normal and Malignant Breast. *Differentiation* **2002**, *70*, 537-546.
- (347) Ermilova, V. D.; Perevoshchikov, A. G.; Anurova, O. A.; Chipysheva, T. A.; Gel'shtein, V. I. [A Rare Breast Tumor of Pluripotential Cells]. *Arkh. Patol.* **1995**, *57*, 77-81.
- (348) Maiorano, E.; Albrizio, M. Tubular Adenoma of the Breast: an Immunohistochemical Study of Ten Cases. *Pathol. Res. Pract.* **1995**, *191*, 1222-1230.
- (349) Kutzner, H.; Mentzel, T.; Kaddu, S.; Soares, L. M.; Sanguenza, O. P.; Requena, L. Cutaneous Myoepithelioma: an Under-Recognized Cutaneous Neoplasm Composed of Myoepithelial Cells. *Am. J. Surg. Pathol.* **2001**, *25*, 348-355.
- (350) Korsching, E.; Packeisen, J.; Agelopoulos, K.; Eisenacher, M.; Voss, R.; Isola, J.; Van Diest, P. J.; Brandt, B.; Boecker, W.; Buerger, H. Cytogenetic Alterations and Cytokeratin Expression Patterns in Breast Cancer: Integrating a New Model of Breast Differentiation into Cytogenetic Pathways of Breast Carcinogenesis. *Lab Invest* **2002**, *82*, 1525-1533.
- (351) Barraclough, R.; Rudland, P. S. Differentiation of Mammary Stem Cells in Vivo and in Vitro. *Environ. Health Perspect.* **1989**, *80*, 39-48.
- (352) Wetzels, R. H.; Holland, R.; van Haelst, U. J.; Lane, E. B.; Leigh, I. M.; Ramaekers, F. C. Detection of Basement Membrane Components and Basal Cell Keratin 14 in Noninvasive and Invasive Carcinomas of the Breast. *Am. J. Pathol.* **1989**, *134*, 571-579.
- (353) Bassler, R.; Katzer, B. Histopathology of Myoepithelial (Basocellular) Hyperplasias in Adenosis and Epitheliosis of the Breast Demonstrated by the Reactivity of Cytokeratins and S100 Protein. An Analysis of Heterogenic Cell Proliferations in 90 Cases of Benign and Malignant Breast Diseases. *Virchows Arch. A Pathol. Anat. Histopathol.* **1992**, *421*, 435-442.
- (354) Jones, J. L.; Critchley, D. R.; Walker, R. A. Alteration of Stromal Protein and Integrin Expression in Breast--a Marker of Premalignant Change? *J. Pathol.* **1992**, *167*, 399-406.
- (355) O'Hare, M. J.; Ormerod, M. G.; Monaghan, P.; Lane, E. B.; Gusterson, B. A. Characterization in Vitro of Luminal and Myoepithelial Cells Isolated From the Human Mammary Gland by Cell Sorting. *Differentiation* **1991**, *46*, 209-221.
- (356) Gomm, J. J.; Browne, P. J.; Coope, R. C.; Bansal, G. S.; Yiangou, C.; Johnston, C. L.; Mason, R.; Coombes, R. C. A Paracrine Role for Myoepithelial Cell-Derived FGF2 in the Normal Human Breast. *Exp. Cell Res.* **1997**, *234*, 165-173.
- (357) Stingl, J.; Eaves, C. J.; Kuusk, U.; Emerman, J. T. Phenotypic and Functional Characterization in Vitro of a Multipotent Epithelial Cell Present in the Normal Adult Human Breast. *Differentiation* **1998**, *63*, 201-213.
- (358) Stingl, J.; Eaves, C. J.; Zandieh, I.; Emerman, J. T. Characterization of Bipotent Mammary Epithelial Progenitor Cells in Normal Adult Human Breast Tissue. *Breast Cancer Res. Treat.* **2001**, *67*, 93-109.

- (359) Petersen, O. W.; Lind, N. H.; Gudjonsson, T.; Villadsen, R.; Ronnov-Jessen, L.; Bissell, M. J. The Plasticity of Human Breast Carcinoma Cells Is More Than Epithelial to Mesenchymal Conversion. *Breast Cancer Res.* **2001**, *3*, 213-217.
- (360) Dontu, G.; Abdallah, W. M.; Foley, J. M.; Jackson, K. W.; Clarke, M. F.; Kawamura, M. J.; Wicha, M. S. In Vitro Propagation and Transcriptional Profiling of Human Mammary Stem/Progenitor Cells. *Genes Dev.* **2003**, *17*, 1253-1270.
- (361) Cunha, G. R. Role of Mesenchymal-Epithelial Interactions in Normal and Abnormal Development of the Mammary Gland and Prostate. *Cancer* **1994**, *74*, 1030-1044.
- (362) Wiseman, B. S.; Werb, Z. Stromal Effects on Mammary Gland Development and Breast Cancer. *Science* **2002**, *296*, 1046-1049.
- (363) Petersen, O. W.; van Deurs, B. Growth Factor Control of Myoepithelial-Cell Differentiation in Cultures of Human Mammary Gland. *Differentiation* **1988**, *39*, 197-215.
- (364) Gomm, J. J.; Coope, R. C.; Browne, P. J.; Coombes, R. C. Separated Human Breast Epithelial and Myoepithelial Cells Have Different Growth Factor Requirements in Vitro but Can Reconstitute Normal Breast Lobuloalveolar Structure. *J. Cell Physiol* **1997**, *171*, 11-19.
- (365) Kedeshian, P.; Sternlicht, M. D.; Nguyen, M.; Shao, Z. M.; Barsky, S. H. Humatrix, a Novel Myoepithelial Matrical Gel With Unique Biochemical and Biological Properties. *Cancer Lett.* **1998**, *123*, 215-226.
- (366) Steimann, F. Fuzzy Set Theory in Medicine. *Artif. Intell. Med.* **1997**, *11*, 1-7.
- (367) Van Regenmortel, M. H. From Absolute to Exquisite Specificity. Reflections on the Fuzzy Nature of Species, Specificity and Antigenic Sites. *J. Immunol. Methods* **1998**, *216*, 37-48.
- (368) Cooper, D.; Schermer, A.; Sun, T. T. Classification of Human Epithelia and Their Neoplasms Using Monoclonal Antibodies to Keratins: Strategies, Applications, and Limitations. *Lab Invest* **1985**, *52*, 243-256.
- (369) Troyanovsky, S. M.; Leube, R. E.; Franke, W. W. Characterization of the Human Gene Encoding Cytokeratin 17 and Its Expression Pattern. *Eur. J. Cell Biol.* **1992**, *59*, 127-137.
- (370) Joseph, A.; Powell-Richards, A. O.; Shanmuganathan, V. A.; Dua, H. S. Epithelial Cell Characteristics of Cultured Human Limbal Explants. *Br. J. Ophthalmol.* **2004**, *88*, 393-398.
- (371) Debnath, J.; Mills, K. R.; Collins, N. L.; Reginato, M. J.; Muthuswamy, S. K.; Brugge, J. S. The Role of Apoptosis in Creating and Maintaining Luminal Space Within Normal and Oncogene-Expressing Mammary Acini. *Cell* **2002**, *111*, 29-40.
- (372) Hardy, M. H. The Secret Life of the Hair Follicle. *Trends Genet.* **1992**, *8*, 55-61.

- (373) Streuli, C. H.; Bailey, N.; Bissell, M. J. Control of Mammary Epithelial Differentiation: Basement Membrane Induces Tissue-Specific Gene Expression in the Absence of Cell-Cell Interaction and Morphological Polarity. *J. Cell Biol.* **1991**, *115*, 1383-1395.
- (374) Muschler, J.; Lochter, A.; Roskelley, C. D.; Yurchenco, P.; Bissell, M. J. Division of Labor Among the Alpha6beta4 Integrin, Beta1 Integrins, and an E3 Laminin Receptor to Signal Morphogenesis and Beta-Casein Expression in Mammary Epithelial Cells. *Mol. Biol. Cell* **1999**, *10*, 2817-2828.
- (375) Petersen, O. W.; Gudjonsson, T.; Villadsen, R.; Bissell, M. J.; Ronnov-Jessen, L. Epithelial Progenitor Cell Lines As Models of Normal Breast Morphogenesis and Neoplasia. *Cell Prolif.* **2003**, *36 Suppl 1*, 33-44.
- (376) Lakhani, S. R.; Ashworth, A. Microarray and Histopathological Analysis of Tumours: the Future and the Past? *Nature Rev. Cancer* **2001**, *1*, 151-157.
- (377) Goldmann, W. H. Mechanical Aspects of Cell Shape Regulation and Signaling. *Cell Biol. Int.* **2002**, *26*, 313-317.
- (378) Bissell, M. J.; Rizki, A.; Mian, I. S. Tissue Architecture: the Ultimate Regulator of Breast Epithelial Function. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2003**, *15*, 753-762.
- (379) Page, M. J.; Amess, B.; Townsend, R. R.; Parekh, R.; Herath, A.; Brusten, L.; Zvelebil, M. J.; Stein, R. C.; Waterfield, M. D.; Davies, S. C.; O'Hare, M. J. Proteomic Definition of Normal Human Luminal and Myoepithelial Breast Cells Purified From Reduction Mammoplasties. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **1999**, *96*, 12589-12594.
- (380) Nacht, M.; Ferguson, A. T.; Zhang, W.; Petroziello, J. M.; Cook, B. P.; Gao, Y. H.; Maguire, S.; Riley, D.; Coppola, G.; Landes, G. M.; Madden, S. L.; Sukumar, S. Combining Serial Analysis of Gene Expression and Array Technologies to Identify Genes Differentially Expressed in Breast Cancer. *Cancer Res.* **1999**, *59*, 5464-5470.
- (381) Yan, L.; Yang, X.; Davidson, N. E. Role of DNA Methylation and Histone Acetylation in Steroid Receptor Expression in Breast Cancer. *J. Mammary. Gland. Biol. Neoplasia.* **2001**, *6*, 183-192.
- (382) Lakhani, S. R.; Van de Vijver, M. J.; Jacquemier, J.; Anderson, T. J.; Osin, P. P.; McGuffog, L.; Easton, D. F. The Pathology of Familial Breast Cancer: Predictive Value of Immunohistochemical Markers Estrogen Receptor, Progesterone Receptor, HER-2, and P53 in Patients With Mutations in BRCA1 and BRCA2. *J. Clin. Oncol.* **2002**, *20*, 2310-2318.
- (383) Van de Vijver, M. J.; He, Y. D.; van't Veer, L. J.; Dai, H.; Hart, A. A.; Voskuil, D. W.; Schreiber, G. J.; Peterse, J. L.; Roberts, C.; Marton, M. J.; Parrish, M.; Atsma, D.; Witteveen, A.; Glas, A.; Delahaye, L.; van, d., V; Bartelink, H.; Rodenhuis, S.; Rutgers, E. T.; Friend, S. H.; Bernards, R. A Gene-Expression Signature As a Predictor of Survival in Breast Cancer. *N. Engl. J. Med.* **2002**, *347*, 1999-2009.
- (384) van't Veer, L. J.; Dai, H.; Van de Vijver, M. J.; He, Y. D.; Hart, A. A.; Bernards, R.; Friend, S. H. Expression Profiling Predicts Outcome in Breast Cancer. *Breast Cancer Res.* **2003**, *5*, 57-58.

- (385) Trojani, M.; Guiu, M.; Trouette, H.; De, M., I; Cocquet, M. Malignant Adenomyoepithelioma of the Breast. An Immunohistochemical, Cytophotometric, and Ultrastructural Study of a Case With Lung Metastases. *Am. J. Clin. Pathol.* **1992**, *98*, 598-602.
- (386) Simpson, R. H.; Cope, N.; Skalova, A.; Michal, M. Malignant Adenomyoepithelioma of the Breast With Mixed Osteogenic, Spindle Cell, and Carcinomatous Differentiation. *Am. J. Surg. Pathol.* **1998**, *22*, 631-636.
- (387) Takahashi, I., I; Tashiro, H.; Wakasugi, K.; Onohara, T.; Nishizaki, T.; Ishikawa, T.; Matsusaka, T.; Kume, K.; Yamamoto, I., I Malignant Adenomyoepithelioma of the Breast: A Case With Distant Metastases. *Breast Cancer* **1999**, *6*, 73-77.
- (388) Blau, H. M.; Brazelton, T. R.; Weimann, J. M. The Evolving Concept of a Stem Cell: Entity or Function? *Cell* **2001**, *105*, 829-841.
- (389) Taylor-Papadimitriou, J.; Stampfer, M.; Bartek, J.; Lewis, A.; Boshell, M.; Lane, E. B.; Leigh, I. M. Keratin Expression in Human Mammary Epithelial Cells Cultured From Normal and Malignant Tissue: Relation to in Vivo Phenotypes and Influence of Medium. *J. Cell Sci.* **1989**, *94 (Pt 3)*, 403-413.
- (390) Clarke, C.; Titley, J.; Davies, S.; O'Hare, M. J. An Immunomagnetic Separation Method Using Superparamagnetic (MACS) Beads for Large-Scale Purification of Human Mammary Luminal and Myoepithelial Cells. *Epithelial Cell Biol.* **1994**, *3*, 38-46.
- (391) Petersen, O. W.; Ronnov-Jessen, L.; Howlett, A. R.; Bissell, M. J. Interaction With Basement Membrane Serves to Rapidly Distinguish Growth and Differentiation Pattern of Normal and Malignant Human Breast Epithelial Cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **1992**, *89*, 9064-9068.
- (392) Boudreau, N.; Sympton, C. J.; Werb, Z.; Bissell, M. J. Suppression of ICE and Apoptosis in Mammary Epithelial Cells by Extracellular Matrix. *Science* **1995**, *267*, 891-893.
- (393) Weaver, V. M.; Petersen, O. W.; Wang, F.; Larabell, C. A.; Briand, P.; Damsky, C.; Bissell, M. J. Reversion of the Malignant Phenotype of Human Breast Cells in Three-Dimensional Culture and in Vivo by Integrin Blocking Antibodies. *J. Cell Biol.* **1997**, *137*, 231-245.
- (394) Larson, P. S.; de las, M. A.; Cupples, L. A.; Huang, K.; Rosenberg, C. L. Genetically Abnormal Clones in Histologically Normal Breast Tissue. *Am. J. Pathol.* **1998**, *152*, 1591-1598.
- (395) Roskelley, C. D.; Bissell, M. J. The Dominance of the Microenvironment in Breast and Ovarian Cancer. *Semin. Cancer Biol.* **2002**, *12*, 97-104.
- (396) Shekhar, M. P.; Pauley, R.; Heppner, G. Host Microenvironment in Breast Cancer Development: Extracellular Matrix-Stromal Cell Contribution to Neoplastic Phenotype of Epithelial Cells in the Breast. *Breast Cancer Res.* **2003**, *5*, 130-135.
- (397) Barsky, S. H.; Doberneck, S. A.; Sternlicht, M. D.; Grossman, D. A.; Love, S. M. 'Revertant' DCIS in Human Axillary Breast Carcinoma Metastases. *J. Pathol.* **1997**, *183*, 188-194.

- (398) Cserni, G. "Revertant" Mammary Solid Papillary Carcinoma in Lymph Node Metastasis. *Pathol. Oncol. Res.* **2002**, *8*, 74-77.
- (399) Kenny, P. A.; Bissell, M. J. Tumor Reversion: Correction of Malignant Behavior by Microenvironmental Cues. *Int. J. Cancer* **2003**, *107*, 688-695.
- (400) Wang, F.; Hansen, R. K.; Radisky, D.; Yoneda, T.; Barcellos-Hoff, M. H.; Petersen, O. W.; Turley, E. A.; Bissell, M. J. Phenotypic Reversion or Death of Cancer Cells by Altering Signaling Pathways in Three-Dimensional Contexts. *J. Natl. Cancer Inst.* **2002**, *94*, 1494-1503.
- (401) Lelievre, S. A.; Weaver, V. M.; Nickerson, J. A.; Larabell, C. A.; Bhaumik, A.; Petersen, O. W.; Bissell, M. J. Tissue Phenotype Depends on Reciprocal Interactions Between the Extracellular Matrix and the Structural Organization of the Nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **1998**, *95*, 14711-14716.
- (402) Petersen, O. W.; Ronnov-Jessen, L.; Weaver, V. M.; Bissell, M. J. Differentiation and Cancer in the Mammary Gland: Shedding Light on an Old Dichotomy. *Adv. Cancer Res.* **1998**, *75*, 135-161.
- (403) Tallman, M. S.; Nabhan, C.; Feusner, J. H.; Rowe, J. M. Acute Promyelocytic Leukemia: Evolving Therapeutic Strategies. *Blood* **2002**, *99*, 759-767.
- (404) Birchmeier, C.; Birchmeier, W.; Brand-Saberi, B. Epithelial-Mesenchymal Transitions in Cancer Progression. *Acta Anat. (Basel)* **1996**, *156*, 217-226.
- (405) Thiery, J. P.; Chopin, D. Epithelial Cell Plasticity in Development and Tumor Progression. *Cancer Metastasis Rev.* **1999**, *18*, 31-42.
- (406) Boyer, B.; Valles, A. M.; Edme, N. Induction and Regulation of Epithelial-Mesenchymal Transitions. *Biochem. Pharmacol.* **2000**, *60*, 1091-1099.
- (407) Wernert, N.; Locherbach, C.; Wellmann, A.; Behrens, P.; Hugel, A. Presence of Genetic Alterations in Microdissected Stroma of Human Colon and Breast Cancers. *J. Mol. Med.* **2000**, *78*, B30.
- (408) Herzlinger, D. Renal Interstitial Fibrosis: Remembrance of Things Past? *J. Clin. Invest* **2002**, *110*, 305-306.
- (409) Iwano, M.; Plieth, D.; Danoff, T. M.; Xue, C.; Okada, H.; Neilson, E. G. Evidence That Fibroblasts Derive From Epithelium During Tissue Fibrosis. *J. Clin. Invest* **2002**, *110*, 341-350.
- (410) Kalluri, R.; Neilson, E. G. Epithelial-Mesenchymal Transition and Its Implications for Fibrosis. *J. Clin. Invest* **2003**, *112*, 1776-1784.
- (411) Li, Y.; Yang, J.; Dai, C.; Wu, C.; Liu, Y. Role for Integrin-Linked Kinase in Mediating Tubular Epithelial to Mesenchymal Transition and Renal Interstitial Fibrogenesis. *J. Clin. Invest* **2003**, *112*, 503-516.
- (412) Chapman, H. A. Disorders of Lung Matrix Remodeling. *J. Clin. Invest* **2004**, *113*, 148-157.

- (413) Petersen, O. W.; Nielsen, H. L.; Gudjonsson, T.; Villadsen, R.; Rank, F.; Niebuhr, E.; Bissell, M. J.; Ronnov-Jessen, L. Epithelial to Mesenchymal Transition in Human Breast Cancer Can Provide a Nonmalignant Stroma. *Am. J. Pathol.* **2003**, *162*, 391-402.
- (414) Xue, C.; Plieth, D.; Venkov, C.; Xu, C.; Neilson, E. G. The Gatekeeper Effect of Epithelial-Mesenchymal Transition Regulates the Frequency of Breast Cancer Metastasis. *Cancer Res.* **2003**, *63*, 3386-3394.
- (415) Sawyer, E. J.; Hanby, A. M.; Ellis, P.; Lakhani, S. R.; Ellis, I. O.; Boyle, S.; Tomlinson, I. P. Molecular Analysis of Phyllodes Tumors Reveals Distinct Changes in the Epithelial and Stromal Components. *Am. J. Pathol.* **2000**, *156*, 1093-1098.
- (416) Dandachi, N.; Hauser-Kronberger, C.; More, E.; Wiesener, B.; Hacker, G. W.; Dietze, O.; Wirl, G. Co-Expression of Tenascin-C and Vimentin in Human Breast Cancer Cells Indicates Phenotypic Transdifferentiation During Tumour Progression: Correlation With Histopathological Parameters, Hormone Receptors, and Oncoproteins. *J. Pathol.* **2001**, *193*, 181-189.
- (417) Moinfar, F.; Man, Y. G.; Arnould, L.; Bratthauer, G. L.; Ratschek, M.; Tavassoli, F. A. Concurrent and Independent Genetic Alterations in the Stromal and Epithelial Cells of Mammary Carcinoma: Implications for Tumorigenesis. *Cancer Res.* **2000**, *60*, 2562-2566.
- (418) Dulbecco, R.; Henahan, M.; Bowman, M.; Okada, S.; Battifora, H.; Unger, M. Generation of Fibroblast-Like Cells From Cloned Epithelial Mammary Cells in Vitro: a Possible New Cell Type. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **1981**, *78*, 2345-2349.
- (419) Miettinen, P. J.; Ebner, R.; Lopez, A. R.; Derynck, R. TGF-Beta Induced Transdifferentiation of Mammary Epithelial Cells to Mesenchymal Cells: Involvement of Type I Receptors. *J. Cell Biol.* **1994**, *127*, 2021-2036.
- (420) Lochter, A. Plasticity of Mammary Epithelia During Normal Development and Neoplastic Progression. *Biochem. Cell Biol.* **1998**, *76*, 997-1008.
- (421) Boyer, B.; Valles, A. M.; Thiery, J. P. Model Systems of Epithelium-Mesenchyme Transitions. *Acta Anat. (Basel)* **1996**, *156*, 227-239.
- (422) Pedrocchi, M.; Schafer, B. W.; Mueller, H.; Eppenberger, U.; Heizmann, C. W. Expression of Ca(2+)-Binding Proteins of the S100 Family in Malignant Human Breast-Cancer Cell Lines and Biopsy Samples. *Int. J. Cancer* **1994**, *57*, 684-690.
- (423) Thompson, L.; Chang, B.; Barsky, S. H. Monoclonal Origins of Malignant Mixed Tumors (Carcinosarcomas). Evidence for a Divergent Histogenesis. *Am. J. Surg. Pathol.* **1996**, *20*, 277-285.
- (424) Fuchs, I. B.; Lichtenegger, W.; Buehler, H.; Henrich, W.; Stein, H.; Kleine-Tebbe, A.; Schaller, G. The Prognostic Significance of Epithelial-Mesenchymal Transition in Breast Cancer. *Anticancer Res.* **2002**, *22*, 3415-3419.
- (425) Vincent-Salomon, A.; Thiery, J. P. Host Microenvironment in Breast Cancer Development: Epithelial-Mesenchymal Transition in Breast Cancer Development. *Breast Cancer Res.* **2003**, *5*, 101-106.

- (426) Liotta, L. A.; Kohn, E. C. The Microenvironment of the Tumour-Host Interface. *Nature* **2001**, *411*, 375-379.
- (427) Reya, T.; Morrison, S. J.; Clarke, M. F.; Weissman, I. L. Stem Cells, Cancer, and Cancer Stem Cells. *Nature* **2001**, *414*, 105-111.
- (428) Tu, S. M.; Lin, S. H.; Logothetis, C. J. Stem-Cell Origin of Metastasis and Heterogeneity in Solid Tumours. *Lancet Oncol.* **2002**, *3*, 508-513.
- (429) Lawlor, D. A.; Okasha, M.; Gunnell, D.; Smith, G. D.; Ebrahim, S. Associations of Adult Measures of Childhood Growth With Breast Cancer: Findings From the British Women's Heart and Health Study. *Br. J. Cancer* **2003**, *89*, 81-87.
- (430) Ozzello, L.; Bembry, J. Y. Effects of 17-Beta-Oestradiol on the Production of Acid Mucopolysaccharides by Cell Cultures of Human Fibroblasts. *Nature* **1964**, *203*, 80-81.
- (431) Ozzello, L.; Speer, F. D. The Mucopolysaccharides in the Normal and Diseased Breast; Their Distribution and Significance. *Am. J. Pathol.* **1958**, *34*, 993-1009.
- (432) Eyden, B. P.; Watson, R. J.; Harris, M.; Howell, A. Intralobular Stromal Fibroblasts in the Resting Human Mammary Gland: Ultrastructural Properties and Intercellular Relationships. *J. Submicrosc. Cytol.* **1986**, *18*, 397-408.
- (433) Yamazaki, K.; Eyden, B. P. Ultrastructural and Immunohistochemical Observations on Intralobular Fibroblasts of Human Breast, With Observations on the CD34 Antigen. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* **1995**, *27*, 309-323.
- (434) Hartveit, E. Attenuated Cells in Breast Stroma: the Missing Lymphatic System of the Breast. *Histopathology* **1990**, *16*, 533-543.
- (435) Fina, L.; Molgaard, H. V.; Robertson, D.; Bradley, N. J.; Monaghan, P.; Delia, D.; Sutherland, D. R.; Baker, M. A.; Greaves, M. F. Expression of the CD34 Gene in Vascular Endothelial Cells. *Blood* **1990**, *75*, 2417-2426.
- (436) Herrlich, P.; Zoller, M.; Pals, S. T.; Ponta, H. CD44 Splice Variants: Metastases Meet Lymphocytes. *Immunol. Today* **1993**, *14*, 395-399.
- (437) Ishikawa, T.; Yamamoto, K.; Saito, Y. [Three Dimensional Analysis of Noninvasive Ductal Carcinoma of the Breast Using Immunohistochemical Staining Technique of Laminin]. *Nippon Geka Gakkai Zasshi* **1994**, *95*, 458-465.
- (438) Ohtake, T.; Abe, R.; Kimijima, I.; Fukushima, T.; Tsuchiya, A.; Hoshi, K.; Wakasa, H. Intraductal Extension of Primary Invasive Breast Carcinoma Treated by Breast-Conservative Surgery. Computer Graphic Three-Dimensional Reconstruction of the Mammary Duct-Lobular Systems. *Cancer* **1995**, *76*, 32-45.
- (439) Djonov, V.; Andres, A. C.; Ziemiecki, A. Vascular Remodelling During the Normal and Malignant Life Cycle of the Mammary Gland. *Microsc. Res. Tech.* **2001**, *52*, 182-189.
- (440) Djonov, V.; Baum, O.; Burri, P. H. Vascular Remodeling by Intussusceptive Angiogenesis. *Cell Tissue Res.* **2003**, *314*, 107-117.
- (441) James, V.; Kearsley, J.; Irving, T.; Amemiya, Y.; Cookson, D. Using Hair to Screen for Breast Cancer. *Nature* **1999**, *398*, 33-34.

- (442) James, V. J. The Traps and Pitfalls Inherent in the Correlation of Changes in the Fibre Diffraction Pattern of Hair With Breast Cancer. *Phys. Med. Biol.* **2003**, *48*, L5-L9.
- (443) James, V. J. Fibre Diffraction From a Single Hair Can Provide an Early Non-Invasive Test for Colon Cancer. *Med. Sci. Monit.* **2003**, *9*, MT79-MT84.
- (444) Briki, F.; Busson, B.; Doucet, J. Organization of Microfibrils in Keratin Fibers Studied by X-Ray Scattering Modelling Using the Paracrystal Concept. *Biochim. Biophys. Acta* **1998**, *1429*, 57-68.
- (445) Briki, F.; Busson, B.; Salicru, B.; Esteve, F.; Doucet, J. Breast-Cancer Diagnosis Using Hair. *Nature* **1999**, *400*, 226.
- (446) Laaziri, K.; Sutton, M.; Ghadirian, P.; Scott, A. S.; Paradis, A. J.; Tonin, P. N.; Foulkes, W. D. Is There a Correlation Between the Structure of Hair and Breast Cancer or BRCA1/2 Mutations? *Phys. Med. Biol.* **2002**, *47*, 1623-1632.
- (447) Williams, J. A.; Phillips, D. H. Mammary Expression of Xenobiotic Metabolizing Enzymes and Their Potential Role in Breast Cancer. *Cancer Res.* **2000**, *60*, 4667-4677.
- (448) Brega Massone, P. P.; Magnani, B.; Conti, B.; Lequaglie, C.; Cataldo, I. Cauterization Versus Fibrin Glue for Aerostasis in Precision Resections for Secondary Lung Tumors. *Ann. Surg. Oncol.* **2003**, *10*, 441-446.
- (449) Hagios, C.; Lochter, A.; Bissell, M. J. Tissue Architecture: the Ultimate Regulator of Epithelial Function? *Philos. Trans. R. Soc. Lond B Biol. Sci.* **1998**, *353*, 857-870.
- (450) Romanov, S. R.; Kozakiewicz, B. K.; Holst, C. R.; Stampfer, M. R.; Haupt, L. M.; Tlsty, T. D. Normal Human Mammary Epithelial Cells Spontaneously Escape Senescence and Acquire Genomic Changes. *Nature* **2001**, *409*, 633-637.
- (451) Caldwell, C. B.; Stapleton, S. J.; Holdsworth, D. W.; Jong, R. A.; Weiser, W. J.; Cooke, G.; Yaffe, M. J. Characterisation of Mammographic Parenchymal Pattern by Fractal Dimension. *Phys. Med. Biol.* **1990**, *35*, 235-247.
- (452) Ng, S. L.; Bischof, W. F. Automated Detection and Classification of Breast Tumors. *Comput. Biomed. Res.* **1992**, *25*, 218-237.
- (453) Kovalerchuk, B.; Triantaphyllou, E.; Ruiz, J. F.; Clayton, J. Fuzzy Logic in Computer-Aided Breast Cancer Diagnosis: Analysis of Lobulation. *Artif. Intell. Med.* **1997**, *11*, 75-85.
- (454) Cheng, H. D.; Lui, Y. M.; Freimanis, R. I. A Novel Approach to Microcalcification Detection Using Fuzzy Logic Technique. *IEEE Trans. Med. Imaging* **1998**, *17*, 442-450.
- (455) Jain, R.; Mazumdar, J.; Moran, W. Application of Fuzzy-Classifer System to Coronary Artery Disease and Breast Cancer. *Australas. Phys. Eng. Sci. Med.* **1998**, *21*, 141-147.
- (456) Pena-Reyes, C. A.; Sipper, M. A Fuzzy-Genetic Approach to Breast Cancer Diagnosis. *Artif. Intell. Med.* **1999**, *17*, 131-155.
- (457) Vyborny, C. J.; Giger, M. L.; Nishikawa, R. M. Computer-Aided Detection and Diagnosis of Breast Cancer. *Radiol. Clin. North Am.* **2000**, *38*, 725-740.

- (458) Sarkar, M.; Leong, T. Y. Nonparametric Techniques to Extract Fuzzy Rules for Breast Cancer Diagnosis Problem. *Medinfo*. **2001**, *10*, 1394-1398.
- (459) Seker, H.; Odetayo, M. O.; Petrovic, D.; Naguib, R. N.; Bartoli, C.; Alasio, L.; Lakshmi, M. S.; Sherbet, G. V. Assessment of Nodal Involvement and Survival Analysis in Breast Cancer Patients Using Image Cytometric Data: Statistical, Neural Network and Fuzzy Approaches. *Anticancer Res*. **2002**, *22*, 433-438.
- (460) Kim, K. G.; Kim, J. H.; Min, B. G. Classification of Malignant and Benign Tumors Using Boundary Characteristics in Breast Ultrasonograms. *J. Digit. Imaging* **2002**, *15 Suppl 1*, 224-227.
- (461) Boiculese, L. V.; Dimitriu, G. Multi-Valued Logic in Breast Cancer Detection. *Rev. Med. Chir Soc. Med. Nat. Iasi* **2003**, *107*, 425-428.
- (462) Latson, L.; Sebek, B.; Powell, K. A. Automated Cell Nuclear Segmentation in Color Images of Hematoxylin and Eosin-Stained Breast Biopsy. *Anal. Quant. Cytol. Histol.* **2003**, *25*, 321-331.
- (463) Jain, R.; Mazumdar, J. A Genetic Algorithm Based Nearest Neighbor Classification to Breast Cancer Diagnosis. *Australas. Phys. Eng Sci. Med.* **2003**, *26*, 6-11.
- (464) Seker, H.; Odetayo, M. O.; Petrovic, D.; Naguib, R. N. A Fuzzy Logic Based-Method for Prognostic Decision Making in Breast and Prostate Cancers. *IEEE Trans. Inf. Technol. Biomed.* **2003**, *7*, 114-122.
- (465) Hudson, M. J.; Stamp, G. W.; Chaudhary, K. S.; Hewitt, R.; Stubbs, A. P.; Abel, P. D.; Lalani, E. N. Human MUC1 Mucin: a Potent Glandular Morphogen. *J. Pathol.* **2001**, *194*, 373-383.
- (466) Denholm, B.; Skaer, H. Tubulogenesis: a Role for the Apical Extracellular Matrix? *Curr. Biol.* **2003**, *13*, R909-R911.
- (467) Ferguson, D. J. An Ultrastructural Study of Mitosis and Cytokinesis in Normal 'Resting' Human Breast. *Cell Tissue Res.* **1988**, *252*, 581-587.
- (468) Potten, C. S.; Loeffler, M. Stem Cells: Attributes, Cycles, Spirals, Pitfalls and Uncertainties. Lessons for and From the Crypt. *Development* **1990**, *110*, 1001-1020.
- (469) Robinson, E. J.; Neal, D. E.; Collins, A. T. Basal Cells Are Progenitors of Luminal Cells in Primary Cultures of Differentiating Human Prostatic Epithelium. *Prostate* **1998**, *37*, 149-160.
- (470) Pechoux, C.; Gudjonsson, T.; Ronnov-Jessen, L.; Bissell, M. J.; Petersen, O. W. Human Mammary Luminal Epithelial Cells Contain Progenitors to Myoepithelial Cells. *Dev. Biol.* **1999**, *206*, 88-99.
- (471) Bissell, M. J.; Hall, A. G. Form and Function in the Mammary Gland. In *The Mammary Gland. Development, Regulation and Function*; Neville, M. C., Daniel, C. W., Eds.; Plenum Press: New York, 1987; Chapter 4.
- (472) Deslypere, J. P.; Verdonck, L.; Vermeulen, A. Fat Tissue: a Steroid Reservoir and Site of Steroid Metabolism. *J. Clin. Endocrinol. Metab* **1985**, *61*, 564-570.

- (473) Dutra, F. R. Intraglandular Morules of the Endometrium. *Am. J. Clin. Pathol.* **1959**, *31*, 60-65.
- (474) Chen, K. T. Colonic Adenomatous Polyp With Focal Squamous Metaplasia. *Hum. Pathol.* **1981**, *12*, 848-849.
- (475) von der, H. U.; Deale, C. J.; Nel, J. T. Morular Metaplasia of the Endometrium Misdiagnosed As Adeno-Acanthoma in a Patient With Tubal Pregnancy. A Case Report. *S. Afr. Med. J.* **1986**, *70*, 764-766.
- (476) Saegusa, M.; Okayasu, I. Down-Regulation of Bcl-2 Expression Is Closely Related to Squamous Differentiation and Progesterone Therapy in Endometrial Carcinomas. *J. Pathol.* **1997**, *182*, 429-436.
- (477) Blaustein, A. Morular Metaplasia Misdiagnosed As Adenoacanthoma in Young Women With Polycystic Ovarian Disease. *Am. J. Surg. Pathol.* **1982**, *6*, 223-228.
- (478) Williams, G. T.; Blackshaw, A. J.; Morson, B. C. Squamous Carcinoma of the Colorectum and Its Genesis. *J. Pathol.* **1979**, *129*, 139-147.
- (479) Sarlin, J. G.; Mori, K. Morules in Epithelial Tumors of the Colon and Rectum. *Am. J. Surg. Pathol.* **1984**, *8*, 281-285.
- (480) Sasaki, A.; Yokoyama, S.; Arita, T.; Inomata, M.; Kashima, K.; Nakayama, I. Morules With Biotin-Containing Optically Clear Nuclei in Colonic Tubular Adenoma. *Am. J. Surg. Pathol.* **1999**, *23*, 336-341.
- (481) Okamoto, Y.; Yokoyama, S.; Sasaki, A.; Kashima, K.; Daa, T.; Nakayama, I.; Noguchi, S. Oncofetal Expression of Blood Group-Related Antigen on Morules in Thyroid Carcinoma. *Pathol. Int.* **1996**, *46*, 867-873.
- (482) Wiley, E. L.; Von Roenn, J. Metastatic Breast Carcinoma in Pleural Fluid. Correlation of Morphology With Estrogen Receptor Activity and Morphology of the Primary Carcinoma. *Acta Cytol.* **1990**, *34*, 169-174.
- (483) Kumarasinghe, M. P.; Fernando, M. S.; Sherifdeen, A. H.; Weerasekera, K. Cytologic Features of Invasive Micropapillary Carcinoma in a Young Female. *Diagn. Cytopathol.* **2000**, *23*, 196-198.
- (484) Ng, W. K.; Poon, C. S.; Kong, J. H. Fine Needle Aspiration Cytology of Invasive Micropapillary Carcinoma of the Breast: Review of Cases in a Three-Year Period. *Acta Cytol.* **2001**, *45*, 973-979.
- (485) Cameselle-Teijeiro, J.; Chan, J. K. Cribriform-Morular Variant of Papillary Carcinoma: a Distinctive Variant Representing the Sporadic Counterpart of Familial Adenomatous Polyposis-Associated Thyroid Carcinoma? *Mod. Pathol.* **1999**, *12*, 400-411.
- (486) Knudson, A. G., Jr. Mutation and Cancer: Statistical Study of Retinoblastoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **1971**, *68*, 820-823.
- (487) Hall, T. A. BioEdit: a User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* **1999**, *41*, 95-98.

- (488) Aplin, A. E.; Howe, A.; Alahari, S. K.; Juliano, R. L. Signal Transduction and Signal Modulation by Cell Adhesion Receptors: the Role of Integrins, Cadherins, Immunoglobulin-Cell Adhesion Molecules, and Selectins. *Pharmacol. Rev.* **1998**, *50*, 197-263.
- (489) Jones, J. C.; Kurpakus, M. A.; Cooper, H. M.; Quaranta, V. A Function for the Integrin Alpha 6 Beta 4 in the Hemidesmosome. *Cell Regul.* **1991**, *2*, 427-438.
- (490) Sonnenberg, A.; Calafat, J.; Janssen, H.; Daams, H.; Raaij-Helmer, L. M.; Falcioni, R.; Kennel, S. J.; Aplin, J. D.; Baker, J.; Loizidou, M.; . Integrin Alpha 6/Beta 4 Complex Is Located in Hemidesmosomes, Suggesting a Major Role in Epidermal Cell-Basement Membrane Adhesion. *J. Cell Biol.* **1991**, *113*, 907-917.
- (491) Giancotti, F. G. Integrin Signaling: Specificity and Control of Cell Survival and Cell Cycle Progression. *Curr. Opin. Cell Biol.* **1997**, *9*, 691-700.
- (492) Mercurio, A. M.; Bachelder, R. E.; Rabinovitz, I.; O'Connor, K. L.; Tani, T.; Shaw, L. M. The Metastatic Odyssey: the Integrin Connection. *Surg. Oncol. Clin. N. Am.* **2001**, *10*, 313-3ix.
- (493) Mercurio, A. M.; Rabinovitz, I. Towards a Mechanistic Understanding of Tumor Invasion--Lessons From the Alpha6beta 4 Integrin. *Semin. Cancer Biol.* **2001**, *11*, 129-141.
- (494) Mercurio, A. M.; Rabinovitz, I.; Shaw, L. M. The Alpha 6 Beta 4 Integrin and Epithelial Cell Migration. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2001**, *13*, 541-545.
- (495) Kenny, A. J.; O'Hare, M. J.; Gusterson, B. A. Cell-Surface Peptidases As Modulators of Growth and Differentiation. *Lancet* **1989**, *2*, 785-787.
- (496) Fox, S. B.; Fawcett, J.; Jackson, D. G.; Collins, I.; Gatter, K. C.; Harris, A. L.; Gearing, A.; Simmons, D. L. Normal Human Tissues, in Addition to Some Tumors, Express Multiple Different CD44 Isoforms. *Cancer Res.* **1994**, *54*, 4539-4546.
- (497) Cooper, N. L.; Bardy, P.; Bacani, J.; Kuusk, U.; Dougherty, G. J.; Eaves, C. J.; Emerman, J. T. Correlation of CD44 Expression With Proliferative Activity of Normal Human Breast Epithelial Cells in Culture. *Breast Cancer Res. Treat.* **1998**, *50*, 143-153.
- (498) Sun, T. T.; Eichner, R.; Nelson, W. G.; Tseng, S. C.; Weiss, R. A.; Jarvinen, M.; Woodcock-Mitchell, J. Keratin Classes: Molecular Markers for Different Types of Epithelial Differentiation. *J. Invest Dermatol.* **1983**, *81*, 109s-115s.
- (499) Verheijen, R.; Kuijpers, H. J.; van Driel, R.; Beck, J. L.; van Dierendonck, J. H.; Brakenhoff, G. J.; Ramaekers, F. C. Ki-67 Detects a Nuclear Matrix-Associated Proliferation-Related Antigen. II. Localization in Mitotic Cells and Association With Chromosomes. *J. Cell Sci.* **1989**, *92 (Pt 4)*, 531-540.
- (500) Tolstonog, G. V.; Wang, X.; Shoeman, R.; Traub, P. Intermediate Filaments Reconstituted From Vimentin, Desmin, and Glial Fibrillary Acidic Protein Selectively Bind Repetitive and Mobile DNA Sequences From a Mixture of Mouse Genomic DNA Fragments. *DNA Cell Biol.* **2000**, *19*, 647-677.

- (501) Tolstonog, G. V.; Sabasch, M.; Traub, P. Cytoplasmic Intermediate Filaments Are Stably Associated With Nuclear Matrices and Potentially Modulate Their DNA-Binding Function. *DNA Cell Biol.* **2002**, *21*, 213-239.
- (502) Li, G.; Tolstonog, G. V.; Traub, P. Interaction in Vitro of Type III Intermediate Filament Proteins With Triplex DNA. *DNA Cell Biol.* **2002**, *21*, 163-188.
- (503) Li, G.; Tolstonog, G. V.; Traub, P. Interaction in Vitro of Type III Intermediate Filament Proteins With Z-DNA and B-Z-DNA Junctions. *DNA Cell Biol.* **2003**, *22*, 141-169.
- (504) Li, G.; Tolstonog, G. V.; Sabasch, M.; Traub, P. Type III Intermediate Filament Proteins Interact With Four-Way Junction DNA and Facilitate Its Cleavage by the Junction-Resolving Enzyme T7 Endonuclease I. *DNA Cell Biol.* **2003**, *22*, 261-291.
- (505) Man, Y. G.; Tai, L.; Barner, R.; Vang, R.; Saenger, J. S.; Shekitka, K. M.; Bratthauer, G. L.; Wheeler, D. T.; Liang, C. Y.; Vinh, T. N.; Strauss, B. L. Cell Clusters Overlying Focally Disrupted Mammary Myoepithelial Cell Layers and Adjacent Cells Within the Same Duct Display Different Immunohistochemical and Genetic Features: Implications for Tumor Progression and Invasion. *Breast Cancer Res.* **2003**, *5*, R231-R241.
- (506) Gimona, M.; Herzog, M.; Vandekerckhove, J.; Small, J. V. Smooth Muscle Specific Expression of Calponin. *FEBS Lett.* **1990**, *274*, 159-162.
- (507) Malmqvist, U.; Trybus, K. M.; Yagi, S.; Carmichael, J.; Fay, F. S. Slow Cycling of Unphosphorylated Myosin Is Inhibited by Calponin, Thus Keeping Smooth Muscle Relaxed. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **1997**, *94*, 7655-7660.
- (508) Lener, T.; Burgstaller, G.; Gimona, M. The Role of Calponin in the Gene Profile of Metastatic Cells: Inhibition of Metastatic Cell Motility by Multiple Calponin Repeats. *FEBS Lett.* **2004**, *556*, 221-226.
- (509) Donato, R. S100: a Multigenic Family of Calcium-Modulated Proteins of the EF-Hand Type With Intracellular and Extracellular Functional Roles. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2001**, *33*, 637-668.
- (510) Schafer, B. W.; Heizmann, C. W. The S100 Family of EF-Hand Calcium-Binding Proteins: Functions and Pathology. *Trends Biochem. Sci.* **1996**, *21*, 134-140.
- (511) Donato, R. Functional Roles of S100 Proteins, Calcium-Binding Proteins of the EF- Hand Type. *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, *1450*, 191-231.
- (512) Scotto, C.; Deloulme, J. C.; Rousseau, D.; Chambaz, E.; Baudier, J. Calcium and S100B Regulation of P53-Dependent Cell Growth Arrest and Apoptosis. *Mol. Cell Biol.* **1998**, *18*, 4272-4281.
- (513) Rustandi, R. R.; Baldisseri, D. M.; Weber, D. J. Structure of the Negative Regulatory Domain of P53 Bound to S100B(Betabeta). *Nat. Struct. Biol.* **2000**, *7*, 570-574.
- (514) Okada, H.; Danoff, T. M.; Kalluri, R.; Neilson, E. G. Early Role of Fsp1 in Epithelial-Mesenchymal Transformation. *Am. J. Physiol* **1997**, *273*, F563-F574.
- (515) McKeon, F. P63 and the Epithelial Stem Cell: More Than Status Quo? *Genes Dev.* **2004**, *18*, 465-469.

- (516) Schweizer, A.; Ericsson, M.; Bachi, T.; Griffiths, G.; Hauri, H. P. Characterization of a Novel 63 KDa Membrane Protein. Implications for the Organization of the ER-to-Golgi Pathway. *J. Cell Sci.* **1993**, *104 (Pt 3)*, 671-683.
- (517) Schweizer, A.; Rohrer, J.; Slot, J. W.; Geuze, H. J.; Kornfeld, S. Reassessment of the Subcellular Localization of P63. *J. Cell Sci.* **1995**, *108 (Pt 6)*, 2477-2485.

ANNEXES

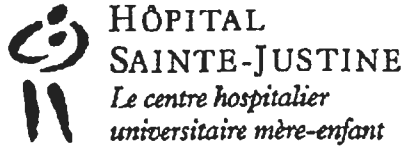


ANNEXE I

Ci-après :

**LETTRE ET FORMULAIRE
DE CONSENTEMENT/D'ASSENTIMENT
(PARTICIPANTE DE MOINS DE DIX-HUIT ANS)
APPROUVÉS PAR
LE COMITÉ D'ÉTHIQUE DE LA RECHERCHE
DE L'HÔPITAL SAINTE-JUSTINE DU CHUM MÈRE-ENFANT***

* Versions françaises officielles du 25 février 2003.



TITRE : Caractérisation moléculaire des cellules myoépithéliales humaines de glandes mammaires fœtales et adultes

INVESTIGATEURS : Luc L. Oigny, MSc, MD, pathologiste pédiatrique et professeur agrégé de clinique (investigateur principal)
Francine Jolicoeur, BSc, étudiante au PhD (Pathologie et biologie cellulaire) à l'Université de Montréal (collaboratrice interne)

COMMANDITAIRES : Montreal Breast Cancer Foundation

Bonjour,

Notre étude réalisée à l'Hôpital Sainte-Justine fait appel à des personnes comme toi. Pour participer à ce projet de recherche, les participantes doivent nous donner leur assentiment et obtenir le consentement de l'un de leurs parents (ou tuteurs légaux) si elles ont moins de 18 ans. Tu n'es pas obligée de participer à cette étude et la qualité des soins qui te sont offerts ne dépend aucunement de ta décision.

Lis bien le formulaire " FORMULAIRE D'INFORMATION, DE CONSENTEMENT ET D'ASSENTIMENT(PARTICIPANTE DE MOINS DE 18 ANS)" que l'on vient de te remettre; si tu veux plus d'informations après l'avoir lu, tu peux nous contacter au numéro suivant: (514) 345-4649, et il nous fera plaisir de discuter de cette étude avec toi et/ou avec l'un de tes parents (ou les deux, si tu veux).

Si tu décides de participer à ce projet, c'est toi qui en parlera à l'un de tes parents pour que vous regardiez ce formulaire ensemble (nous ne contacterons personne à part toi). Tu seras considérée comme une participante seulement si toi et l'un de tes parents nous redonnez la dernière page du formulaire avec vos deux signatures. Rappelle-toi que tu n'es pas obligée de participer à cette étude et que la qualité des soins qui te sont offerts ne dépend aucunement de ta décision.

Merci de ton intérêt pour notre projet!

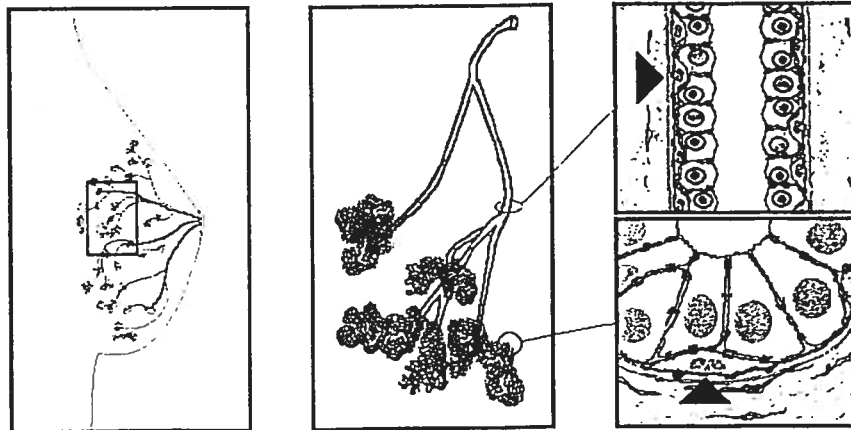
**FORMULAIRE D'INFORMATION, DE CONSENTEMENT ET D'ASSENTIMENT
(PARTICIPANTE DE MOINS DE 18 ANS)**

- TITRE :** Caractérisation moléculaire des cellules myoépithéliales humaines de glandes mammaires fœtales et adultes
- INVESTIGATEURS :** Luc L. Oigny, MSc, MD, pathologiste pédiatrique et professeur agrégé de clinique (investigateur principal)
 Dr Louis Gaboury, MD, PhD, FRSCP, pathologiste et professeur agrégé (collaborateur externe)
 Francine Jolicoeur, BSc, étudiante au PhD (Pathologie et biologie cellulaire) à l'Université de Montréal (collaboratrice interne)
- COMMANDITAIRES :** Montreal Breast Cancer Foundation

Avant de signer le présent formulaire de consentement, prenez le temps de le lire et considérer l'information ci-dessous expliquant le but et les procédures de l'étude, les risques et bienfaits, ainsi que d'autres informations concernant cette étude. Le formulaire peut contenir des mots que vous ne comprenez pas. Si un terme ou un renseignement donné ne vous semble pas clair, veuillez demander au médecin ou à un membre du personnel de l'étude de vous l'expliquer.

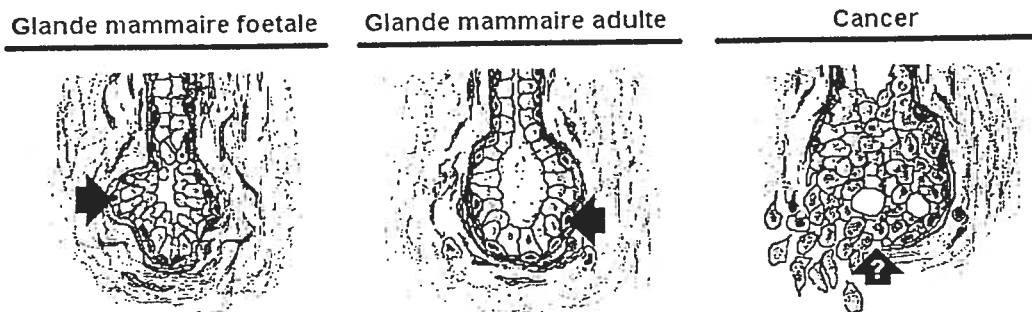
NATURE DU PROJET

La présente étude de recherche sera menée dans le but de documenter la cellule myoépithéliale du sein (identifiée par les flèches, ci-dessous).



Des études récentes suggèrent que cette cellule contrôle le développement mammaire (chez le fœtus) et qu'elle contribue à assurer le bon fonctionnement du tissu mammaire adulte. Elle pourrait aussi s'opposer au processus de l'invasion des tissus par les cancers. La plupart de ces hypothèses dérivent cependant de travaux effectués chez des souris et des rats et tardent à être étudiées chez l'humain. En fait, la cellule myoépithéliale est une cellule du sein dont les caractéristiques et les fonctions restent méconnues. Nous désirons étudier sa valeur comme outil complémentaire de diagnostic des tumeurs mammaires. En effet, cette cellule a tendance à disparaître autour des cancers invasifs du sein, des cancers qui nécessitent des traitements agressifs. Avant de disparaître complètement, nous croyons que la cellule myoépithéliale présente des altérations particulières (des indices de son élimination imminente, d'une invasion prochaine par le cancer). Nous voulons donc vérifier s'il existe des différences entre les protéines que cette cellule contient dans le sein normal *versus* en présence de cancers.

Parce que les cellules de cancers agressifs ont souvent tendance à se comporter comme des cellules fœtales (multiplication rapide, mobilité accrue), il se peut que les cellules myoépithéliales réagissent à leur contact en adoptant des comportements qu'elles n'ont habituellement que pendant le développement mammaire chez le fœtus. Par conséquent, une meilleure connaissance des caractéristiques des cellules myoépithéliales fœtales pourrait orienter efficacement notre recherche d'altérations myoépithéliales associées à la présence de cellules cancéreuses particulièrement agressives. Voilà pourquoi nous demandons la collaboration de 50 femmes comme vous afin de pouvoir étudier la cellule myoépithéliale dans le sein normal en développement. Les résultats issus de contributions comme la vôtre et des contributions de femmes adultes opérées aux seins* devraient fournir aux médecins de nouveaux outils pour localiser les cellules myoépithéliales au microscope et nous renseigner davantage sur les comportements de ces cellules en réponse aux cancers.



Les prélèvements de glandes mammaires fœtales seront analysés de façon à étudier la composition en protéines des cellules myoépithéliales qui s'y trouvent. Dans le sein, la présence d'une seule des nombreuses protéines que nous voulons étudier a été bien documentée dans les cellules myoépithéliales. Nous croyons qu'au moins 15 autres protéines pourraient fournir des renseignements importants sur le comportement de ces cellules dans le sein normal mais aussi en présence de cancers. Nous étudierons ces cellules à l'aide d'une technique déjà utilisée par les médecins (l'immunohistochimie). De cette façon, nos résultats expérimentaux miment la réalité de la clinique et les informations que nous obtiendrons pourront être immédiatement utilisées en milieu hospitalier. Si certains résultats immunohistochimiques obtenus contredisent la littérature ou semblent

particulièrement intéressants, des techniques de biologie moléculaire (dont le RT-PCR) seront utilisées pour les confirmer.

Si vous acceptez de prendre part à cette étude, vous contribuerez à améliorer les connaissances du milieu scientifique sur le sein normal et ainsi, rendrez possible la vérification de nouvelles hypothèses concernant le développement des cancers mammaires.

DÉROULEMENT DU PROJET

Interventions pratiquées dans le cadre du projet

Si vous décidez de prendre part à cette étude, votre participation n'affectera aucunement le déroulement de votre chirurgie. À l'hôpital, chaque interruption de grossesse est suivie d'un examen pathologique du fœtus. C'est au moment de cet examen de routine que de petites dissections de tissu mammaire seront pratiquées sur le fœtus (tissu qui ne fait pas habituellement l'objet d'une étude anatomo-pathologique particulière).

Nombre d'interventions

Une seule intervention (celle mentionnée ci-dessus) sera pratiquée.

Durée de l'intervention

N/A

Endroit de l'intervention

Le département de pathologie de l'Hôpital Sainte-Justine

Accès au dossier médical de la participante

Votre signature nous permet d'avoir accès à la requête adressée au département de pathologie accompagnant le fœtus, mais non à l'ensemble de votre dossier médical (de plus, seuls l'âge gestationnel et le sexe seront notés).

Période de suivi de la participante

N/A

Lieu et durée de conservation des tissus

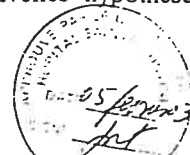
Les tissus seront conservés au département de pathologie de l'Hôpital Sainte-Justine et au Centre de Recherche de l'Hôpital Sainte-Justine. Toute portion inutilisée des tissus sera détruite à la fin de l'étude, au plus tard au début du mois d'août 2003.

Commercialisation

Les tissus prélevés ne feront l'objet d'aucune commercialisation.

AVANTAGES ET BÉNÉFICES DU PROJET

Ce projet n'aura pas de bénéfices directs pour vous. Par contre, tel que mentionné précédemment, votre participation contribuera à améliorer les connaissances du milieu scientifique sur le sein normal et rendra ainsi possible la vérification de nouvelles hypothèses concernant le développement des cancers du sein.





RISQUES ET INCONVÉNIENTS

Votre participation à ce projet ne présente aucun risque pour votre santé.

CONFIDENTIALITÉ

Seuls l'âge et le sexe du fœtus sont enregistrés pour ce projet. Ainsi, il sera impossible de vous identifier.

RESPONSABILITÉ DES CHERCHEURS

En signant ce formulaire de consentement, vous ne renoncez à aucun de vos droits prévus par la loi. De plus, vous ne libérez pas les investigateurs de leur responsabilité légale et professionnelle advenant une situation qui vous causerait préjudice.

COMPENSATION FINANCIÈRE

Aucune.

CONFLITS D'INTÉRÊTS

Aucun.

LIBERTÉ DE PARTICIPATION

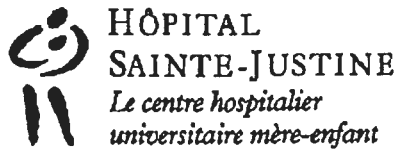
Votre participation à l'étude est libre et entièrement volontaire. Parce que les tissus étudiés sont anonymisés, un retrait de l'étude n'est plus possible après le moment de leur prélèvement (il sera impossible de retracer l'échantillon pour le détruire).

Quelle que soit votre décision, cela n'affectera pas la qualité des services de santé qui vous sont offerts.

PERSONNES RESSOURCES EN CAS DE QUESTIONS OU DE DIFFICULTÉS

Pour plus d'information concernant cette recherche, contactez le chercheur responsable du projet à l'Hôpital Sainte-Justine, le Dr Luc L. OLIGNY, au (514) 345-4649.

Pour tout renseignement sur vos droits à titre de participante à ce projet de recherche, vous pouvez contacter l'ombudsman de l'hôpital au (514) 345-4749.



TITRE : Caractérisation moléculaire des cellules myoépithéliales humaines de glandes mammaires fœtales et adultes

INVESTIGATEURS : Luc L. Oigny, MSc, MD, pathologiste pédiatrique et professeur agrégé de clinique (investigateur principal)
Dr Louis Gaboury, MD, PhD, FRSCP, pathologiste et professeur agrégé (collaborateur externe)
Francine Jolicoeur, BSc, étudiante au PhD (Pathologie et biologie cellulaire) à l'Université de Montréal (collaboratrice interne)

COMMANDITAIRES : Montreal Breast Cancer Foundation

CONSENTEMENT ET ASSENTIMENT

On m'a expliqué la nature et le déroulement du projet de recherche. J'ai pris connaissance du formulaire de consentement et on m'en a remis un exemplaire. J'ai eu l'occasion de poser des questions auxquelles on a répondu. Après réflexion, j'autorise que mon enfant participe à ce projet de recherche. J'autorise l'équipe de recherche à consulter le dossier médical de mon enfant pour obtenir les informations pertinentes à ce projet.

Nom de l'enfant (lettres moulées)

Assentiment de l'enfant (Signature)

Date

Nom du parent (lettres moulées)

Consentement du parent, tuteur (Signature)

Date

FORMULE D'ENGAGEMENT DU CHERCHEUR

Le projet de recherche a été décrit au participant ainsi que les modalités de sa participation. Un membre de l'équipe de recherche a répondu à ses questions et lui a expliqué que la participation est libre et volontaire. Je m'engage à respecter ce qui a été convenu dans le formulaire de consentement.

Nom du chercheur ou du représentant (lettres moulées)

Signature du chercheur ou du représentant

Date

ANNEXE II

Ci-après :

**FORMULAIRE D'INFORMATION ET DE CONSENTEMENT
(PATIENTES MAJEURES)
APPROUVÉ PAR
LE COMITÉ D'ÉTHIQUE DE LA RECHERCHE DU CHUM***

* Version française officielle du 21 novembre 2002.

APPROUVÉ, Comité d'éthique de la recherche

CHUM, ce. 02/11/21 *[Signature]*

FORMULAIRE D'INFORMATION ET DE CONSENTEMENT ÉCLAIRÉ DESTINÉ À LA PATIENTE

TITRE : Étude immunohistochimique et moléculaire de la cellule myoépithéliale dans le sein normal et pathologique

COMMANDITAIRES : Montreal Breast Cancer Foundation

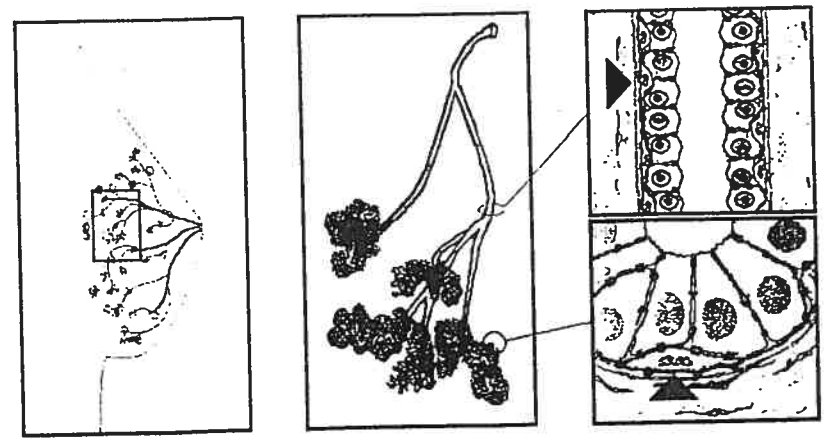
INVESTIGATEURS : Dr Louis Gaboury, MD, PhD, FRSCP (investigateur principal)
Dr Luc L. Oligny, MSc, MD
Francine Jolicoeur, BSc

Avant de signer le présent formulaire de consentement, prenez le temps de le lire et de considérer l'information ci-dessous expliquant le but et les procédures de l'étude, les risques et bienfaits, ainsi que d'autres informations concernant cette étude. Le formulaire peut contenir des mots que vous ne comprenez pas. Si un terme ou un renseignement donné ne vous semble pas clair, veuillez demander au médecin ou à un membre du personnel de l'étude de vous l'expliquer.

INTRODUCTION ET BUT DE L'ÉTUDE

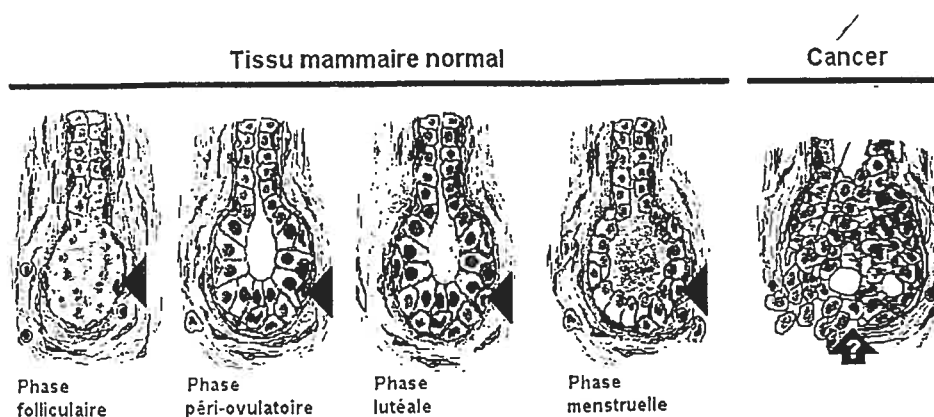
Nous vous invitons à participer à la présente étude de recherche soit parce que vous allez être opérée aux seins pour une réduction mammaire bilatérale à but cosmétique, soit parce que vous allez être opérée dans un but thérapeutique pour retirer une région de tissu mammaire lésé.

La présente étude de recherche sera menée dans le but de documenter la cellule myoépithéliale du sein (identifiée par les flèches, ci-dessous).



La cellule myoépithéliale du sein est une cellule du sein dont les caractéristiques et les fonctions sont encore méconnues chez l'humain. Nous désirons étudier sa valeur comme outil complémentaire de diagnostic des tumeurs mammaires. En effet, cette cellule a tendance à disparaître autour des cancers

du sein invasifs, des cancers qui nécessitent des traitements agressifs. Avant de disparaître complètement, nous croyons que la cellule myoépithéliale présente des altérations particulières (des indices qui permettraient de reconnaître les tumeurs qui présentent un plus grand risque pour la santé des patientes). Nous voulons donc vérifier s'il existe des différences entre les protéines que cette cellule contient dans le sein normal *versus* en présence de cancers. Nos résultats devraient fournir aux médecins de nouveaux outils pour localiser les cellules myoépithéliales au microscope et nous renseigner davantage sur les comportements de ces cellules en réponse aux cancers. Voilà pourquoi nous demandons la collaboration de femmes comme vous pour étudier la cellule myoépithéliale dans le sein normal à différents moments du cycle menstruel ou autour de lésions cancéreuses du sein.



Si vous êtes admissible à la présente étude et si vous acceptez d'y prendre part, vous contribuerez à améliorer les connaissances du milieu scientifique sur la composition du sein normal et sur la composition de lésions mammaires cancéreuses.

DESCRIPTION DE L'ÉTUDE

Dans le cadre de l'étude, nous remettons d'abord le présent formulaire d'information et de consentement éclairé à des femmes comme vous. Environ 100 femmes (50 femmes présentant un sein en santé [profil A] et 50 femmes présentant une lésion cancéreuse [profil B]) participeront à cette étude. Si vous décidez de prendre part à cette étude, votre participation n'affectera aucunement le déroulement de votre chirurgie (pas de visites ou d'examens physiques supplémentaires). Les étapes de l'étude sont expliquées ci-dessous selon que vous êtes une femme de Profil A ou B.

En acceptant de participer à l'étude, vous nous accordez la permission de prélever trois échantillons de tissu normal (chacun de la grosseur d'un cube de sucre) après que les examens de routine aient été complétés (profil A) ou de retirer des portions de tissu mammaire qui renferment une lésion cancéreuse (profil B). Nous vous demandons la permission de consulter la portion de votre dossier médical reliée à votre opération (seulement au moment d'effectuer nos prélèvements). Nous vous demanderons enfin de compléter un court questionnaire (âge, histoire reproductive, prise de contraceptifs oraux / d'hormones, jour de votre cycle menstruel pour lequel l'opération est prévue).

DESCRIPTION DE L'ÉTUDE (suite)

Les prélèvements de tissus obtenus de femmes de Profil A ou B seront analysés de la même manière de façon à étudier la composition en protéines des cellules myoépithéliales qui s'y trouvent. Dans le sein, la présence d'une seule des nombreuses protéines que nous voulons étudier a été bien documentée dans les cellules myoépithéliales. Nous croyons qu'au moins 15 autres protéines pourraient fournir des renseignements importants sur le comportement de ces cellules dans le sein normal mais aussi en présence de cancers. Nous étudierons ces cellules à l'aide d'une technique déjà utilisée par les médecins (l'immunohistochimie). De cette façon, nos résultats expérimentaux miment la réalité de la clinique et les informations que nous obtiendrons pourront être immédiatement utilisées en milieu hospitalier. Si certains résultats immunohistochimiques obtenus contredisent la littérature ou semblent particulièrement intéressants, des techniques de biologie moléculaire (dont le RT-PCR) seront utilisées pour les confirmer.

RISQUES POSSIBLES

Votre participation à cette étude ne présente aucun risque pour votre santé. Seuls les tissus prélevés dans le cadre de votre chirurgie seront analysés au cours de cette étude.

BIENFAITS POSSIBLES

Cette étude ne vous apportera aucun bénéfice personnel. Les données obtenues lors de cette étude serviront toutefois à mieux documenter la cellule myoépithéliale du sein; une meilleure description de ses caractéristiques (dans le sein normal et dans certains cancers) est nécessaire pour juger de sa valeur comme outil d'analyse des tumeurs mammaires.

INDEMNISATION / COMPENSATION

Aucune compensation ou indemnisation n'a été prévue pour cette étude. Toutefois, en signant le présent formulaire de consentement, vous ne renoncez à aucun de vos droits légaux ni ne libérez le chercheur ou l'établissement où prend place cette étude de leur responsabilité professionnelle.

CONFIDENTIALITÉ

Tous les renseignements obtenus à votre sujet au cours de l'étude demeureront strictement confidentiels, à moins que la loi n'exige leur divulgation. Votre nom n'apparaîtra dans aucune des données de recherche vous concernant; seul un code alpha-numérique nous permettra de relier nos données aux renseignements vous concernant. En outre, votre nom ne figurera dans aucun des rapports préparés à la suite de cette étude. Vous ne serez pas contactée pendant la réalisation de cette étude ni pour des études subséquentes.

Toutes ces études pourront être réalisées grâce aux échantillons de tissus obtenus de femmes de Profils A et B; des codes alpha-numériques seront assignés aux échantillons tissulaires pour la compilation des données, l'analyse des résultats et, éventuellement, la publication des résultats de cette étude (voir la clause de confidentialité). Les cellules des tissus prélevés dans le cadre de cette étude ne seront pas mises en culture et ne feront l'objet d'AUCUNE ANALYSE GÉNÉTIQUE.

N.B. Échantillons tissulaires obtenus de femmes de Profil A et de Profil B: la portion inutilisée des échantillons sera détruite par incinération au terme de cette étude (juin 2003).

PARTICIPATION VOLONTAIRE / REFUS OU RETRAIT DE L'ÉTUDE

Votre participation à la présente étude est totalement volontaire. Vous n'êtes pas obligée d'y prendre part. Vous avez le droit de poser toutes les questions que vous désirez sur n'importe quel aspect de l'étude et à n'importe quel moment. Vous avez le droit de vous retirer de l'étude en tout temps, sans que cela ne vous porte préjudice. Il est également entendu que votre décision de participer ou de ne pas participer à la présente étude n'influencera d'aucune manière les soins médicaux qui vous seront prodigués et qu'aucune justification ne vous sera demandée.

PERSONNES RESSOURCES

Les investigateurs peuvent être rejoints au numéro suivant : (514) 956-1951. Si vous avez des questions sur vos droits en tant que sujet à une étude de recherche, trois personnes ressources du CHUM peuvent être contactées:

Mme Esther Leonard à l'Hôtel-Dieu du CHUM	(514) 890-8000 poste 12761
Mme Louise Brunelle à Notre-Dame du CHUM	(514) 890-8000 poste 26047
Responsable du traitement des plaintes à Saint-Luc du CHUM	(514) 890-8000 poste 36366.

CONSENTEMENT ÉCLAIRÉ DE LA PATIENTE

- 1- J'ai pris connaissance du Formulaire d'information et de consentement éclairé destiné au patient.
- 2- Je reconnais avoir été bien informée et avoir eu suffisamment de temps pour considérer ces informations et pour demander conseil.
- 3- Je reconnais que le langage médical et technique m'a été expliqué à ma satisfaction et que j'ai reçu les réponses satisfaisantes à mes questions.
- 4- Toutes les informations recueillies seront traitées de façon confidentielle et les résultats ne seront utilisés qu'à des fins scientifiques.
- 5- Je consens à la publication des résultats de cette étude en autant que les informations demeurent anonymes et qu'aucune identification ne puisse être faite.
- 6- J'ai été informée que ma participation à l'étude est volontaire et que je suis entièrement libre de refuser d'y participer ou de me retirer de l'étude en tout temps sans que ceci ne modifie en rien la qualité des soins que je recevrai.
- 7- J'ai également été informée que le Comité d'évaluation scientifique et le Comité d'éthique de la recherche du CHUM ont approuvé le protocole de l'étude.
- 8- Je recevrai un exemplaire signé du présent Formulaire d'information et de consentement éclairé destiné au patient.
- 9- Pour de plus amples informations concernant l'étude, je peux communiquer avec les investigateurs au numéro suivant : (514) 956-1951.
- 10- Pour tout renseignement concernant mes droits en tant que participante à cette étude, les noms de trois personnes ressources du CHUM m'ont été fournis.
- 11- Tout article contenu dans ce document qui irait à l'encontre d'une loi existante applicable dans la province de Québec sera nul et non avenu.

Nom de la patiente _____

Signature : _____

Date* : _____

Nom du témoin _____

Signature : _____

Date* : _____

DÉCLARATION DE L'INVESTIGATEUR

J'affirme avoir expliqué à la patiente dont le nom figure ci-dessus la nature de l'étude, les bénéfices possibles, et les risques connus et éventuels que comporte sa participation à la présente étude. En outre, je lui ai mentionné qu'elle est libre de prendre part à la présente étude et qu'elle peut mettre fin à sa participation en tout temps, sans que cela n'influence les soins médicaux qui lui seront prodigués.

Nom du chercheur : _____

Signature : _____

Date* : _____

Copies conformes avec signatures originales :

- Patiente
- Service des archives médicales CHUM / Hôtel-Dieu
- Chercheur

* Veuillez dater personnellement votre signature

INFORMATIONS CONFIDENTIELLES

- TITRE DE L'ÉTUDE:** Étude immunohistochimique et moléculaire de la cellule myoépithéliale dans le sein normal et pathologique
- COMMANDITAIRE :** Montreal Breast Cancer Foundation
- INVESTIGATEURS :** Dr Louis Gaboury, MD, PhD, FRSCP (investigateur principal)
Dr Luc L. Oigny, MSc, MD
Francine Jolicoeur, BSc

QUESTIONNAIRE

- 1- À quel profil de participante correspondez-vous?
- Profil A (réduction mammaire)
 - Profil B (exérèse de lésion mammaire)
- 2- Quel âge avez-vous?
- _____
- 3- Histoire reproductive
- Avez-vous eu...
- un(des) enfant(s)?
 - fait une(des) fausse(s) couche(s) par le passé?
 - subi un(des) avortement(s) par le passé?
- Si vous avez eu un(des) enfants, avez-vous pratiqué l'allaitement au sein?
- Oui, pour au moins un enfant
 - Non
- 4- Prenez-vous de manière régulière des contraceptifs oraux (ou suppléments hormonaux)?
- Oui
 - Non
- 5- Pour quel jour de votre cycle menstruel votre opération est-elle prévue? (SVP Indiquer entre parenthèses la durée habituelle, en jours, de vos cycles menstruels)
- _____ (_____ jours)

ANNEXE III

MICROARRAYS TISSULAIRES

Fabrication des microarrays tissulaires

Nous avons construit des *microarrays* tissulaires à partir de blocs de paraffine de tissus de contrôles d'IHC et de quelques-uns de nos spécimens mammaires (blocs résiduels de certains cas de sein normal et pathologique) à l'aide d'un appareil à opération manuelle (MTA-1, Beecher Instruments Inc., Sun Prairie, Wisconsin).

Figure 37 Appareil semi-automatique permettant la création de *microarrays* tissulaires



Appareil MTA-1 de Beecher Instruments Inc. à gauche; à droite : lames colorées à l'HPS d'un *microarray* et de certains blocs de tissu «donneurs» ayant servi à sa fabrication.

L'appareil permet de retirer des cylindres de paraffine d'un bloc vierge avec un premier poinçon (le bloc receveur où se construit le *microarray*), de retirer des carottes de blocs tissulaires «donneurs» avec un second poinçon, puis d'insérer relativement facilement ces carottes tissulaires dans les trous pratiqués dans le bloc receveur (vis micrométriques et compteurs digitaux assurant un déplacement précis du support de poinçons à l'horizontale).

Trois précautions permettent de maximiser le rendement des *microarrays* ainsi produits : 1- autant que possible, insérer les carottes tissulaires à la même hauteur dans le bloc receveur; 2- prévoir, au minimum, deux carottes de chaque tissu d'intérêt pour un

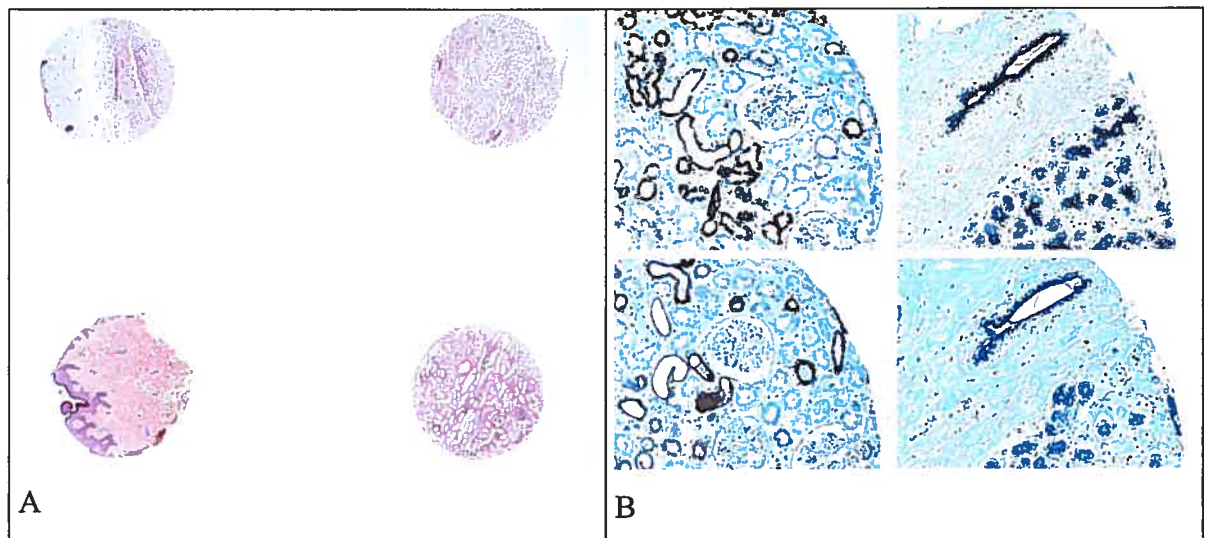
microarray donné; 3- placer les *microarrays* tissulaires dans une étuve pour quelques heures à 37°C avant de les couper, ce qui favorise l'adhésion des carottes au squelette de paraffine et limite donc la perte d'échantillons. Bien que des rubans adhésifs soient disponibles commercialement pour faciliter la coupe des *microarrays* tissulaires (pour réduire l'enroulement, la perte de pastilles tissulaires), nous n'y avons pas eu recours puisque selon leurs fabricants, leur utilisation peut affecter les résultats obtenus en IHC avec certains anticorps.

Les *microarrays* tissulaires : quelques avantages et inconvénients liés à leur utilisation

Avantages

- Traitement plus économique d'un nombre accru de spécimens;
- Traitement très uniforme des échantillons facilitant l'interprétation des résultats.

Figure 38 Principaux avantages des *microarrays* tissulaires

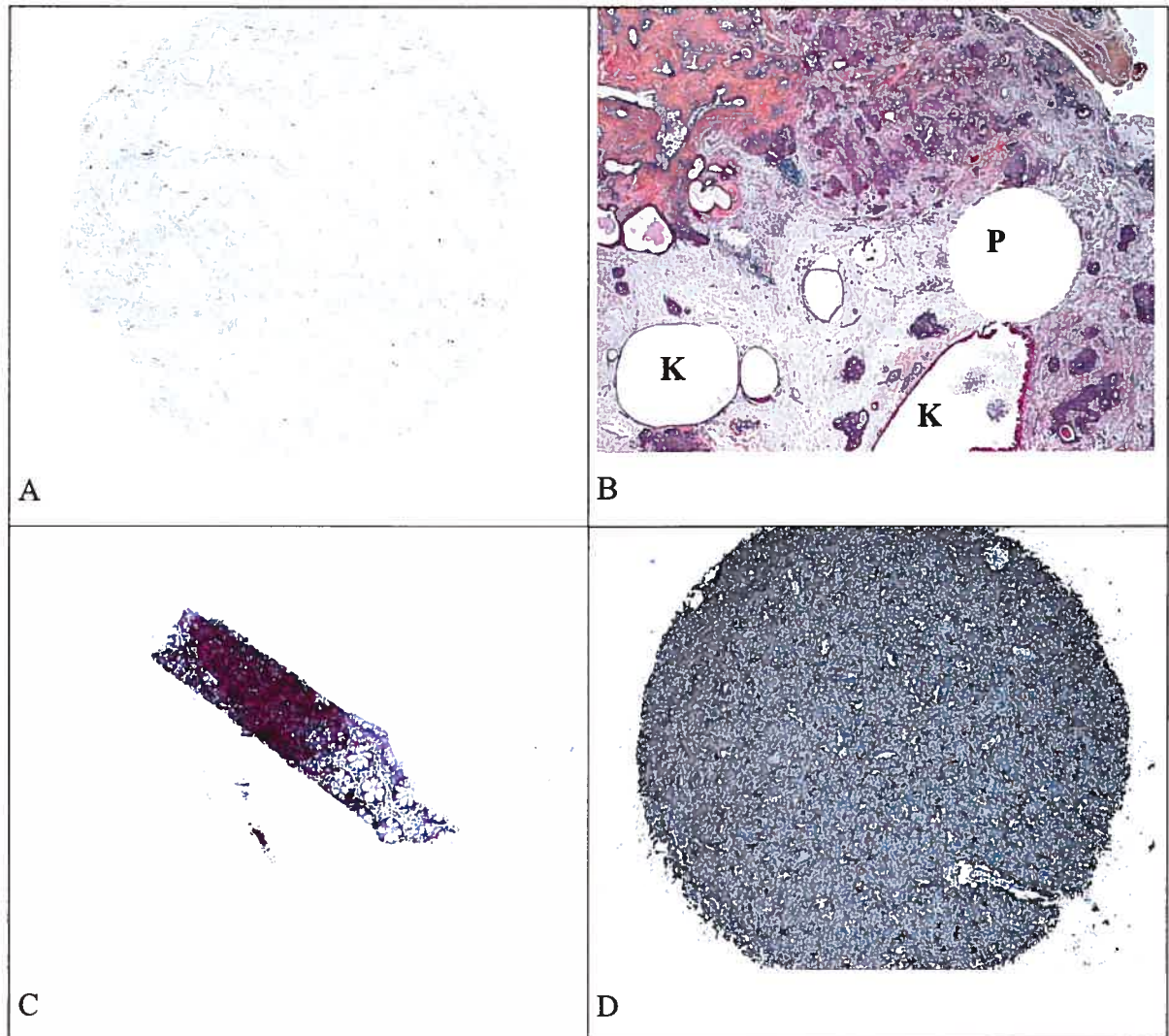


Traitement uniforme d'un grand nombre de spécimens : **A.** coloration de routine d'une portion de *microarray* renfermant deux échantillons de peau (gauche) et deux échantillons de rein (droite). **B.** résultats d'IHC pour deux anticorps (haut *versus* bas) dans des pastilles de rein (gauche) et de sein normal (droite) de coupes parallèles du même *microarray*. (A. HPS, 25X; B. KRT19/haut, EMA/bas, 100X).

Inconvénients

- Échantillonnage inadéquat en raison de l'hétérogénéité des tissus utilisés;
- Perte plus fréquente des échantillons en cours de technique;
- Risque accru de contamination inter-échantillonnale;
- Répercussion d'un obstacle à la coupe d'un échantillon sur plusieurs autres (ex. déchirement par des micro-calcifications).

Figure 39 Principaux inconvénients des *microarrays* tissulaires



Hétérogénéité tissulaire entraînant un échantillonnage inégal : **A.** absence d'éléments glandulaires dans un échantillon de sein normal; **B.** section de bloc donneur illustrant un échantillonnage tumoral inadéquat; les kystes mammaires de diamètre voisin à celui des poinçons utilisés sont fréquents (K : lumières kystiques; P : trou de poinçon). Perte accrue d'échantillon : **C.** décollement d'une pastille (coloration de routine automatisée). Effritement augmentant les risques de contamination inter-échantillonnale : **D.** échantillon de moelle épinière suite à une coloration IHC manuelle. (A et C : HPS, 25X; C : HPS, 100X; D : S100 β , 100X).

Des microarrays tissulaires pour la clinique?

À notre avis, l'utilisation de *microarrays* de tissus de contrôle d'IHC pourrait s'avérer profitable à plus d'un point de vue pour les départements hospitaliers de pathologie. Premièrement, contrairement aux sections complètes de tissus contrôles utilisées actuellement, les sections de *microarrays* «de contrôle» pourraient fournir à coûts moindres – en temps, en réactifs - une validation plus fiable de chaque marquage demandé par les pathologistes (puisque plusieurs contrôles sont traités simultanément et donc, très uniformément). Deuxièmement, certains tissus de contrôle difficiles à obtenir seraient mieux utilisés, un bloc de tissu donné permettant de générer plusieurs *microarrays* de contrôle. Troisièmement, l'utilisation de sections de *microarrays* de tissus de contrôle réduit le temps passé à la détermination de contrôles appropriés lorsque de nouveaux anticorps doivent être testés; cette information cruciale n'est pas toujours disponible auprès des fabricants, la majorité des anticorps étant officiellement vendus comme outils de recherche et non de diagnostic.

En revanche, l'utilisation de *microarrays* de tissus de patients à des fins autres que de recherche nous semble risquée. Car si les risques d'un échantillonnage incomplet, d'une perte d'échantillon(s) et/ou d'une contamination inter-cas plus fréquentes peuvent être compensés par un devis de recherche adéquat, ils ne peuvent être complètement éliminés – ce qui devient inacceptable dans un contexte de diagnostic ou de suivi de traitement.

ANNEXE IV

IMMUNOHISTOCHIMIE (IHC)

Dilution de travail des anticorps primaires

Les anticorps primaires sont dilués à l'aide d'un tampon commercial (Antibody Diluting Buffer, Dakocytomation, Mississauga, ON) ces solutions sont conservées à 4°C jusqu'à leur utilisation.

Préparation des lames

Les coupes de tissu congelé conservées au réfrigérateur doivent être sorties plusieurs minutes avant le début de la technique (environ 30 min, pour faire disparaître toute condensation); elles sont ensuite fixées à l'acétone froide (10 min), puis laissées à l'air ambiant pour sécher.

Les coupes de tissus fixés/enrobés en paraffine, conservées à température de la pièce, sont placées dans un séchoir à air chaud (environ 24 h, pour éliminer toute humidité et maximiser l'adhésion des coupes aux lames). Les coupes sont déparaffinées grâce à des bains successifs de toluène (3), d'ETOH 100% (2) et d'ETOH 95% (1) d'une durée de 5 min chacun. Les lames sont rincées à l'eau courante (5 min). Si une technique de peroxydase indirecte est envisagée, les coupes sont traitées au H₂O₂ 3% (10 min pour bloquer la PERe), puis rincées à l'eau courante (5 min); si une technique de phosphatase indirecte est prévue, du levamisole sera plutôt ajouté à la solution du chromogène en fin de technique.

Pré-traitement au micro-ondes

Certains épitopes ciblés par des anticorps primaires semblent être partiellement ou totalement masqués au cours du processus de fixation/d'inclusion en paraffine des tissus. Le protocole suivant vise leur démasquage par la chaleur en milieu légèrement acide (CHUM, méthode standard) :

- 1- Les coupes sont placées, sous l'eau courante, dans un portoir de plastique de 25 places, les places vides étant au besoin comblées par des lames vierges;
- 2- 1000 ml de tampon citrate (pH 6) sont portés à ébullition au four micro-ondes (intensité maximale, 9 min) dans un presto fermé;

- 3- Les coupes sont immergées dans le presto; l'ensemble est remis au four micro-ondes (puissance maximale, 4 min);
- 4- Lorsque la pression interne a chuté, le presto est ouvert; les coupes y demeurent pour 15 min avant d'être doucement submergées dans un bain d'eau courante froide (5 min).

Technique de pré-traitement par digestion enzymatique

Le démasquage de certains épitopes nécessite une digestion enzymatique partielle. Le protocole suivant utilise la pronase (CHUM, méthode standard) :

- 1- Les coupes sont incubées pour 10 min dans une solution de pronase (Sigma Chemical Co., St-Louis, MO) maintenue à 37°C dans une étuve de comptoir (LabLine Imperial II Incubator, Lab Line Instruments Inc., Melrose Park, IL);
- 2- Les lames sont rincées à l'eau courante (5 min).

Immunohistochimie indirecte employant la peroxydase du raifort (HRP) ou la phosphatase alcaline (marquage simple)

Il est essentiel que les lames ne sèchent à aucun moment de la technique décrite ci-dessous (protocole standard au CHUM) :

- 1- Pendant que les lames sont encore dans l'eau, avec un crayon conçu à cet effet (Dakocytomation, Mississauga, ON), encercler les pièces (le cerne retient les solutions appliquées au niveau des tissus);
- 2- Rincer au PBS avec du Tween 20 (5 min);
- 3- Essuyer les lames une à une sur les côtés et le dessous avant d'y déposer la solution de «*protein blocking*» (Universal Blocking Solution, Dakocytomation, Mississauga, ON). Laisser incubé pour 5 min. Cette solution contribue à encombrer d'éventuels sites de liaison non spécifiques des anticorps primaires dans les tissus;
- 4- Verser l'excédent de sérum des lames et y déposer l'anticorps primaire (NE PAS rincer au PBS préalablement). Incubation de 1 heure (dans une boîte couverte, les lames ne devant pas sécher);
- 5- Rincer au PBS avec du Tween 20 (5 min);
- 6- Incubation avec le(s) réactif(s) secondaire/tertiaire utilisé(s) suivant les directives du fabricant (kits HRP Envision ou LSAB2, kit AP LSAB+; Dakocytomation, Mississauga, ON) variant de 30 à 40 min;
- 7- Rincer au PBS avec du Tween 20 (5 min);

- 8- Incubation des coupes avec un chromogène approprié pour le marquage à la peroxydase ou à la phosphatase alcaline pour une durée variant de 3 à 7 min suivant les tissus, les antigènes et le chromogène considérés;
- 9- Rincer à l'eau courante (10 min).

N.B. Le Tween 20 est un détergent (Dako Tween 20 Reagent, Dakocytomation, Mississauga, ON; utilisé selon les directives du fabricant); il favorise un étalement plus uniforme des solutions sur les tissus.

Contre-coloration

Avec les marquages d'IHC simples, nous avons opté pour une contre-coloration standard à l'hématoxyline de Harris. Le safran a été utilisé avec certains doubles-marquages.

Immunohistochimie indirecte employant la peroxydase du raifort et la phosphatase alcaline

Nous avons effectué du double marquage à l'aide d'un kit commercial prévu à cet effet; nous avons aussi mis au point une technique adaptée aux protocoles d'IHC utilisés localement (CHUM). Dans les deux cas, les résultats étaient de meilleure qualité lorsque les deux anticorps utilisés ne nécessitaient aucun pré-traitement sur coupes de tissu en paraffine (minimiser l'altération des tissus, déjà accrue par la multiplication des traitements, se traduisant par le décollement accru des tissus et l'intensification du bruit de fond).

Kit commercial

Le kit commercial Histostain-DS (Zymed, San Francisco, CA) permet un double marquage violet – rouge grâce aux chromogènes BCIP/NBT (HRP) et AEC (PA). Le produit a été utilisé conformément aux directives du fabricant, avec une durée d'incubation de 1 h avec les anticorps primaires. L'inclusion de contrôles marqués «simplement» est essentielle pour juger de la spécificité de la technique (ajustement des dilutions usuelles souvent nécessaire).

Technique de double-marquage personnelle adaptée aux protocoles d'immunohistochimie standards du CHUM

Nous nous sommes basés sur les protocoles standard hospitalier pour développer une méthode qui pourrait être facilement réalisée en clinique, en deux temps. Elle ne nécessite pas de mise au point additionnelle quand les deux anticorps employés ne demandent pas de pré-traitements. Dans un premier temps, la technique d'IHC décrite précédemment est réalisée en HRP - DAB (Sigma Chemical Co., St-Louis, MO). Les lames sont maintenues dans l'eau si le second marquage est effectué immédiatement, ce qui est idéal. Cependant, les lames peuvent aussi être montées de façon standard (au toluène/xylène, voir plus loin) pour être «démontées» – même des mois plus tard – pour effectuer la deuxième étape de la technique. Le montage avec film pré-encollé facilite cette démarche (décollement aisé du film avec un mélange d'acétone et de toluène de courte durée).

Dans un deuxième temps, la technique d'IHC est reprise, mais en PA - Vector Blue (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA), en PA - BCIP/NBT (Zymed) ou en PA – Fast Red (Dakocytomation, Carpinteria, CA). Elle est précédée de bains de 15 sec de toluène (2), d'ETOH 100% (1) et d'ETOH 95% (1) si les coupes ont été montées de manière standard et démontées avant le second marquage. Le Vector Blue a été utilisé conformément aux directives du fabricant, à une exception près : le temps d'incubation a dû être réduit, du 20-30 min suggéré, à 6 min. L'ajout de levamisole aux solutions de chromogènes minimise, au besoin, le bruit de fond associé à la PAe; aucun de nos tissus mammaires fixés et enrobés en paraffine ne démontraient une activité problématique (coupes testées avec du BCIP/NBT encore négatives après 15 minutes). Le temps d'incubation est de 10-12 minutes avec le BCIP/NBT. Parce que le BCIP/NBT permet un montage standard, les tissus pouvaient être contre-colorés au safran. La robustesse des précipités de BCIP/NBT nous l'ont aussi fait préférer au Vector Blue et au Fast Red pour la réalisation de doubles-marquages sur spécimens rares.

Montage des lames

Montage standard (au toluène/xylène)

Ce type de montage est compatible avec les chromogènes DAB et BCIP/NBT. Les lames sont rincées dans des bains successifs d'ETOH 100% (2) et de toluène (2). Une goutte de colle soluble au xylène et une lamelle de verre sont déposées manuellement sur le tissu, à moins d'utiliser un appareil de montage à film pré-encollé (Tissue-Tek, Sakura Finetek U.S.A. Inc., Torrance, CA).

Montage en milieu aqueux

Ce type de montage est requis pour les chromogènes AEC, Fast Red et Vector Blue (leurs précipités sont solubles au toluène/xylène). Une goutte de milieu de montage aqueux (Crystal/Mount, Biomedica Corp., Foster City, CA) est déposée sur le tissu des lames préalablement rincées à l'eau courante et recouverte d'une lamelle de verre (la lamelle améliore la qualité des photographies). Les précipités de ces chromogènes ont le défaut d'être rapidement dégradés par la lumière.

ANNEXE V

MICRODISSECTION PAR CAPTURE AU LASER SUR LE PIXCELL II D'ARCTURUS (POUR ÉTUDE D'EXPRESSION)

Les protocoles décrits dans cette Annexe sont largement basés sur des protocoles développés par le Dr Claire Landry (Département d'immunologie, Université de Montréal) sur le PixCell II d'Arcturus (Mountain View, CA).

Préparation des échantillons

Qualité des échantillons

Dans le cadre de nos travaux, le matériel microdisséqué devait faire l'objet d'une analyse d'expression; de nombreuses mesures ont donc été observées, dès la collecte des échantillons, pour limiter la dégradation de l'ARN des tissus d'intérêt. Ces mesures incluaient l'observation de conditions de travail dites «*RNases-free*» (RF), soit de conditions qui limitent l'introduction d'enzymes qui digèrent l'ARN (ex. le port de gants en tout temps, l'utilisation de solutions, réactifs et équipements neufs ou identifiés «RF», etc.), ainsi que le maintien au sec et à basses températures des échantillons (échantillons de petite taille, congelés par snap-freezing, conservés à -80°C et transportés sur glace sèche si nécessaire).

Coupe des échantillons

Les tissus congelés ont été coupés au cryostat en conditions RF. À cause de son important contenu en graisse, le tissu mammaire est particulièrement friable; or, les coupes devaient présenter le moins de plis possible, ceux-ci nuisant considérablement à la microdissection par capture au laser (les plis accroissent la distance entre le film thermoplastique et le tissu). Nos tissus ont été coupés à -27°C et à $5\mu\text{m}$. À cette épaisseur, les coupes s'effritaient peu et leurs petits replis inévitables avaient moins d'impact sur la microdissection (repli accroissant la distance tissu/film à $15\mu\text{m}$ au lieu de $21\mu\text{m}$, lorsque les coupes ont $7\mu\text{m}$ d'épaisseur). Les coupes ont été récupérées sur des lames de verre non chargées (Bloodsmear Slides, Surgipath, Winnipeg, MAN), une trop forte adhérence des tissus aux lames n'étant pas souhaitable. Les lames ont été placées dos à dos et enveloppées de papier aluminium pour être entreposées à -80°C (tissus contre la face brillante).

Protocole pré-microdissection

Au moment d'être microdisséquées, les lames gardées sur glace sèche étaient déballées et préparées en conditions RF, selon la technique ci-dessous, pour être utilisées une à une :

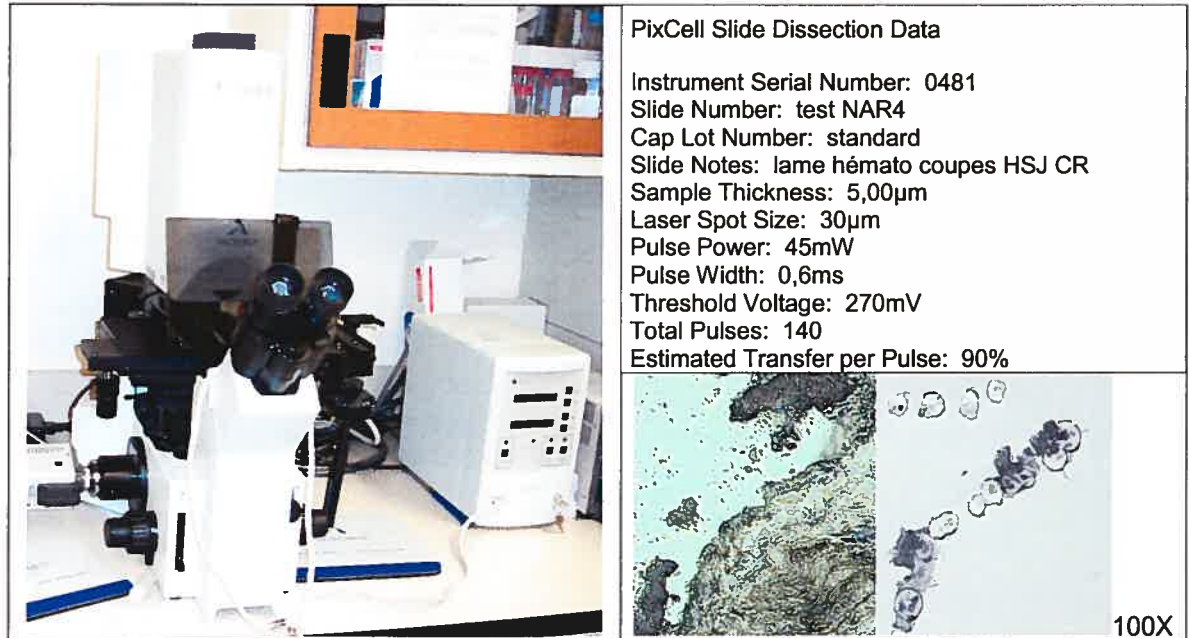
30 sec	Dégel contre le dos de la main
30 sec	ETOH 70%
30 sec	eau nanopure
30 sec	Hématoxyline 50% (dans dH ₂ O RF)
30 sec	eau nanopure (<u>changée après chaque lame</u>)
30 sec	ETOH 70%
30 sec	ETOH 95%
30 sec	ETOH 100% (<u>neuf à chaque fois</u>)
5 min	Xylène
5 min	Xylène
20 min	Séchage à l'air libre

Microdissection par capture au laser

L'appareil PixCell II de Arcturus est illustré à la Figure 40. Le microscope équipé d'un laser est relié à un ordinateur équipé du logiciel Arcturus 2000 (non montré), ainsi qu'à un module de contrôle du laser. L'ordinateur et le logiciel Arcturus 2000 servent d'interface de travail, permettant la sauvegarde des informations numériques et visuelles propres à chaque séance.

Brièvement, la coupe à microdisséquer était solidement maintenue sur la platine du microscope par aspiration. Le capuchon avec film thermoplastique (Capsure, Arcturus, Mountain View, CA) y était déposé à l'aide d'un bras mécanique. Le diamètre, l'intensité et la durée du faisceau laser étaient adaptés aux variations de la position du film thermoplastique par rapport à la surface du tissu. Une fois les cellules enrobées par le film, le capuchon était soulevé à la verticale avec le bras mécanique; le repositionnement du capuchon sur une lame de verre vierge permettait d'examiner le résultat de la capture, mais aussi d'inspecter le film au cours des nettoyages subséquents du matériel prélevé. Le nettoyage du matériel microdisséqué à l'aide de papiers Post-It™ (3M, St.-Paul, MN) - recommandé par le Dr Claire Landry - a permis d'augmenter considérablement le degré de pureté de nos échantillons. Cette précision n'est pas triviale, l'élimination des débris indésirables se faisant toujours au risque de perdre le matériel d'intérêt (fragilité du film thermoplastique, perte de cellules ciblées incomplètement enrobées).

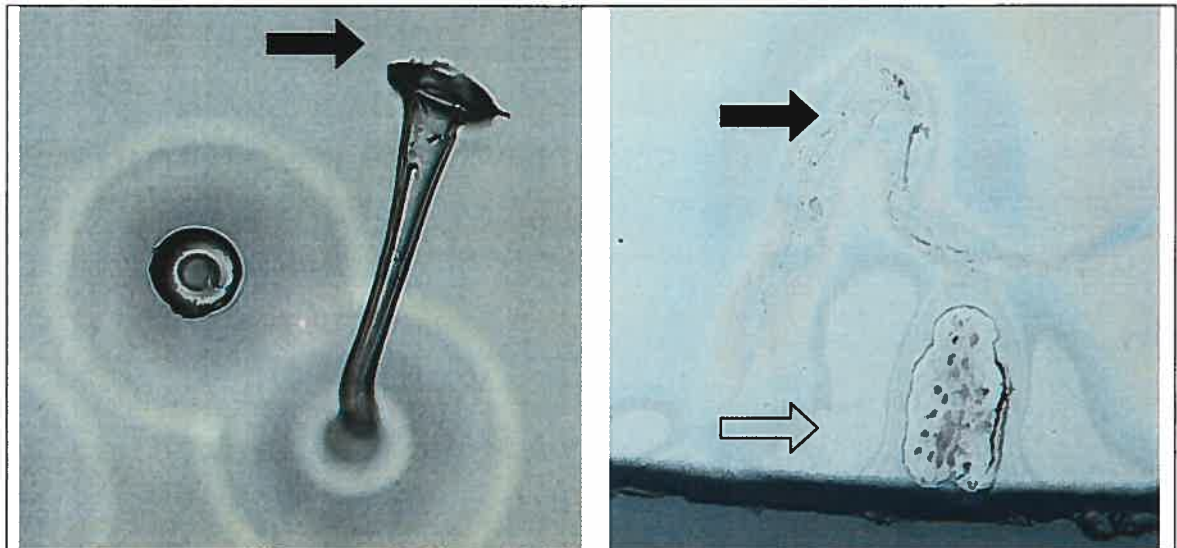
Figure 40 Microdissection sur le PixCell II



Appareil PixCell II (Arcturus) et exemples de documentation permise par le système.

Le principal obstacle rencontré était une distance film-tissu excessive causée par l'humidité, la présence de plis dans la coupe, ou par la dénivellation du film en périphérie des capuchons (Figure 41).

Figure 41 Manifestations d'une distance film-tissu excessive en microdissection



À gauche : aucun matériel au bout de longs entonnoirs, le film figeant sans enrober les cellules visées (flèche), 100X; à droite : perte au nettoyage de cellules capturées au bord des capuchons, les cellules y étant incomplètement emprisonnées à cause de dénivellations locales du film (flèche pleine), ou emportées lors de déchirements, même minimes, du film (flèche vide), 40X.

ANNEXE VI

TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLÉCULAIRE

Tel que mentionné dans la section Matériel et méthodes, la plupart des techniques décrites dans cette annexe résultent de notre adaptation de protocoles développés par le Dr Claire Landry ou fournis par les fabricants des réactifs utilisés.

Réaction de transcription inverse (RT)

Le protocole suivant permet l'extraction de l'ARN total d'échantillons de moins de 5000 cellules/équ-cell. Il fait appel au kit Sensiscript Reverse Transcriptase de Qiagen (Valencia, CA). Un tube témoin contenant de l'eau RF était inclus pour chaque manipulation (contrôle de qualité de la technique de RT à l'étape de PCR). Après une incubation de 60 min à 37°C, les ADNc (ou l'eau RT) sont gardés sur glace pour procéder immédiatement à l'étape de PCR - ou rangés à -80°C.

Tableau XX Composition du mélange de RT

	µl/tube
Eau RF	7,1
Tampon 10X (Sensiscript Reverse Transcriptase Buffer, Qiagen)	2
Solution de déoxynucléotides, 5mM (Qiagen)	2
RNAsine*, 10U/µl (Amersham Pharmacia Biotech Inc., Arlington Heights, IL)	1
Amorce poly-T, 50µM (AlphaDNA, Montréal, QC)	0,4
Enzyme Sensiscript Reverse Transcriptase (Qiagen)	1
Volume total de RT	20
Volume du mélange de RT	13,5
Volume d'ARN ou d'eau RF	6,5

* La RNAsine, obtenue commercialement à 30 U/µl, est dilué à l'aide de tampon 1X, lui-même dilué avec de l'eau RF.

Réaction de polymérase en chaîne (PCR)

Nos PCR ont été réalisées à l'aide du kit Taq DNA Polymerase d'Invitrogen (Burlington, ON), sur un appareil Biometra T3 Thermocycler (Biometra, Göttingen, Allemagne). Un contrôle positif (ADNc de coupes de peau) et un contrôle négatif (eau de l'étape de RT) étaient inclus pour chaque manipulation, ainsi qu'un contrôle de spécificité de microdissection (type cellulaire réagissant pour la cible-contrôle mais non pour l'entité à l'étude).

Tel que mentionné dans le corps de la thèse, nous avons ciblé les ADN complémentaires de la KRT14, de la β 2M et de la γ ACT. Le Tableau XXI détaille la composition de notre mélange standard de PCR. Nous avons élaboré *de novo* les amorces utilisées pour cibler l'ADNc de KRT14 de nos échantillons; pour ce faire, nous avons consulté le site internet <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/LocusLink> et fait appel à deux logiciels : le Gene Runner version 3.05 (Hastings Software Inc., Hastings, NY) et le BioEdit Sequence Alignment Editor version 5.0.9⁴⁸⁷ pour Windows 98 (Microsoft Corporation, Redmond, WA). Le Tableau XXII détaille les conditions de nos PCR sur le Biometra T3 Thermocycler.

Tableau XXI Composition du mélange de base de PCR

	μ l/tube
Eau RF	8,625
Tampon 10X (Taq DNA Polymerase Buffer, Invitrogen)	2,5
MgCl ₂ , 50mM (Qiagen)	0,75
Solution de déoxynucléotides, 5mM (Qiagen)	2
Amorce sens, 20 μ M (Alpha-DNA)	1
Amorce anti-sens, 20 μ M (Alpha-DNA)	1
Enzyme Taq DNA Polymerase (Invitrogen)	1
Volume total de PCR	25
Volume du mélange de PCR	15
Volume d'ADNc ou d'eau RT	2
Volume d'eau RF (réduit de 1,25μl si ajout de DMSO 100%)	8

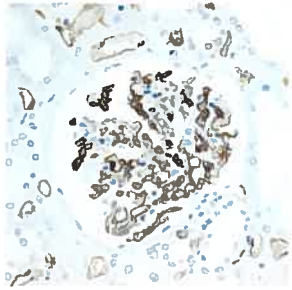
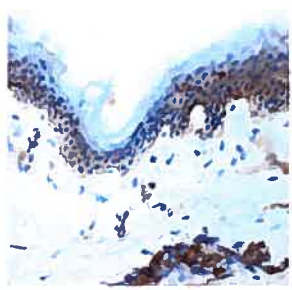
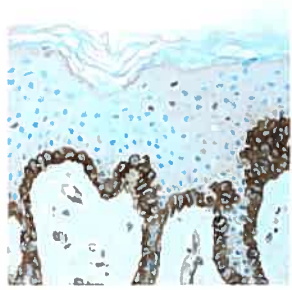

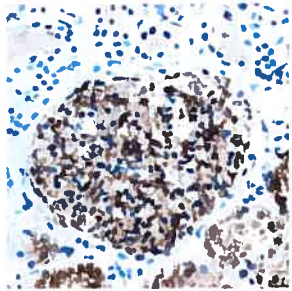
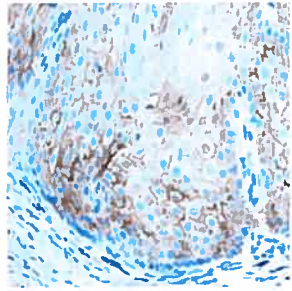
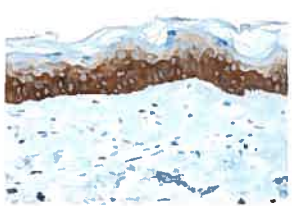
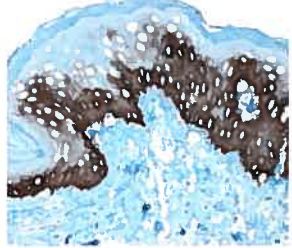
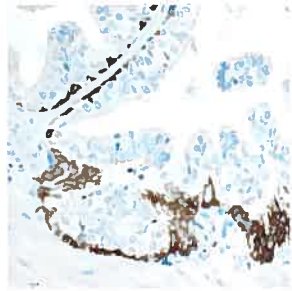
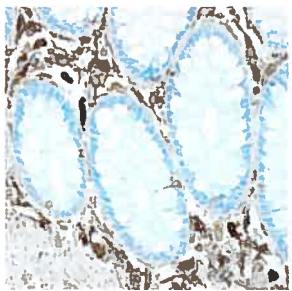
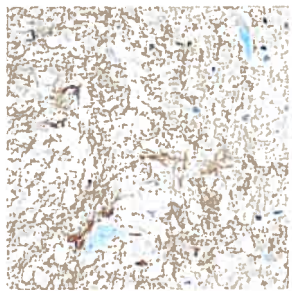
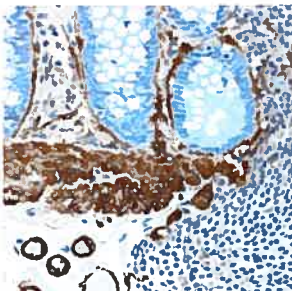
N.B. Toutes les amorces ont été synthétisées par Alpha-DNA (Montréal, QC) sauf celles pour la β 2M (Gibco BRL/Invitrogen, Gaithersburg, MD).

Tableau XXII Conditions et produits de PCR

Cibles	Mélange utilisé	Conditions de PCR	Caractéristiques du produit
KRT14	Standard	94°C, 4 min; amplification sur 42 cycles: 94°C, 1min/56°C, 1min/72°C, 1min; extension finale: 72°C, 15 min; attente à 4°C	trans-exonique de 295pb (positions 1340 à 1634 du transcrit du gène KRT14)
β2M	Standard	94°C, 4 min; amplification sur 42 cycles: 94°C, 1min/57°C, 1min/72°C, 1min; extension finale: 72°C, 15 min; attente à 4°C	trans-exonique de 409pb (positions du transcrit du gène B2M)
γACT	Standard	94°C, 4 min; amplification sur 42 cycles: 94°C, 1min/ 72°C, 1min; extension finale: 72°C, 10 min; attente à 4°C	trans-exonique de 612pb (positions 181 à 792 du transcrit du gène ACTG1)



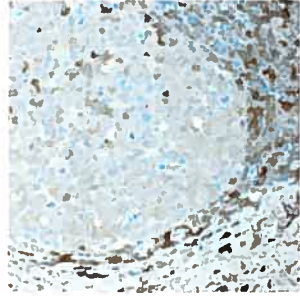
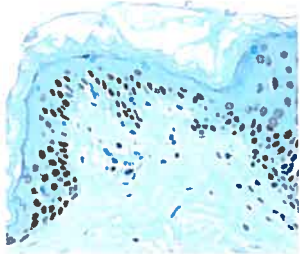

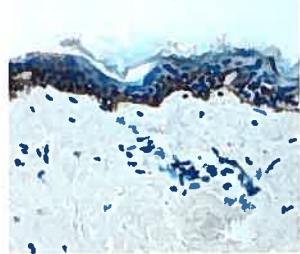
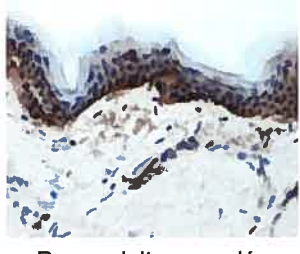
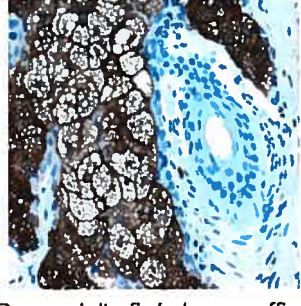
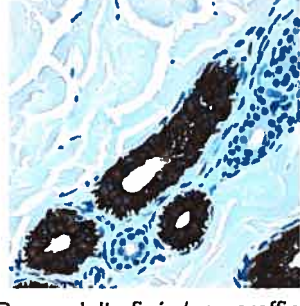
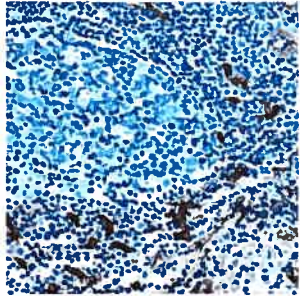
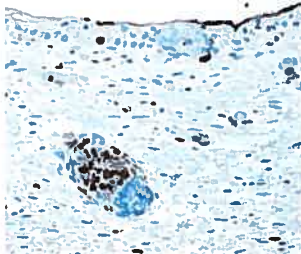
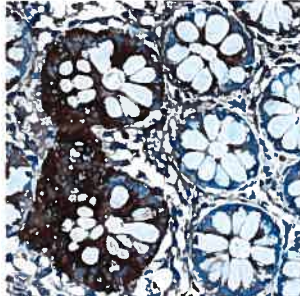
ANNEXE VII

Figure 42 Résultats dans nos contrôles positifs d'immunohistochimie (première partie)

<p>67LR</p>  <p>Rein fixé/en paraffine</p>	<p>$\alpha 6$</p>  <p>Peau adulte congelée</p>	<p>$\beta 1$</p>  <p>Peau adulte fixée/en paraffine</p>
<p>$\beta 4$</p>  <p>Peau adulte congelée</p>	<p>CD10</p>  <p>Rein congelé</p>	<p>CD44v6</p>  <p>Oesophage fixé/en paraffine</p>
<p>KRT14</p>  <p>Peau adulte fixée/en paraffine</p>	<p>KRT14</p>  <p>Peau adulte fixée/en paraffine</p>	<p>KRT17</p>  <p>Prostate fixée/en paraffine</p>
<p>VIM</p>  <p>Côlon fixé/en paraffine</p>	<p>GFAP</p>  <p>Moelle épinière fixée/en paraffine</p>	<p>αSMA</p>  <p>Côlon fixé/en paraffine</p>

Hématoxyline; 400X.

Figure 42 Résultats dans nos contrôles positifs d'immunohistochimie (deuxième partie)

<p style="text-align: center;">CNN1</p>  <p style="text-align: center;">Sein fixé/en paraffine</p>	<p style="text-align: center;">S100β</p>  <p style="text-align: center;">Moelle épinière fixée/en paraffine</p>	<p style="text-align: center;">S100A4</p>  <p style="text-align: center;">Amygdale fixée/en paraffine</p>
<p style="text-align: center;">p63</p>  <p style="text-align: center;">Peau adulte fixée/en paraffine</p>	<p style="text-align: center;">CollIV</p>  <p style="text-align: center;">Peau adulte fixée/en paraffine</p>	<p style="text-align: center;">CollVII</p>  <p style="text-align: center;">Peau adulte congelée</p>
<p style="text-align: center;">LN5</p>  <p style="text-align: center;">Peau adulte congelée</p>	<p style="text-align: center;">EMA</p>  <p style="text-align: center;">Peau adulte fixée/en paraffine</p>	<p style="text-align: center;">KRT19</p>  <p style="text-align: center;">Peau adulte fixée/en paraffine</p>
<p style="text-align: center;">CD34</p>  <p style="text-align: center;">Amygdale fixée/en paraffine</p>	<p style="text-align: center;">Ki67</p>  <p style="text-align: center;">Peau foetale fixée/en paraffine</p>	<p style="text-align: center;">CEA</p>  <p style="text-align: center;">Côlon fixé/en paraffine</p>

Hématoxyline; 400X.

ANNEXE VIII

SOMMAIRE D'ANALYSE DES VARIATIONS COMPARTIMENTALES DE L'IMMUNOPHÉNOTYPE MYOÉPITHÉLIAL DANS LE SEIN NORMAL

Les données d'IHC analysées dans cette annexe sont présentées aux Figures 13 à 15 et aux Tableaux XIV et XV de la section Résultats; elles sont schématisées au Tableau XVIII de la discussion.

67LR

Le 67LR est un récepteur homo-dimérique des laminines; il est assemblé dans le cytoplasme, puis acheminé à la membrane cellulaire. Il s'associe à certaines intégrines, mais ne présente pas d'homologies avec elles. La démonstration d'un lien physique entre le 67LR et l'intégrine $\alpha 6\beta 4$ suggère qu'il agit comme stabilisateur de la liaison de cette intégrine aux laminines^{142,233,234}; sa contribution à la formation des hémidesmosomes a été soulevée. Une corrélation positive semble exister entre l'expression de 67LR et la différenciation cellulaire; un sous-groupe de carcinomes mammaires indifférenciés surexpriment cependant le 67LR. Couplée à la surexpression de laminines, elle devient en fait un facteur de pronostic particulièrement défavorable^{142,233,234}. La distribution de 67LR immunoréactif n'a pas encore été décrite dans le sein foetal; selon la littérature, elle est principalement myoépithéliale dans l'épithélium du sein adulte normal.

D'après nos données d'IHC, les cellules épithéliales basales du sein foetal sont négatives pour le 67LR. Dans le sein adulte normal, l'intensité du marquage pour le 67LR décroît distalement; les réactions sont tantôt cytoplasmiques, tantôt membranaires (polarisation basale fréquente) dans les CMEM de CE et de TDLU.

Par conséquent : une stabilisation de liens «intégrines – laminines» par le 67LR semble peu probable dans le sein foetal; le 67LR pourrait par contre stabiliser de telles associations dans le sein adulte. D'après le gradient d'intensité observé pour le 67LR chez l'adulte, les CMEM des TDLU pourraient démontrer un potentiel prolifératif plus élevé et un degré de différenciation moindre que les CMEM de CE.

Sous-unités d'intégrines $\alpha 6$, $\beta 1$ et $\beta 4$

Les intégrines sont des récepteurs hétéro-dimériques de laminines. La nature exacte de leurs sous-unités α et β leur confère des propriétés distinctes⁴⁸⁸. Les intégrines $\alpha 6\beta 1$ et $\alpha 6\beta 4$ participent à l'établissement et au maintien d'interactions épithélio-stromales cruciales de façon similaire mais distincte^{489,490}; leurs implications diffèrent, notamment, vis-à-vis de l'acquisition de résistance cellulaire à l'apoptose^{50,392,491} et de la formation/maturation des hémidesmosomes⁴⁰. Une corrélation positive existe entre l'expression de l' $\alpha 6$, la $\beta 1$ et la $\beta 4$ et la différenciation cellulaire; les phénomènes de prolifération physiologique et pathologique entraînent plutôt une baisse de leur expression²³⁷. Leurs niveaux d'expression sont toutefois maintenus ou accrus dans les cellules de certains carcinomes de haut grade⁴⁹². Dans le sein, les surexpressions d' $\alpha 6$, de $\beta 1$ et/ou de $\beta 4$ sont associées à de mauvais pronostics, en particulier lorsqu'elles coïncident avec une production de laminines par les cellules cancéreuses^{127,137,179,236}; ce comportement plus agressif résulte possiblement de ce que l'intégrine $\alpha 6\beta 4$ peut favoriser l'immobilisation cellulaire lorsque couplée à des FI, mais favoriser la migration cellulaire lorsqu'associée au réseau actinien du cytosquelette^{493,494}. La distribution mammaire de ces trois sous-unités a été étudiée par IHC chez le fœtus humain, mais dans les cellules basales de structures correspondant plus vraisemblablement à des mamelons immatures qu'à des glandes mammaires fœtales¹⁷³. Elles sont toutes trois présentes dans l'épithélium du sein adulte au repos^{127,137,179,218} ($\alpha 6$ et $\beta 1$: distribution préférentiellement myoépithéliale; $\beta 4$: distribution presque exclusivement myoépithéliale).

Les cellules basales de nos spécimens de sein foetal sont extensivement positives pour l' $\alpha 6$, la $\beta 1$ et la $\beta 4$, l'intensité de la réaction pour la $\beta 1$ chutant à peine dans certaines ePS. Le compartiment central du BP et des PS n'est que peu ou pas marqué. Dans le sein adulte normal au repos, l'intensité des marquages obtenus pour ces trois sous-unités d'intégrine décroît distalement, plus spécialement dans de petits éléments de TDLU dépourvus de lumières. La polarisation basale du marquage est plus nette au niveau des CE de la glande.

Par conséquent : la majorité des cellules basales du sein foetal présenteraient un fort potentiel de liaison à l'ECM. Selon nos données, en fonction de la littérature, ces cellules

foetales (hormis certaines cellules basales d'ePS) seraient plus activement impliquées dans un processus de différenciation que de prolifération. Dans le sein adulte, les CMEM de CE, de CT et d'acini aux lumières bien définies seraient relativement bien différenciées ou en voie de l'être; en revanche, les cellules moins différenciées de petites structures solides de TDLU pourraient être engagées dans un processus de prolifération cellulaire. La distribution préférentiellement myoépithéliale de ces marquages et la polarisation basale des réactions refléteraient l'implication de l' $\alpha 6$, de la $\beta 1$ et de la $\beta 4$ dans la formation d'adhésions cellule-ECM – et possiblement d'hémidesmosomes – dans le sein adulte comme dans le sein foetal.

CD10

Le CD10 (CALLA) est une endopeptidase transmembranaire; par son domaine catalytique extra-cellulaire, il active ou initie la dégradation de messagers peptidiques (ex. inactivation de l'oxytocine). D'abord décrit à la surface de progéniteurs lymphoïdes, le CD10 est exprimé par d'autres types cellulaires²⁶⁴, notamment par la CMEM humaine²⁶⁵. Avant nos travaux¹⁷², la distribution du CD10 n'avait pas été décrite dans le sein foetal. Dans le sein adulte normal, sa distribution est exclusivement myoépithéliale^{131,298}. Le CD10 est typiquement distribué le long des membranes apico-latérales des CMEM²³⁸, d'où l'hypothèse qu'il participe à l'élaboration d'un filtre physiologique entre les compartiments luminaux et myoépithéliaux du sein normal⁴⁹⁵. L'expression de CD10 est vraisemblablement associée à la modulation de la croissance et de la différenciation épithéliale, mais les impacts de son expression et leurs mécanismes restent incertains. La culture de cellules CD10(+) du sein adulte, isolées par FACS^{357,358}, confirme que certaines d'entre elles sont aptes à proliférer²³⁸.

D'après nos données d'IHC, les cellules basales des PS foetales sont positives pour le CD10; l'intensité du marquage décroît légèrement à l'extrémité de certaines ePS. Les cellules des BP ne sont pas marquées, à l'exception des agglomérations de cellules supra-basales retrouvées à l'origine des PS. La majorité des CMEM des CE et TDLU du sein adulte normal au repos sont uniformément positives pour le CD10; ce marquage est peu perceptible, par contre, dans de petits éléments de TDLU dépourvus de lumières.

Par conséquent : les cellules du sein foetal qui se retrouvent en position basale amorceraient rapidement la création d'un filtre physiologique les séparant du compartiment épithélial central. Contrairement aux cellules centrales de PB et de PS, les cellules supra-basales agglomérées à l'origine de PS, dans le BP, sont CD10(+); il se peut donc que le CD10 soit utilisé dans différents contextes nécessitant l'établissement de filtres physiologiques. Le marquage uniforme observé dans le sein adulte suggère qu'un filtre physiologique continu sépare les CLUM et CMEM dans les CE et TDLU du sein adulte normal – à l'exception de quelques foyers distaux. Dans les TDLU de l'adulte et les ePS foetales, des disparitions focales du marquage refléteraient une perte fonctionnelle - et non seulement morphologique - de la distinction entre les compartiments central et basal de l'épithélium du sein adulte normal au repos. Étant précocement mais non exclusivement retrouvé dans les cellules basales du sein foetal, le CD10 serait dès lors un marqueur de comportement plutôt que de type cellulaire.

CD44v6

Le CD44 est un récepteur de l'acide hyaluronique; les CD44v, des variantes plus longues de cette protéine trans-membranaire, résultent d'une conservation d'exons autrement éliminés à l'épissage⁴⁹⁶. L'appellation «CD44v6» désigne l'ensemble des variantes du CD44 qui conservent l'exon v6; à l'instar des autres exons variants, l'exon v6 encode une portion de domaine extra-cellulaire excédentaire qui confère des propriétés légèrement distinctes au récepteur. Le CD44 et ses variantes sont impliqués dans les phénomènes de lymphopoïèse, d'activation et de migration dirigée des lymphocytes. Peu comprises en dehors du système hématopoïétique, leurs fonctions impliqueraient souvent la perte de leur domaine extra-cellulaire (phénomène de *shedding*²⁰⁷). Les carcinomes de haut grade de différents organes surexpriment fréquemment le CD44v6; dans le sein, le CD44v6 a d'ailleurs été envisagé comme marqueur de pronostic défavorable^{239,240,436}. Cette avenue a été délaissée, cet antigène étant retrouvé – bien que de façon hétérogène – dans le sein normal⁴⁹⁶. Une corrélation positive existe entre l'expression de CD44v6 et la prolifération épithéliale physiologique; la différenciation cellulaire occasionne des modulations de cette expression⁴⁹⁷. La distribution du CD44v6 immunoréactif n'a pas été décrite dans le sein foetal. Selon la littérature, elle est surtout myoépithéliale et peu uniforme dans l'épithélium du sein adulte normal au repos.

Certaines cellules basales de nos spécimens de sein foetal réagissent pour le CD44v6 : cette réaction est plus faible dans les cellules basales que dans les cellules centrales et supra-basales des BP. Elle devient peu perceptible à nulle dans les PS. Dans le sein adulte normal, le marquage pour le CD44v6 est imperceptible à nul dans la plupart des CMEM; de rares CMEM de TDLU affichent un cytoplasme et des membranes faiblement positives.

Par conséquent : les cellules supra-basales agglomérées à l'origine des PS présenteraient un potentiel prolifératif supérieur à celui de la plupart des cellules épithéliales du sein foetal; le potentiel prolifératif de ces dernières ne serait pas nul. Des mécanismes utilisés par les cellules du système de défense seraient exploités par les structures mammaires foetales et adultes au moment de leur croissance. Il n'existe pas encore d'anticorps spécifiques pour les différents CD44 porteurs de l'exon v6; ceux-ci faciliteraient l'analyse de leurs distributions et fonctions respectives au niveau mammaire.

KRT14

La KRT14 est une kératine acide de bas poids moléculaire (50kD). Sa distribution physiologique semble strictement épithéliale (ce qui n'est pas le cas pour les kératines 8, 18 et 19, par exemple^{306,335}). La synthèse de KRT14 est associée au phénomène de stratification épithéliale^{277,308,331,498}. La nature de cette association reste toutefois incertaine (cause ou effet); en effet, la KRT14 est focalement absente de cellules basales d'épithéliums complexes et parfois exprimée par des cellules non basales de ces mêmes épithéliums (ex. dans les poils¹⁰⁷). Sa production serait modulée au niveau traductionnel. Cette composante cytoplasmique des hémidesmosomes se lie à la queue cytoplasmique de la $\beta 4$. Les raisons de son expression par des cellules épithéliales non basales, même en l'absence de lésions évidentes, demeurent obscures. La KRT14 a été ciblée par IHC sur des coupes de tissus foetaux humains par une équipe de recherche, mais dans des structures correspondant plus vraisemblablement à des mamelons immatures qu'à des glandes mammaires foetales humaines¹⁶⁹ (cette remarque et nos résultats préliminaires concernant la distribution foetale mammaire de KRT14 immunoréactive ont fait l'objet d'une publication¹⁷²). Dans le sein adulte au repos, la distribution de la KRT14 est décrite comme presque exclusivement myoépithéliale (réaction occasionnelle de CLUM) mais hétérogène; la majorité des cellules de la plupart des carcinomes du sein sont négatives pour cette kératine¹. Des cellules

cancéreuses KRT14+ seraient par contre présentes dans une proportion non négligeable de carcinomes aux pronostics peu favorables (9% à 18% de tous les carcinomes infiltrants et plus de 50% de ceux qui sont négatifs pour les récepteurs oestrogéniques^{201,242}).

Dans nos spécimens de sein foetal, les cellules centrales des tPS réagissent fortement pour la KRT14 (réaction pan-cytoplasmique aussi observée dans les cellules supra-basales de BP agglomérées à l'origine de PS). L'intensité du marquage chute au niveau de la jonction tPS-ePS, les cellules centrales et basales d'ePS présentant un cytoplasme à peine positif ou négatif. Dans les CMEM du sein adulte au repos, l'intensité du marquage pour la KRT14 chute distalement. La réaction est peu perceptible à nulle dans les acini de la majorité des TDLU. Les portions distales du sein renferment davantage de cellules non basales isolées fortement positives pour la KRT14.

Par conséquent : les cellules agglomérées à l'origine des PS, les cellules centrales de tPS et les cellules basales de tPS foetales seraient capables de stratification; certaines cellules d'ePS seraient en voie d'acquérir cette capacité. La polarisation de la réaction suggère une association de ce programme à un processus de différenciation dans le cas des cellules basales de tPS et de certaines cellules d'ePS. Une distribution pan-cytoplasmique de KRT14 identifierait plutôt des cellules capables de tolérer une superposition cellulaire sans être engagées dans un programme de différenciation épithéliale basale. Chez l'adulte, les CMEM de CE posséderaient une capacité de stratification, étant visiblement engagées dans un programme de différenciation basale; les CMEM de TDLU semblent fonctionnellement distinctes à ce niveau. Parce que des CMEM de TDLU négatives pour la KRT14 font partie de structures épithéliales clairement bi-couches, la présence de KRT14 immunoréactive serait un effet mais non la cause de la stratification physiologique de cellules épithéliales (contextes physiologiques impliquant la stratification de cellules épithéliales négatives pour la KRT14).

KRT17

La KRT17 est une kératine acide de bas poids moléculaire (46kD). Sa distribution semble strictement épithéliale (voir la remarque concernant la KRT14, ci-dessus). Elle est exprimée par les cellules d'épithéliums simples et les cellules basales des épithéliums stratifiés³⁰⁵ - dont celui du sein. L'expression de KRT17 reflète une capacité de

prolifération cellulaire épithéliale^{331,498} que le marqueur de prolifération Ki67 ne révèle parfois pas^{132,499}. La nature de l'association entre l'expression de KRT17 et la prolifération cellulaire (cause ou effet) reste incertaine. Dans le sein adulte au repos, par IHC, sa distribution principalement myoépithéliale est à peine moins étendue que celle de la KRT14^{125,132,305}. La signification de sa présence dans de rares CLUM (phénomène plus fréquent dans les portions distales de la glande¹²⁶) n'est pas connue. Un plus grand nombre de carcinomes réagissent plus extensivement pour la KRT17 que pour la KRT14 (ex. 31% de carcinomes invasifs positifs pour la KRT17 versus 9% pour la KRT14¹³²). Ces cellules cancéreuses positives pour la KRT17 seraient plus souvent observées à la périphérie qu'au centre des fronts d'invasion de carcinomes de formes communes¹²⁵. La distribution de la KRT17 n'avait pas été décrite dans le sein foetal avant nos travaux¹⁷².

Les cellules centrales et basales des tPS sont extensivement positives pour la KRT17 (tout comme celles des BP); les cellules des ePS ne sont que peu ou pas positives pour cette kératine. Dans le sein adulte normal, la distribution de la kRT17 immunoréactive est strictement myoépithéliale et plus strictement limitée aux CE et CT que celle de la KRT14.

Par conséquent : la majorité des cellules des tPS – et des BP – du sein foetal et des CMEM de CE et de CT du sein adulte normal présenteraient un potentiel de prolifération non nul.

VIM

La VIM est un FI qui présente une distribution corporelle très vaste, sans pourtant être ubiquitaire. Initialement perçue comme un marqueur mésenchymateux, la VIM est en fait exprimée de manière précoce et transitoire pendant la différenciation des cellules épithéliales²⁷⁷. De ce fait, une coexpression de VIM et de kératines signale une conservation de potentiel prolifératif (c'est-à-dire l'adoption d'un état de différenciation non terminale). La coexpression de VIM et de kératines basales est pourtant retrouvée chez des cellules épithéliales considérées comme terminalement différenciées : les CME. Sa contribution à l'architecture cellulaire semble très complexe. Li, Tolstonog et coll.^{500,501,502,503,504} ont récemment démontré que la VIM peut se lier à des composantes de la matrice nucléaire et à des séquences précises du génôme. Ce FI participerait ainsi à des processus de réplication, de transcription, de recombinaison et de réparation d'ADN. Tel

que mentionné pour la KRT14, la VIM a été ciblée par IHC sur des coupes de tissus foetaux humains par une équipe de recherche, mais dans des structures correspondant plus vraisemblablement à des mamelons immatures qu'à des glandes mammaires foetales humaines¹⁶⁹ (nos résultats préliminaires concernant la distribution foetale mammaire de VIM immunoréactive ont fait l'objet d'une publication¹⁷²). Dans le sein adulte normal, la distribution *épithéliale* de la VIM est principalement myoépithéliale (nombre restreint mais constant de cellules non basales fortement positives). En IHC, les CMEM sont typiquement difficiles à distinguer des cellules stromales mammaires fortement marquées¹.

Dans le sein foetal, le cytoplasme péri-nucléaire des cellules basales de PS est fortement positif pour la VIM; la réaction est légèrement plus prononcée dans les ePS que dans les tPS. Les cellules centrales des PS sont faiblement marquées. La plupart des cellules des BP sont négatives pour la VIM, à l'exception de rares cellules isolées (réaction pan-cytoplasmique forte impliquant des cellules supra-basales et centrales allongées); les noyaux de cellules situées à l'origine de PS naissantes sont modérément marqués, comme ceux des progéniteurs épidermiques retrouvés dans les renflements de poils environnants. Dans le sein adulte, les CMEM de CE réagissent moins souvent et moins fortement pour la VIM que les CMEM de TDLU. L'intensité du marquage présente des variations inter- et intra-TDLU. Des cellules non basales isolées sont fortement marquées; elles sont plus nombreuses dans les portions distales de la glande.

Par conséquent: les portions distales du sein foetal et du sein adulte au repos comporteraient une forte proportion de cellules non terminalement différenciées, ce que semble d'ailleurs confirmer nos résultats d'IHC pour le Ki67.

α SMA

Cette isoforme de l'actine du muscle lisse est notamment exprimée par les cellules de muscle lisse, les péricytes, les myofibroblastes et les CME de divers organes. Dans l'épithélium mammaire, son expression exclusivement myoépithéliale est à l'origine de l'attribution d'un rôle de «contraction pendant la lactation» à la CMEM. Les débats entourant cette fonction ont été mentionnés dans l'introduction. L' α SMA peut être localisée dans les cellules basales du sein foetal et ce, dès le deuxième trimestre gestationnel¹⁶³. Dans l'épithélium du sein adulte au repos, l' α SMA peut être localisée par IHC dans la majorité

des CMEM des CE et TDLU du sein adulte au repos. Certaines CMEM (identifiées par MO et IHC à l'aide de batteries anti-CMEM) ne réagiraient par contre pas avec ce marqueur^{282,505}.

Dans la région mammaire foetale, la distribution épithéliale de l' α SMA immunoréactive varie selon l'âge de nos spécimens. Les seules cellules épithéliales positives se trouvent à la base des portions distales de PS qui présentent une extrémité bulbeuse dans la couche la plus profonde du mésenchyme de soutien. La réaction est faible à modérée dans les cellules basales de la jonction tPS-ePS, chutant rapidement en amont et en aval de celle-ci. Dans le sein adulte normal, l'intensité du marquage pour l' α SMA ne présente pas de gradient clair dans le compartiment myoépithélial; toutefois, de rares cellules basales de TDLU ne sont que très faiblement ou non marquées pour l' α SMA. Les cellules basales/myoépithéliales vacuolées de TDLU réagissent différemment pour l' α SMA; certaines d'entre elles sont α SMA(-) mais p63(+).

Par conséquent : l'adoption d'une position basale ne s'accompagnerait pas systématiquement d'une immunoréactivité pour l' α SMA dans l'épithélium mammaire humain. Ce phénomène serait fréquent dans le sein foetal, plus rare et restreint aux TDLU dans le sein adulte au repos.

CNN1

La calponine est une composante du réseau cytosquelettique actinien; les niveaux intra-cellulaires de calcium modulent ses interactions avec les filaments d'actine⁵⁰⁶. Elle régule la contraction de cellules musculaires lisses (ex. inhibition⁵⁰⁷), son expression étant un événement relativement tardif de leur différenciation. La CNN1 peut être localisée par IHC dans l'épithélium du sein adulte au repos : sa distribution y est spécifiquement myoépithéliale^{1,135}, mais ses fonctions restent incertaines. Sa capacité de stabilisation du réseau actinien permettrait à la CNN1 de limiter la migration de cellules cancéreuses dans le sein pathologique⁵⁰⁸.

Cet antigène n'a pas été ciblé dans nos échantillons de sein foetal (ajout récent de cette cible). Les CMEM de CE du sein adulte au repos sont inégalement positives pour la CNN1; l'intensité du marquage chute au niveau des TDLU.

Par conséquent : les CMEM des CE et des TDLU pourraient différer quant à leur capacité de moduler les mouvements de leur réseau actinien.

S100 β

Les protéines S100 sont de petites protéines acides capables de lier le calcium; elles sont distribuées dans le noyau et/ou le cytoplasme de nombreux types cellulaires ainsi que dans certains espaces extra-cellulaires⁵⁰⁹. Elles participent à de nombreux processus cellulaires (ex. assemblage du cytosquelette, contraction, différenciation, progression du cycle cellulaire^{510,511}). Les protubérances de lésions mammaires présentant une forte activité de prolifération sont intensément marquées pour la S100³⁵³. La S100 β est un homodimère de cette famille. Présente dans divers types cellulaires, ses fonctions restent incertaines; son association au p53 pourrait moduler les effets de celui-ci vis-à-vis de l'apoptose^{512,513}. Sa distribution n'avait pas été décrite dans le sein foetal avant nos travaux¹⁷². Elle peut être localisée par IHC dans l'épithélium du sein adulte normal au repos¹²⁹; sa distribution y est principalement myoépithéliale mais inégale.

Dans le sein foetal, le marquage pour la S100 β est limité aux cellules basales de la jonction tPS-ePS et des ePS. Chez l'adulte, l'intensité du marquage augmente vers la périphérie de la glande : les CMEM des CE ne sont que peu ou pas marquées, une proportion plus ou moins importante de CMEM présentant un noyau positif pour la S100 β .

Par conséquent : l'adoption d'une position basale s'accompagnerait parfois d'une immunoréactivité pour la S100 β dans l'épithélium mammaire normal – foetal ou adulte. L'acquisition de S100 β immunoréactive pourrait être un événement transitoire précoce pendant l'adoption d'un phénotype épithélial basal¹⁷².

S100A4

Cette protéine aux multiples surnoms (réf. Tableau X), de distribution tant épithéliale que mésenchymateuse, serait exprimée par des cellules effectuant une «transition épithéliale-à-mésenchymateuse»⁵¹⁴. Ce processus, important au cours de l'organogenèse normale *in utero*, pourrait l'être également chez l'adulte : un nombre croissant de publications indiquent que la genèse de stromas lésionnels peut impliquer une «transition épithéliale-à-mésenchymateuse» (EMT; angl. *epithelial-mesenchymal*

transition) dans divers organes matures dont le sein. En effet, le stroma de certains cancers du sein contient des cellules d'allure fibroblastique positives pour la S100A4 d'origine vraisemblablement épithéliale^{359,413,414}. La fréquence de ce phénomène demeure incertaine en pathologie mammaire⁴¹³ (possibilité d'une contribution physiologique rarement envisagée⁴¹⁹). La distribution de S100A4 n'a pas encore été documentée dans le sein foetal. Dans l'épithélium du sein adulte au repos, la distribution de S100A4 immunoréactive est principalement myoépithéliale, mais irrégulière⁴²².

La majorité des cellules des BP et PS de nos spécimens de sein foetal sont négatives pour la S100A4. De rares cellules épithéliales S100A4(+), très allongées, sont intercalées entre les cellules supra-basales/centrales et les cellules basales du BP (à proximité de l'origine de PS) et dans certaines ePS. Dans le sein adulte normal, les CMEM de TDLU réagissent plus fortement et en plus grand nombre pour la S100A4 que les CMEM de CE. La frontière entre les CMEM S100A4(+) et les fibroblastes délimitants est plus souvent floue dans les TDLU que dans les CE.

Par conséquent : une minorité de cellules du sein foetal pourraient être activement engagées dans un processus de transition épithélial-à-mésenchymateuse. Dans le sein adulte au repos, ce phénomène pourrait être plus fréquent, notamment dans les TDLU.

p63

Le p63 est crucial au cours de la morphogenèse des organes épithéliaux; fortement exprimé par les cellules basales des épithéliums matures, il est nécessaire à leur renouvellement. Présenté initialement comme un marqueur de cellules souches épithéliales, le p63 est depuis peu considéré comme un marqueur très précoce de l'acquisition d'une capacité de stratification par des cellules épithéliales²⁹¹; une publication récente suggère qu'il serait, de façon un peu déconcertante, à la fois l'un et l'autre⁵¹⁵. Les isoformes regroupées sous le terme «p63» ont des effets opposés sur les voies de signalisation qui impliquent son homologue, le p53 (isoformes). La distribution du p63 n'avait pas été décrite dans le sein foetal avant nos travaux¹⁷². La distribution du p63 immunoréactif est strictement myoépithéliale dans le sein au repos; des études récentes indiquent que ce marquage est nucléaire et présent dans la majorité des CMEM des CE et TDLU^{123,252,296,304}. Selon des publications antérieures, le p63 est une protéine trans-membranaire du réticulum

endoplasmique rugueux; sa distribution y était décrite comme péri-nucléaire^{516,517}, et non comme strictement nucléaire .

Dans le sein foetal, les cellules basales des tPS et des ePS réagissent de manière similaire pour le p63 : la plupart participent à des doublets cellulaires horizontaux générant des tandems de noyaux positif-négatif pour cet antigène. Les cellules centrales des PS demeurent négatives. De petits groupes de cellules basales sont négatives pour le p63 aux extrémités de PS naissantes, mais non de PS plus développées. Les cellules basales des flancs de PS naissantes sont, à l'inverse, presque toutes positives pour le p63 (absence focale de tandems nucléaires impliquant des noyaux négatifs). Dans le sein adulte, le compartiment myoépithélial des CE présente de nombreux doublets cellulaires occasionnant des tandems de noyaux positif-négatif pour le p63. Ces doublets sont horizontaux ou verticaux (dans ce dernier cas, le noyau positif du tandem occupe typiquement une position basale). Presque toutes les CMEM de CT présentent des noyaux fortement positifs pour le p63. Dans les acini de TDLU, le phénomène de vacuolisation basale est associé à une multiplication de tandems nucléaires; en fait, dans les TDLU d'échantillons de sein au repos prélevés en période lutéale tardive ou menstruelle, beaucoup de cellules vacuolées renferment plusieurs noyaux. La plupart de ces noyaux sont positifs pour le p63 dans les cellules basales/myoépithéliales vacuolées de CT. Au contraire, plus de 50% des noyaux de cellules basales/myoépithéliales vacuolées sont négatifs pour le p63 dans les acini. Dans un autre ordre d'idée, une faible réaction cytoplasmique positive est souvent associée aux noyaux des cellules p63(+) du sein foetal et adulte; par ailleurs, la distribution nucléaire du marquage est souvent inégale (ex. zone excentrique fortement positive dans un noyau autrement négatif, réaction limitée au pourtour nucléaire, etc.).

Par conséquent: au moins une cellule basale sur deux présenterait une capacité de stratification dans les PS développées de seins foetaux (ePS situées au niveau de la couche la plus profonde du mésenchyme de soutien). Dans les CE du sein adulte normal, au moins 75% des CMEM présenteraient une capacité de stratification. Cette proportion serait de presque 100% dans les CT et de plus de 50% dans les acini des TDLU. Certaines cellules basales/myoépithéliales vacuolées de TDLU affichent un noyau positif pour le p63 mais un cytoplasme négatif pour l' α SMA. Les capacités cellulaires de contraction et de stratification ne seraient donc pas systématiquement liées au niveau de l'épithélium du sein normal.

ANNEXE IX

ARTICLE PAR F. JOLICOEUR ET COLL., 2002

Déclaration des coauteurs

Étudiante : Francine Jolicoeur
 Programme : 3-512-1-0 Pathologie et biologie cellulaire (doctorat), option biologie du cancer

Auteurs : F. Jolicoeur
 T.A. Seemayer
 G. Gabbiani
 A. Robidoux
 L.A. Gaboury
 L.L. Oligny
 W. Schürch

Titre: Multifocal, nascent and invasive myoepithelial carcinoma (malignant myoepithelioma) of the breast. An immunohistochemical and ultrastructural study.

Revue: *International Journal of Surgical Pathology*
 Année: 2002
 Numéro: 10
 Volume: 4
 Pages: 281-291

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que Francine Jolicoeur inclut cet article dans sa thèse de doctorat qui a pour titre «Caractérisation de la cellule myoépithéliale du sein foetal, adulte normal et pathologique».

<u>T.A. Seemayer</u> Coauteur	<u>October 14, 2004</u> Date
<u>A. Robidoux</u> Coauteur	<u>13 oct 2004</u> Date
<u>GABBIANI G.</u> Coauteur	<u>25/09/2004</u> Date
<u>GABOURY, L.</u> Coauteur	<u>13/10/2004</u> Date
<u>OLIGNY, L.L.</u> Coauteur	<u>13 oct 2004</u> Date
<u>Schürch W.</u> Coauteur	<u>13.10.2004</u> Date

Multifocal, Nascent, and Invasive Myoepithelial Carcinoma (Malignant Myoepithelioma) of the Breast: An Immunohistochemical and Ultrastructural Study

Francine Jolicoeur, BSc,* Thomas A. Seemayer, MD, FRCPath,†
Giulio Gabbiani, MD, PhD,‡ André Robidoux, MD, FRCPC,§
Louis Gaboury, MD, PhD, FRCPC,*§ Luc L. Oligny, MSc, MD,*.**
and Walter Schürch, MD, FRCPC*§

This report describes the light microscopic (LM), immunohistochemical (IHC), and electron microscopic (EM) features of a multifocal, nascent, and invasive myoepithelial carcinoma of the breast. By LM, the spindle cells disclosed fibrillar acidophilic cytoplasm, mild nuclear atypia, and a low mitotic index. Myoepithelial differentiation was established through IHC (single- and double-labeling techniques) and EM: periductal and infiltrating spindle cells coexpressed total muscle actin, α -smooth muscle actin, vimentin, cytokeratin 14, and pankeratin, and their EM features were characteristic of myoepithelial cells, i.e., perinuclear tonofilaments, subplasmalemmal bundles of microfilaments with dense bodies, intermediate junctions, poorly developed desmosomes, pinocytic vesicles, and fragmented external lamina. No invasive epithelial cells disclosed luminal differentiation (by LM, IHC, EM), identifying, thus, this neoplasm as a pure spindle cell myoepithelial carcinoma of the breast.

Int J Surg Pathol 10(4):281-291, 2002

Key words: breast, myoepithelial carcinoma, malignant myoepithelioma, immunohistochemistry, transmission electron microscopy.

Neoplasms of the human mammary gland composed in part or exclusively of myoepithelial cells are uncommon [1]. Five types of mammary lesions composed predominantly or entirely of myoepithelial cells have been described [2]: adenoid cystic carcinoma, pleomorphic adenoma, multifocal myoepi-

theliosis, adenomyoepithelioma, and myoepithelial carcinoma (malignant myoepithelioma). Fewer than 10 well-documented cases of mammary myoepithelial carcinomas have been published [3-11]. In this report, a multifocal, nascent, and invasive spindle cell myoepithelial carcinoma of the breast is described by light microscopy (LM), immunohistochemistry (IHC), and transmission electron microscopy (EM). Myoepithelial differentiation was established by IHC (single- and double-labeling techniques on paraffin sections) and EM. The histology and the morphogenesis of myoepithelial carcinomas are discussed and differential diagnostic criteria of other comparable spindle cell tumors of the human mammary gland are presented.

From the *Université de Montréal, Montréal, Québec (Canada); †University of Nebraska Medical Center, Omaha, Nebraska (USA); ‡Centre Médical Universitaire, Genève (Suisse); §Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, Montréal, Québec (Canada); and **Hôpital Sainte-Justine, Montréal, Québec (Canada).

Reprint requests: Walter Schürch, MD, Département de Pathologie, Hôtel-Dieu, Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, 3840, rue Saint-Urbain, Montréal, Québec (Canada) H2W 1T8.

Case Report

A routine mammogram disclosed 2 stellate opacities containing microcalcifications in the left breast of a 62-year-old Caucasian woman. The patient was known to have fibrocystic changes in both breasts and was closely followed up because of a strong family history (mother and sister) of breast cancer. She had been treated prophylactically with raloxifen. The largest of the tumors was not apparent on a mammogram performed 1 year earlier (Fig. 1). She underwent partial mastectomy to remove the suspicious subareolar tumors.

The main tumor (1.8 × 1.2 × 1.8 cm) was firm and resembled a mesenchymal lesion because of a fascicular aspect. Histologically, the lesion had a multinodular configuration. The smaller lesion had a radiologic aspect similar to that of the main tumor, with numerous microcalcifications suggestive of malignancy. It corresponded, however, to fibrocystic disease with mild to florid, nonatypical ductal hyperplasia. Axillary lymph node dissection, performed later, disclosed no metastases in 18 lymph nodes. The patient underwent radiotherapy, and raloxifen administration was maintained. Seven months after surgery, no signs of local recurrence or distant metastases were apparent.

Materials and Methods

Tissue samples of the largest tumor were processed for LM, IHC, and EM. A smaller lesion was similarly processed for IHC.

Light Microscopy

Tissue samples for LM and IHC were fixed in a modified, 10% neutral buffered formaldehyde solution. Tissues were embedded in paraffin, cut at 3–5 μm and stained with Hematoxylin-Phloxin-Saffron (HPS).

Immunohistochemistry

Serial sections from the paraffin-embedded specimens were immunostained by means of an indirect immunoperoxidase technique (EnVision kit or LSAB2 peroxidase kit; DAKO, Carpinteria, CA, USA). Commercial antibodies for total muscle actin (HHF35, DAKO, Glostrup, Denmark; 1:250), α-smooth muscle actin (α-SMA) (1A4, DAKO; 1:100), alpha sarcomeric actin (Alpha-Sr-1, DAKO; 1:30), desmin (D33, DAKO; 1:50), vimentin (VIM3B4, American Research Products Inc., Belmont, MA, USA; 1:100 after enzymatic predigestion with pronase), epithelial membrane antigen (EMA) (E29, DAKO; 1:500), pancytokeratin (polyclonal

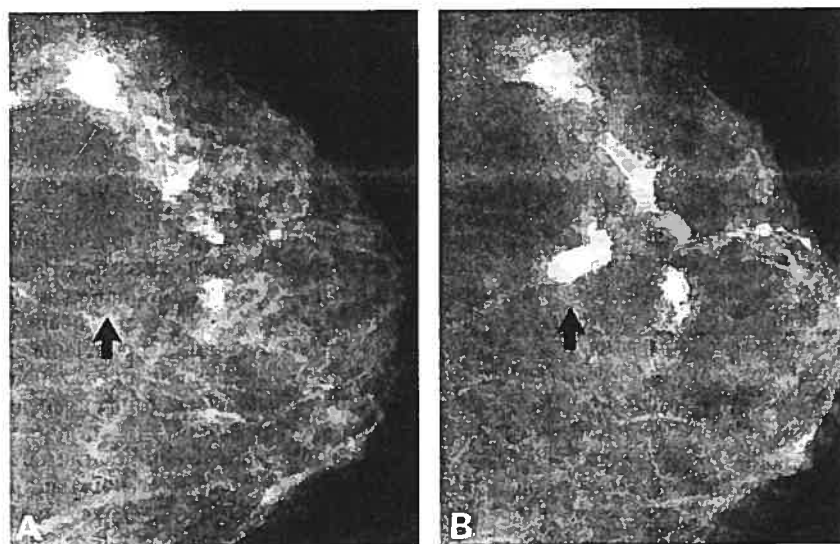


Fig. 1. Mammograms, 1 year apart. The tumor, identified by an arrow in a recent mammogram (B), is not apparent in a mammogram taken 12 months earlier (A).

antibody, Zymed, San Francisco, CA, USA; 1:50), low-molecular-weight cytokeratins (polyclonal antibody, Becton-Dickinson, San Jose, CA, USA; 1:40), high-molecular-weight cytokeratins (AE1/AE3, Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN, USA; 1:100), cytokeratin 14 (CK 14) (LL002, Serotec Inc., Oxford, England; 1:10 after a 4-minute microwave treatment in pH 6.0 citrate buffer brought to its boiling point), cytokeratin 19 (CK 19) (RCK108, DAKO; 1:400 after enzymatic predigestion with pronase), S100 protein A and B (antibovine S100 protein antibody, DAKO; 1:400 after enzymatic predigestion with trypsin), progesterone receptors (PgR 636, DAKO; 1:50) and estrogen receptors (1D5, DAKO; 1:25) were applied at the specified dilutions.

Double IHC stains were performed using 2 techniques. In one, a mouse monoclonal IgG2a antibody specific for α -SMA [12] and a mixture of mouse monoclonal IgGs anticytokeratin antibodies (clones AE1 and AE3, DAKO, Glostrup, Denmark; clone 5D3, BioGenex, San Ramon, CA, USA) were employed according to the method of Bochaton-Piallat et al. [13]. After a microwave pretreatment (5 minutes in 10 mM citrate buffer, pH 6.0), tissue sections were incubated with the anti- α -SMA antibody and the anticytokeratin mixture in this order. The former reaction was revealed in brown by using diaminobenzidine (DAB) from Serva (Heidelberg, Germany), the latter in red by using 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC) from BioGenex. Sections were counterstained with hematoxylin. Because the red pigment of AEC fades in media containing toluene or xylene, a water-based mounting medium was used (Aquatex, DAKO, Glostrup, Denmark).

Double IHC stains were also performed for α -SMA and CK 14 using a commercial kit (Histostain-DS Kit, Zymed, San Francisco, CA, USA). The kit's guidelines were followed, although incubation times for both primary antibodies were extended to 1 hour. The reaction for α -SMA was revealed in dark purple (horseradish peroxidase, BCIP/NBT) and preceded the reaction with clone LL002 anti-CK 14 revealed in red (alkaline phosphatase, AEC). No counterstain was applied to the tissue sections; these were also mounted by using a water-based medium (Crystal/Mount, Biomedica Corp., Foster City, CA, USA).

Transmission Electron Microscopy

Tissue samples were treated as described previously [9]. Thin sections were examined with a Philips 201 transmission electron microscope.

Results

Macroscopy and Light Microscopy

The main tumor measured approximately 1.8 × 1.2 × 1.8 cm, had poorly defined borders, and presented a whitish, stellate, and retracted aspect.

On HPS-stained sections, the lesion appeared multinodular; the nodules were composed of intersecting fascicles of spindle cells that were budding from the basal layer of centrally located mammary ducts (Fig. 2). At the periphery of the main lesion, a few spindle cell nodules, devoid of epithelial mammary ducts, invaded the mammary fatty tissue. Some isolated mammary ducts with mild to moderate, nonatypical hyperplasia and occasional microcalcifications were dispersed throughout the lesion. The mammary stroma between the spindle cell nodules was usually heavily collagenized and practically acellular. Cytologically, the spindle cells disclosed fibrillar acidophilic cytoplasm with subplasmalemmal condensations. Nuclei were oval-shaped with finely granular chromatin and small inconspicuous nucleoli; they displayed mild nuclear atypia and the mitotic index was low to moderate (4 to 5 mitotic figures per 10 high-power fields at 40×). The spindle cell nodules were generally edematous and poorly collagenized. As secondary lesions, a small fibroadenoma with ductal hyperplasia and foci of florid atypical ductal hyperplasia were also found within the main lesion.

The smaller lesion disclosed numerous microcalcifications, mild to florid hyperplasia, and focal apocrine metaplasia without cytologic atypia.

Immunohistochemistry

Many invasive spindle cells from the main lesion were strongly positive for α -SMA, vimentin, and CK 14, a little weaker, however, for total muscle actin. In tissue sections stained for CK 14, a transition between myoepithelial cells and malignant spindle cells became obvious around mammary ducts (Fig. 3). This was less evident in tissue sections stained for vimentin, α -SMA, and total muscle actin since these antigens have wider tissue distributions. The malignant cells reacted weakly with a pancytokeratin antibody (polyclonal antibody, Zymed). No immunostaining of the neoplastic cells (not shown) was obtained with antibodies to sarcomeric actin, desmin, S100 protein, EMA, CK 19, or estrogen and progesterone receptors. Two broad-spectrum antibodies routinely used in pathology to identify low-molecular-weight (polyclonal antibody, Becton-Dickinson) and high-molecular-weight cytokeratins (AE1/AE3, Boehringer Mannheim) also failed to react with these cells.

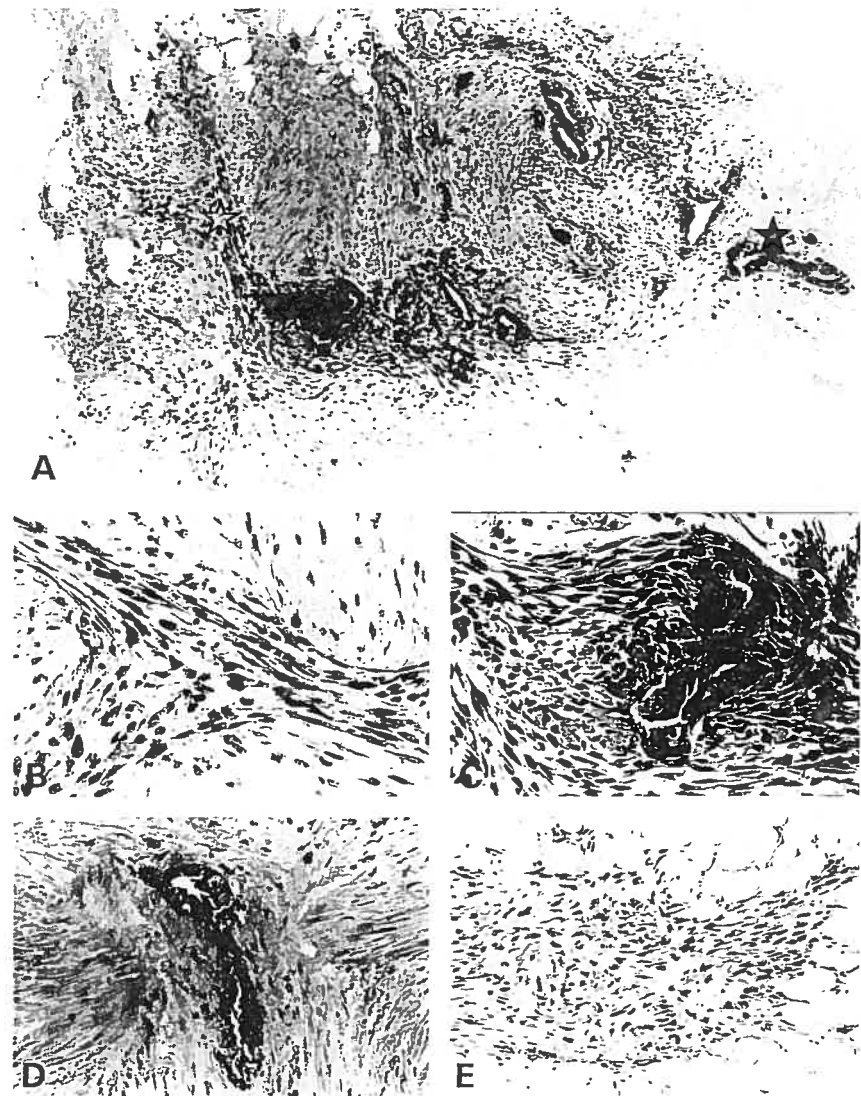


Fig. 2. Light microscopic features of spindle cell myoepithelial carcinoma of the breast. **A.** The tumor has a multinodular aspect at low magnification. **B, C,** and **D.** Higher magnification of the foci identified by open stars in **A** (from left to right) disclosing intersecting fascicles of invasive cells (**B**), spindle cells budding from the basal layer of a mammary duct (**C**), and microcalcifications in an entrapped duct surrounded by a highly collagenized stroma (**D**). **E.** Infiltration of the mammary adipose tissue by spindle cells (HPS).

Double IHC stains were performed on tissue sections of the main lesion to ascertain that coexpression of α -SMA and cytokeratins truly occurred in a fraction of the spindle cell component (Fig. 4). The combination of dark purple and red chromogens re-

vealed the existence of spindle cells whose red perinuclear CK 14 reaction was framed by the dark purple α -SMA reaction (bundles of microfilaments). Depending on the area examined, the spindle cell component was enriched in solely dark purple cells

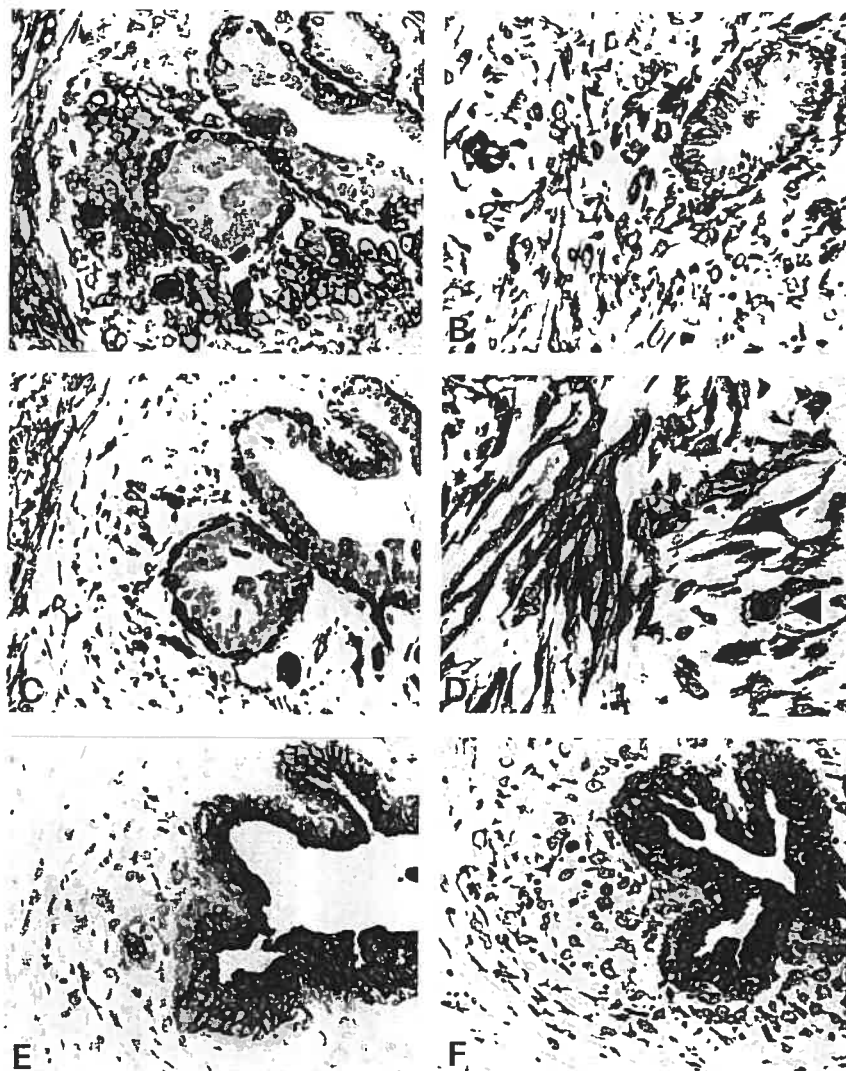


Fig. 3. Immunohistochemical (IHC) features, with single-labeling technique, of spindle cell myoepithelial carcinoma of the breast. **A.** Staining for α -SMA. **B.** Staining for vimentin. **C** and **D.** Staining for CK 14. **E.** Staining for CK 19. **F.** Staining for pancytokeratin. The combined IHC results for the periductal nodule illustrated in **A, B, C, E,** and **F** suggest that the spindle component of the tumor arises from the myoepithelial compartment of the mammary ducts. A mitotic figure (arrowhead in **D**) is observed among CK 14-positive invasive spindle cells.

(in 50% to 60% of the lesion), in cells displaying a red and dark purple coloration (in 30% to 50% of the lesion) and, in one particular area, in solely red cells (10% of the lesion). Unstained spindle cells were also observed, but their number was difficult to assess without a counterstain (see Discussion).

Transmission Electron Microscopy

Ultrastructural analysis of the spindle cell component of the main lesion was performed (Fig. 5). Curvilinear bundles of tonofilaments (about 8–10 nm in diameter) usually located in perinuclear areas

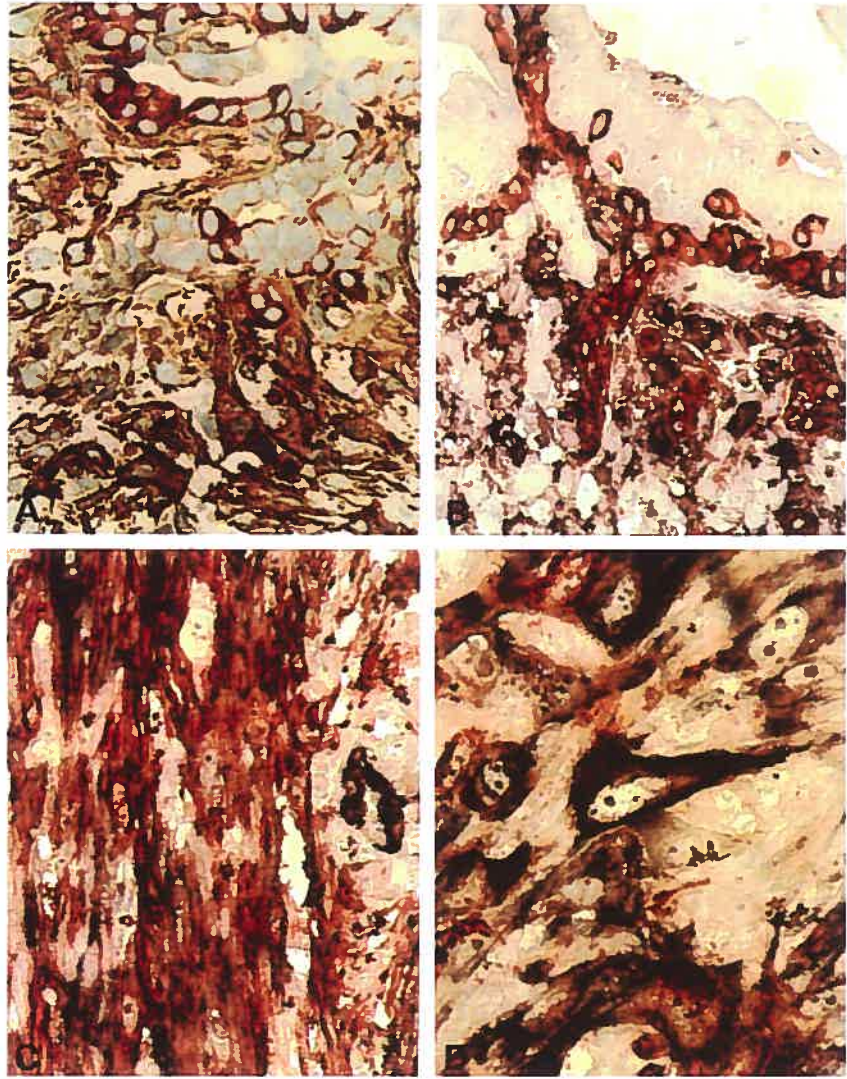


Fig. 4. Immunohistochemical (IHC) features, with double-labeling techniques, of spindle cell myoepithelial carcinoma of the breast **A.** Double-labeling result for α -SMA (1A4, brown) and cytokeratins (AE1/AE3/5D3, red); hematoxylin counterstain. **B, C, and D.** Double-labeling results for α -SMA (1A4, dark purple) and CK 14 (LL002, red); no counterstain. In **A** and **B**, double-stained spindle cells are budding from the basal layer of mammary ducts and invade the surrounding stroma. In **C**, invasive, double-stained spindle cells infiltrate the stroma; on the right, the cluster of solely purple cells (α -SMA-positive but CK 14-negative cells) correspond most likely to a blood vessel. In **D**, in accordance with the expected intracellular distribution patterns of CK 14 (in cytoplasmic, centrally located tonofilaments) and α -SMA (in cytoplasmic, subplasmalemmal stress fibers), the tumor cells disclose red cell bodies framed by dark purple outlines.

or centrally located in cytoplasmic extensions were observed, coexisting with subplasmalemmal bundles of microfilaments (about 5–7 nm in diameter) within the cytoplasm of many spindle cells. Typical

dense bodies were evident in the microfilament bundles running parallel to the long axis of the cells. These cells also disclosed pinocytotic vesicles, intermediate junctions, dense plaques (hemidesmo-

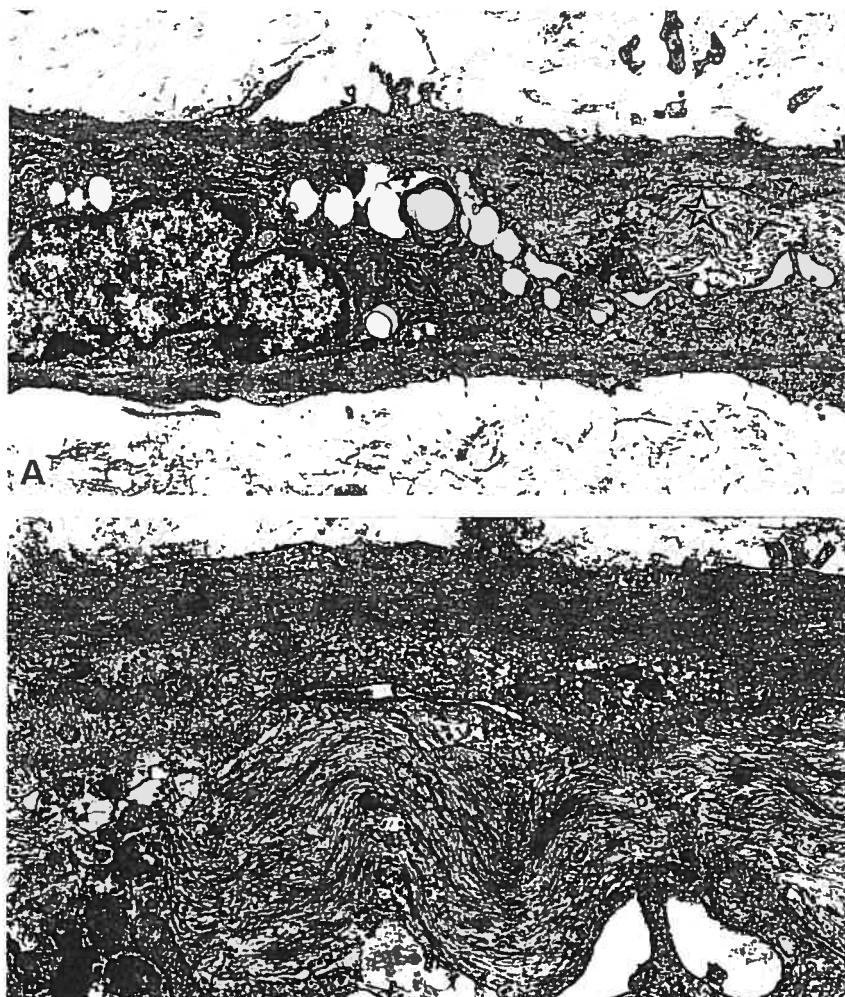


Fig. 5. Ultrastructural features of spindle cell myoepithelial carcinoma of the breast. **A.** Low magnification discloses a spindle cell with a notched nucleus, 3 cytoplasmic extensions, centrally located curvilinear bundles of tonofilaments, and subplasmalemmal bundles of microfilaments with numerous dense bodies. **B.** Higher magnification of cytoplasmic extensions (identified by an open star in **A**) illustrating centrally located bundles of tonofilaments, subplasmalemmal bundle of microfilaments with dense bodies, and fragments of external lamina. (Uranyl and lead citrate: **A.** 10,500 \times , **B.** 32,000 \times).

somes) and were occasionally connected by poorly developed desmosomes. Most of the malignant spindle cells were surrounded by a fragmented external lamina. Their rough endoplasmic reticulum and Golgi apparatus were well developed, and their irregular, notched nuclei contained nucleoli of intermediate size.

Finally, some spindle cells with abundant microfilaments and stress fibers but lacking tonofilaments

were noted; these likely corresponded to nonneoplastic, stromal myofibroblasts.

Discussion

The tumor described is quite rare, as only 10 have been reported. The mean age of women with this tumor is 54 years (range 25 to 81 years). About one

fifth of these solitary lesions were centrally located and most displayed microcalcifications. In the literature, the described tumors ranged from 1.0 to 21.0 cm. The tumor in our patient was 1.8 cm; its absence on a mammogram taken 12 months earlier suggested that it was discovered at a relatively early stage of its development. The lesion was multinodular, composed of spindle-shaped myoepithelial cells "budding" from the basal layer of centrally located mammary ducts. Furthermore, there was no tumor necrosis and the malignant population displayed mild nuclear atypia and a low to moderate mitotic activity (unlike what has been reported in classic cases [8,9]). The number of benign mammary ducts embedded in the spindle component was also greater than that observed in reported cases [4,5,7-10,14]. Our LM and IHC findings further showed the invasive process to be somewhat limited. No metastases were found at the time of the initial surgery or in the subsequent left axillary lymph node dissection. The benign nature of a smaller mass removed with the main lesion was ascertained by LM and IHC, thereby ruling out malignant satellite nodules.

The neoplastic cells of myoepithelial carcinomas are known to retain some characteristics of their normal counterparts, one being the coexpression of smooth-muscle actins and basal cytokeratins (chiefly observed in the myoepithelium of normal mammary ducts). In dealing with spindle cell tumors of the breast, IHC is a cost-effective method to verify the possibility of a myoepithelial differentiation, especially when double-labeling techniques are employed. However, immunohistochemical data pertaining to these rare mammary carcinomas are often contradictory or remain uncorroborated since not all previously reported cases of the spindle cell variant of myoepithelial carcinomas were investigated by use of this technique (or by use of comparable procedures and reagents in order to do so).

Our positive staining results of neoplastic myoepithelial cells for α -SMA were similar to those described previously for various actins [4,5,7-9,15] and proved superior to those obtained for total muscle actin (weak reaction) and vimentin (lack of specificity). Over the last decade, α -SMA has become the best known and most widely used marker of myoepithelial differentiation, in part because reliable commercial antibodies are available to locate this smooth-muscle protein both in normal and pathological breast specimens [16,17].

In comparison, no general agreement has been reached regarding the localization of cytokeratins in mammary myoepithelial neoplasms. "Cytokeratin cocktails" developed over the last 2 decades are now routinely used to locate various combinations of

these intermediate filaments. However, the results they provide are difficult to interpret since most cocktails demonstrate uneven affinities for the various cytokeratins they are designed to target; also, with broad-spectrum antibodies, the individual contributions of simultaneously targeted cytokeratins to the final staining results cannot be assessed. Commercial antibodies for individual cytokeratins are available, although they are still seldom routinely used in clinical practice. In the mammary epithelium, the cytokeratins currently considered as "myoepithelial" specific are CK 5, CK 14, and CK 17. In this tumor, unlike the 3 anticytokeratin cocktails, the antibody for CK 14 consistently elicited strong positive reactions in the malignant cell population. Poor staining results (with broad-spectrum anticytokeratin antibodies) similar to ours have been reported in another study, which included myoepithelial neoplasms of the breast [18]. This suggests that antibodies directed against individual "basal" cytokeratins might be more reliable than broad-spectrum anticytokeratin antibody cocktails to locate neoplastic myoepithelial cells in paraffin-embedded breast tissue specimens. In hospital practice, false-negative results for cytokeratins could impair the ability to recognize other myoepithelial carcinomas because ultrastructural analyses are rarely performed unless a suspicion of α -SMA and cytokeratin coexpression is raised by IHC results.

The positive results we obtained for vimentin were found in some [4,9] but not in all myoepithelial carcinomas [8,15]. The spindle cells in our tumor did not express S100 protein (unlike those described in other reports [4,19]), nor did they express EMA, "luminal" CK 19, or progesterone and estrogen receptors; this is in agreement with the literature [5,17,20]. The absence of steroid hormone receptors in this tumor was expected since normal myoepithelial cells do not express such receptors as luminal cells do.

Double IHC stains have rarely been performed in myoepithelial carcinomas [4]. The results from the brown and red double IHC labeling were difficult to interpret since the shades of the chromogens proved too similar. In the tissue sections stained for CK 14 in red and α -SMA in dark purple, α -SMA-positive/CK 14-negative as well as α -SMA-negative/CK 14-positive spindle cells were clearly present in addition to the expected α -SMA-positive/CK 14-positive myoepithelial-like malignant cells. The contribution of α -SMA-negative/CK 14-negative spindle cells was difficult to assess because these sections could not be appropriately counterstained (stains like light green or methyl green, which would not have interfered with the interpretation

of the results, were washed off the sections by the water-based mounting medium).

The α -SMA-positive/CK 14-negative population might encompass several cell types: solely dark purple cells might represent stromal myofibroblasts, myoepithelial-derived cells that did not express CK 14, or myoepithelial-derived cells in which the CK 14 expression was too low to be detected by IHC. In the adult resting breast, a similar immunophenotype is observed in normal myoepithelial cells lining lobular structures, but again, to the best of our knowledge, it is not known if these CK 14-negative cells synthesize amounts of CK 14 that are undetectable by IHC or if they simply do not express this intermediate filament. In comparison, at the ultrastructural level, myofibroblasts could at least be distinguished from the malignant myoepithelial cells, for their microfilament-rich cytoplasm typically lacked curvilinear bundles of tonofilaments.

Although less numerous, solely red spindle cells were also observed in a single invasive front and in some glandular remnants of double-stained tissue sections. These CK 14-positive cells could represent myoepithelial cells expressing α -SMA at levels too low for detection by IHC.

Despite the fact that double-labeling IHC techniques are time-consuming procedures, such techniques could prove helpful in instances when an EM analysis is not feasible. However, in accordance with others [3–8,10,11,15,21–25], we believe that a diagnosis of “spindle cell myoepithelial carcinoma of the breast” should be based, whenever possible, on strict ultrastructural criteria.

The EM features of the present lesion were diagnostic of myoepithelial differentiation: the infiltrating spindle cells displayed bundles of microfilaments with dense bodies and tonofilaments, pinocytotic vesicles, desmosomes and hemidesmosomes, and a fragmented external lamina. A well-developed Golgi apparatus and/or rough endoplasmic reticulum, often considered as signs of an increased metabolic activity, were observed. Similar features have been reported in 3 other cases [4,7,9], 2 of which displayed markedly aggressive behavior.

In this case, the differential diagnosis includes fibromatosis, phyllodes tumor, so-called myofibroblastomas, “other” myoepithelial proliferations, and fibromatosis-like metaplastic carcinomas of the breast. The first 3 entities can be excluded, for neoplastic cells were immunoreactive for cytokeratins; as shown earlier, the results were especially conclusive with the anti-CK 14 antibody. Although some cytokeratins have recently been identified in mesenchymal cells, e.g., smooth-muscle cells (i.e., cytokeratins 8 and 18 [26–29], which are targeted by

many anticytokeratin cocktails). CK 14 expression has not been reported in nonepithelial cells and thus supports a myoepithelial differentiation. The diagnosis of adenomyoepithelioma (a lesion that can be accompanied by foci of myoepithelial carcinoma [18,25,30–32]) is unlikely because our IHC and EM findings did not show concomitant invasion of cells exhibiting a luminal differentiation. This myoepithelial proliferation was considered malignant because α -SMA-positive/CK 14-positive cells clearly infiltrated the surrounding tissues. In the majority of fibromatosis-like metaplastic carcinomas of the breast reported to express actin and cytokeratins, immunoreactivity for α -SMA was most often confined to cytokeratin-negative cells, i.e., stromal cells corresponding most likely to nonneoplastic, reactive myofibroblasts. However, expression of α -SMA and cytokeratins within the same cell population was documented in a few cases by single labeling IHC, employing parallel sections [33–35]. In one study, the coexpression of α -SMA and cytokeratins was thereafter confirmed by EM in 3 cases of metaplastic carcinoma of the breast [35]. The cases of fibromatosis-like metaplastic carcinomas expressing α -SMA and cytokeratins within the same cell population might represent myoepithelial rather than metaplastic carcinomas, suggesting that this group of breast neoplasms is histogenetically heterogeneous. The diagnosis of a spindle cell variant of mammary myoepithelial carcinoma is obvious for the herein reported case since neoplastic periductal and invasive spindle cells coexpressed α -SMA and specific cytokeratins, i.e., CK 14, by double-labeling IHC on paraffin sections and disclosed, by EM, cytoplasmic bundles of microfilaments with dense bodies and tonofilaments. EM and double-labeling IHC techniques are therefore very helpful tools for the diagnosis of myoepithelial and also fibromatosis-like metaplastic carcinomas of the breast.

Owing to the uncertain prognosis of myoepithelial carcinomas and to the relatively high recurrence risk associated with these rare tumors [3,4,9,14,20], a wide surgical excision was recommended. Follow-up data on these carcinomas (especially in regard to the patient's response to various treatments) are scarce. To the best of our knowledge, the effects of raloxifen administration on myoepithelial carcinoma patients have not yet been investigated. Tamoxifen administration was reported to have no effect on the progression of a previously documented spindle cell myoepithelial carcinoma of the breast [4]. The fact that mammary myoepithelial cells do not normally express estrogens and progesterone receptors as luminal cells do (the targets of drugs

such as tamoxifen and raloxifen) probably explains this resistance to antihormonal therapy.

In summary, this myoepithelial carcinoma had a radiographic image indistinguishable from a mesenchymal proliferation, a benign epithelial process (as the one found in its vicinity) or "classic" mammary adenocarcinoma. Because histologic features diagnostic of an epithelial differentiation were not prominent by LM, IHC and EM studies were crucial to establish the diagnosis of mammary myoepithelial carcinoma. Despite the rarity of these neoplasms, the study of additional cases should not be neglected, for half of the few cases reported so far have displayed surprisingly aggressive behaviors. Early recognition and clinical management of these problematic cases might be difficult to achieve without a deeper understanding of the morphogenesis of all myoepithelial carcinomas, but also of the biological properties of the cells they apparently arise from, the often overlooked cells of the myoepithelial lineage.

Acknowledgments

This work was supported by the Montreal Breast Cancer Foundation. We would like to thank Dr. Denise Ouimet-Oliva for providing us with the mammograms, and Marie-Luce Bochaton-Piallat, PhD, Ms. Danielle Grimard, and Mr. Som Chatterjee who contributed their technical expertise to this work.

References

- Rosen PP. Myoepithelial neoplasms. In Rosen PP (ed): *Rosen's breast pathology*. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, pp. 105-121, 1997
- Tavassoli FA. Miscellaneous lesions. In Tavassoli FA (ed): *Breast pathology*, 2nd ed. Appleton & Lange/McGraw-Hill Group, New York, pp. 764-827, 1999
- Scarpellini F, Usellini L, Foschini MP. Mioepithelioma maligno associato a carcinoma duttale in situ ed invasivo NAS. *Pathologica* 89:420-424, 1997
- Lakhani SR, O'Hare MJ, Monaghan P, Winehouse J, Gazet JC, Sloane JP. Malignant myoepithelioma (myoepithelial carcinoma) of the breast: A detailed cytokeratin study. *J Clin Pathol* 48:164-167, 1995
- Tavassoli FA. Myoepithelial lesions of the breast. Myoepitheliosis, adenomyoepithelioma, and myoepithelial carcinoma. *Am J Surg Pathol* 15:554-568, 1991
- Ermilova VD, Kondakova TI, Filippova NA, Gelshtein VI, Chipysheva TA. Zlokachestvennaia mioepitelioma molochnoi zhelezy (gistologicheskoe, immunomorfologicheskoe issledovanie). *Arkh Patol* 50:53-57, 1988
- Bigotti G, DiGiorgio G. Myoepithelioma of the breast: Histological, immunologic, and electron microscopic appearance. *J Surg Oncol* 32:58-64, 1986
- Thorner PS, Kahn HJ, Bauml R, Lee K, Moffat W. Malignant myoepithelioma of the breast. An immunohistochemical study by light and electron microscopy. *Cancer* 57:745-750, 1986
- Schürch W, Potvin C, Seemayer TA. Malignant myoepithelioma (myoepithelial carcinoma) of the breast: An ultrastructural and immunocytochemical study. *Ultrastruct Pathol* 8:1-11, 1985
- Erlanson RA, Rosen PP. Infiltrating myoepithelioma of the breast. *Am J Surg Pathol* 6:785-793, 1982
- Kermarec J, Plouvier S, Duplay H, Daniel R. Tumeur mammaire à cellules myoépithéliales. *Arch Anat Pathol* 21:225-231, 1973
- Skalli O, Ropraz P, Trzeciak A, Benzouana G, Gillesen D, Gabbiani G. A monoclonal antibody against alpha-smooth muscle actin: A new probe for smooth muscle differentiation. *J Cell Biol* 103:2786-2796, 1986
- Bochaton-Piallat ML, Kapenitos AD, Donati G, Redard M, Gabbiani G, Pournaras CJ. TGF-beta 1, TGF-beta receptor II and ED-A fibronectin expression in myofibroblast of vitreoretinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41:2336-2342, 2000
- Shiraishi T, Nakayama T, Fukutome K, Watanabe M, Murata T. Malignant myoepithelioma of the breast metastasizing to the jaw. *Virchows Arch* 435:520-523, 1999
- Soares J, Tomasic G, Bucciarelli G, Eusebi V. Intralobular growth of myoepithelial cell carcinoma of the breast. *Virchows Arch* 425:205-210, 1994
- Eusebi V, Foschini MP. Rare carcinomas of the breast. In Elston CW, Ellis IO (eds): *The breast*. Churchill Livingstone, Edinburgh, pp. 339-364, 1998
- Foschini MP, Eusebi V. Carcinomas of the breast showing myoepithelial cell differentiation. A review of the literature. *Virchows Arch* 432:303-310, 1998
- Chen PC, Chen CK, Nicastrì AD, Wait RB. Myoepithelial carcinoma of the breast with distant metastases and accompanied by adenomyoepitheliomas. *Histopathology* 24:543-548, 1994
- Maiorano E, Ricco R, Virgintino D, Lastilla G. Infiltrating myoepithelioma of the breast. *Appl Immunohistochem* 2:130-136, 1994
- Van Dorpe J, De Weer F, Bekaert J, Lauweryns J, Moerman P. Malignant myoepithelioma of the breast. Case report with immunohistochemical study. *Arch Anat Cytol Path* 44:193-198, 1996
- Desautels JEL. Malignant myoepithelioma of the breast: A case report. *Can Assoc Radiol J* 41:387-388, 1990
- Cartagena N Jr, Cabello-Inchausti B, Willis I, Poppiti R Jr. Clear cell myoepithelial neoplasm of the breast. *Hum Pathol* 19:1239-1243, 1988

23. Rode L, Nesland JM, Johannessen JV. A spindle breast lesion in a 54-year-old woman. *Ultrastruct Pathol* 10:421-425, 1986
24. Zarbo RJ, Oberman HA. Cellular adenomyoepithelioma of the breast. *Am J Surg Pathol* 7:863-870, 1983
25. Cameron HM, Hamperl H, Warambo W. Leiomyosarcoma of the breast originating from the myoepithelium (myoepithelium). *J Pathol* 114:89-92, 1974
26. Bar H, Bea F, Blessing E, Watson L, Wende P, Kreuzer J, Kubler W, Jahn L. Phosphorylation of cytokeratin 8 and 18 in human vascular smooth muscle cells of atherosclerotic lesions and umbilical cord vessels. *Basic Res Cardiol* 96:50-58, 2001
27. Denger S, Jahn L, Wende P, Watson L, Gerber SH, Kubler W, Kreuzer J. Expression of monocyte chemoattractant protein-1 cDNA in vascular smooth-muscle cells: Induction of the synthetic phenotype, a possible clue to SMC differentiation in the process of atherogenesis. *Atherosclerosis* 144:15-23, 1999
28. Haigh T, Chen C, Jones CJ, Aplin JD. Studies of mesenchymal cells from 1st trimester human placenta: Expression of cytokeratin outside the trophoblast lineage. *Placenta* 20:615-625, 1999
29. Perez-Pomares JM, Macias-Lopez D, Garcia-Garrido L, Munoz-Chapuli R. Immunohistochemical evidence for a mesothelial contribution to the ventral wall of the avian aorta. *Histochem J* 31:771-779, 1999
30. Tamai M. Intraductal growth of malignant mammary myoepitheliomas. *Am J Surg Pathol* 16:1116-1125, 1992
31. Toth J. Benign human mammary myoepithelioma. *Virchows Arch Path Anat* 374:263-269, 1977
32. Enghardt MH, Hale JH. An epithelial and spindle cell breast tumor of myoepithelial origin. *Virchows Arch A Pathol Anat* 416:177-184, 1989
33. Gobbi H, Simpson JF, Borowsky A, Jensen RA, Page DL. Metaplastic breast tumors with a dominant fibromatosis-like phenotype have a high risk of local recurrence. *Cancer* 85:2170-2182, 1999
34. Sneige N, Yaziji H, Mandavilli SR, Perez ER, Ordonez NG, Gown AM, Ayala A. Low-grade (fibromatosis-like) spindle cell carcinoma of the breast. *Am J Surg Pathol* 25:1009-1016, 2001
35. Wargotz ES, Deos PH, Norris HJ. Metaplastic carcinoma of the breast: II. Spindle cell carcinoma. *Hum Pathol* 20:732-740, 1989

ANNEXE X

ARTICLE PAR F. JOLICOEUR ET COLL., 2003

Déclaration des coauteurs

Étudiante : Francine Jolicoeur
 Programme : 3-512-1-0 Pathologie et biologie cellulaire (doctorat), option biologie du cancer

Auteurs : F. Jolicoeur
 L.A. Gaboury
 L.L. Oligny

Titre: The basal cells of second trimester fetal breasts: an immunohistochemical study of myoepithelial precursors.

Revue: *Pediatric and Developmental Pathology*
 Année: 2003
 Numéro: 6
 Volume: 5
 Pages: 398-413

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que **Francine Jolicoeur** inclut cet article dans sa thèse de doctorat qui a pour titre «Caractérisation de la cellule myoépithéliale du sein fœtal, adulte normal et pathologique».

GABOURY, L.A.
 Coauteur

Signature

Date

13-10-2004

OLIGNY, L.L.
 Coauteur

Date

13 Oct 2004

11

Basal Cells of Second Trimester Fetal Breasts: Immunohistochemical Study of Myoepithelial Precursors

FRANCINE JOLICOEUR,^{1,2,4} LOUIS A. GABOURY,^{1,3} AND LUC L. OLIGNY^{1,2,4}

¹Département de Pathologie et Biologie Cellulaire, Faculté de Médecine, Université de Montréal, C.P. 6128 Succursale Centre-ville, Montréal, Québec H3C 3J7, Canada

²Centre de Recherche de l'Hôpital Sainte-Justine, 3175 Chemin de la Côte Sainte-Catherine, Montréal, Québec H3T 1C5, Canada

³Département de Pathologie, CHUM, Hôtel-Dieu de Montréal, 3840 Rue St-Urbain, Montréal, Québec H2W 1T8, Canada

⁴Département de Pathologie, Hôpital Sainte-Justine, 3175 Chemin de la Côte Sainte-Catherine, Montréal, Québec H3T 1C5, Canada

Received November 27, 2002; accepted May 22, 2003; published online September 11, 2003.

ABSTRACT

The molecular characterization of human mammary myoepithelial cells is incomplete, hindering our understanding of its importance in breast physiology and pathology. Because data on the precursors of this cell lineage remain scarce and often contradictory, basal epithelial cells of second trimester fetal breasts were studied by light microscopy (LM) and immunohistochemistry (IHC). Up to 20 wk of gestational age, the mammary rudiments only comprised roundish primary outgrowths, "primary buds," more likely to represent immature nipples than true mammary tissue. At 21 wk secondary outgrowths, "projections," extended from enlarged primary buds into well-vascularized layers of dense mesenchyme. Basal projection cells had a partial myoepithelial-like phenotype: they reacted with CD29, CD49f, CD104, keratin 14, vimentin, S100 β protein, and p63; furthermore, many became positive for keratin 17, α -smooth muscle actin, and CD10 (but not for keratin 19) between wk 21 and 25. The continuous basement membrane associated with the fetal mammary rudiments was strongly positive for collagens type IV and VII, and for laminin 5. Consistently strong and basally

polarized staining for hemidesmosomal components suggested that although incompletely differentiated, most second trimester myoepithelial precursors might already mediate local epithelial-mesenchymal interactions, i.e., complex signaling pathways which are crucial for both orderly growth during development and maintenance of homeostasis during adult life. Because they are likely implicated in the phenomenon of menstrual cycle-related growth spurts in the adult resting breast, the strategically positioned cells of the myoepithelial lineage might constitute critical protagonists in defective epithelial-mesenchymal signaling associated with cancer progression.

Key words: breast, fetal development, histology, immunohistochemistry, myoepithelial cell, nipple

INTRODUCTION

As their name implies, myoepithelial cells (MECs) observed along the epithelial-mesenchymal interface of human organs such as the breast, salivary glands, sweat glands, and the prostate disclose features suggestive of a dual epithelial-like and muscle-like differentiation, i.e., they coexpress keratin intermediate filaments (IFs), vimentin IFs, as well as smooth muscle-related antigens. Human sali-

*Corresponding author, Département de Pathologie, Hôpital Sainte-Justine, 3175 Chemin de la Côte Sainte-Catherine, Montréal, Québec H3T 1C5, Canada.

vary MECs and the rodent mammary MECs were used as models for their study during many years; however, it was shown that cell types indiscriminately identified as "myoepithelial" in the literature tend to disclose several interspecies and interorgan differences [1-4]; this could explain many discrepancies found in the already limited literature currently available on the "human mammary" MEC.

In the present study, basal epithelial cells of second trimester fetal breasts have been studied by light microscopy (LM) and by an indirect immunoperoxidase technique (IHC) using antibodies for CD10, CD29, CD49f, CD104, keratin 14 (KRT14), keratin 17 (KRT17), keratin 19 (KRT19), alpha-smooth muscle actin (α -SMA), vimentin, S100 β protein (S100 β), p63, collagen type IV (Col-IV), collagen type VII (CollVII) and laminin 5 (LN5). These antigens were chosen for several reasons. First, most were previously recognized as immunohistochemistry markers of mammary MECs and are, currently, either widely (α -SMA), increasingly (CD10, KRT14, p63), rarely (CD49f and CD104—dimerized or individually, KRT17, S100 β), or decreasingly (vimentin) used as such in adult pathology. Second, because the expression of some of these antigens has been associated with the fulfillment of important functions by basal epithelial cells elsewhere in the body, their predominant or exclusive myoepithelial distribution within the adult breast could provide insights into physiological roles of MECs less widely recognized than their smooth muscle protein-based accessory contractile role during lactation. These functions might include, for example: 1) the assembly of a LN5-rich basement membrane likely to affect, in several ways, the behavior of local cell types with which it interacts [5, 6]; 2) the mediation via CD29-containing integrins of epithelial-mesenchymal interactions crucial to achieve and maintain tissue homeostasis, whether or not these integrins are incorporated into KRT14-containing and CollVII/LN5-anchored hemidesmosomes [7]; or 3) still ill-defined contributions, in adult epithelial organs, to sustained growth and/or renewal related to p63- and CD10-expression [8, 9]. In contrast, KRT19 was studied because in adult breast epithelium, it is normally expressed only by luminal cells (LUCs).

In second trimester fetal breasts, our LM and

Table 1. Fetal breast specimens

Case	Sex	GA (wk)	CCL (mm)	FL (mm)
F1	M	18	155	28
F2	F	18	154	32
F3	F	20	168	33
F4	F	21	175	32
F5	M	25	230	45

GA, gestational age; CCL, cranio-caudal length; FL, foot length.

IHC results suggested that primary epithelial outgrowths, unlike secondary outgrowths or "projections," probably represented nipple rather than mammary gland primordia; staining for CD10, CD29, CD49f, CD104, KRT14, KRT17, vimentin, α -SMA, S100 β , and p63—but not for KRT19—was observed in basal cells belonging to projections, the latter most likely to represent myoepithelial precursors in fetal specimens. The sequence in which basal markers first became detectable in second trimester fetal breast projections supported the notion that second trimester myoepithelial precursors probably already help mediate physiologically crucial epithelial-mesenchymal interactions in this gland; together, our data also suggested that myoepithelial markers other than smooth muscle-related antigens may prove valuable in immunohistochemical investigations on breast tissue either for research or clinical purposes.

METHODS

Tissues

Fetal breast tissue samples (Table 1) obtained from five socially driven, medically induced terminations of pregnancy were collected in strict accordance with the guidelines from the hospital's (Hôpital Sainte-Justine, Montreal, Canada) research ethics committee. The samples were processed for LM and IHC.

Methods

Minutes after the procedure (mostly dilatations and extractions), one mammary rudiment from each specimen (tissue samples of approximately $0.8 \times 0.8 \times 0.5$ cm) was embedded in OCT Compound (Tissue Tek, Sakura Finetek U.S.A. Inc.,

Table 2. Primary antibodies for immunohistochemistry

Primary antibody	Target	Manufacturer	Dilution	Specifications
SS2/36	CD10	Dako (Glostrup, Denmark)	1:400	F, EnV
4B7R	CD29	Neomarkers Inc. (Fremont, CA)	1:100	P, EZ, EnV
BQ16	CD49f	Dako	1:5	F, EnV
450-9D	CD104	Serotec Ltd. (Oxford, UK)	1:100	F, EnV
LL002	KRT14	Serotec Ltd.	1:10	P, MO, LSAB2
E3	KRT17	Dako	1:20	P, MO, LSAB2
RCK108	KRT19	Dako	1:100	P, EZ, EnV
V9	Vimentin	Dako	1:100	P, MO, EnV
1A4	α -SMA	Dako	1:500	P, EnV
DAK-S100b/2	S100 β	Dako	1:400	P, MO, EnV
4A4	p63	Neomarkers Inc.	1:20	P, EnV
CIV22	CollIV	Dako	1:25	P, EZ, EnV
LH7.2	CollVII	Serotec Ltd.	1:5	F, EnV
P3H9-2	LN5	Chemicon Int'l Inc. (Temecula, CA)	1:50	F, EnV

F, frozen sections; EnV, used with EnVision kit; P, paraffin sections; EZ, antigen retrieval step by enzymatic digestion; MO, antigen retrieval step by heating in microwave oven; LSAB2, used with LSAB2 peroxidase kit; α -SMA, alpha-smooth muscle actin.

Torrance, CA) and immediately snap-frozen in liquid nitrogen-cooled isopentane; when retrievable, the other was fixed in a modified, 10% neutral buffered formaldehyde solution (TissuFix #2, Laboratoires Gilles Chaput, Saint-Laurent, PQ, Canada) for 24 h and embedded in paraffin. Frozen tissue blocks were cut at 3–5 μ m (Leica Cryocut 1800, Deerfield, IL) and the sections were stored for less than 6 months in cardboard protective trays at -20°C . Serial paraffin sections were cut at 3 μ m (Leica RM2145) and stored in protective trays at room temperature; paraffin sections were prepared less than 3 months prior to immunohistochemical staining to limit potential storage-related alterations of their immunoreactive properties.

Light microscopy

Sections from each specimens were stained with hematoxylin-phloxin-saffron (HPS) or hematoxylin-eosin (H&E).

Immunohistochemistry

Frozen tissue sections were fixed in cold acetone (10 min) and air-dried; paraffin sections were treated in the usual fashion. Following a standard indirect immunoperoxidase technique, frozen or paraffin sections were incubated for 1 h with antibodies for CD10, CD29, CD49f, CD104, KRT14, KRT17, KRT19, vimentin, α -SMA, S100 β , p63, Coll IV, Coll VII, and LN5. The technical details pertinent to each antibody are listed in Table 2. Positive and negative controls were included in each slide run; in addition to internal controls (e.g., fetal skin layers, fetal blood vessels), tissue sections from seven normal adult resting breast specimens were stained in parallel to provide external controls (e.g., adult mammary myoepithelial and luminal cells). All controls provided satisfactory results. Immunostaining was done on a Dako (Carpinteria, CA) Autostainer Universal Staining System 3400 or manually; each antibody was applied simultaneously on one section from each case to minimize

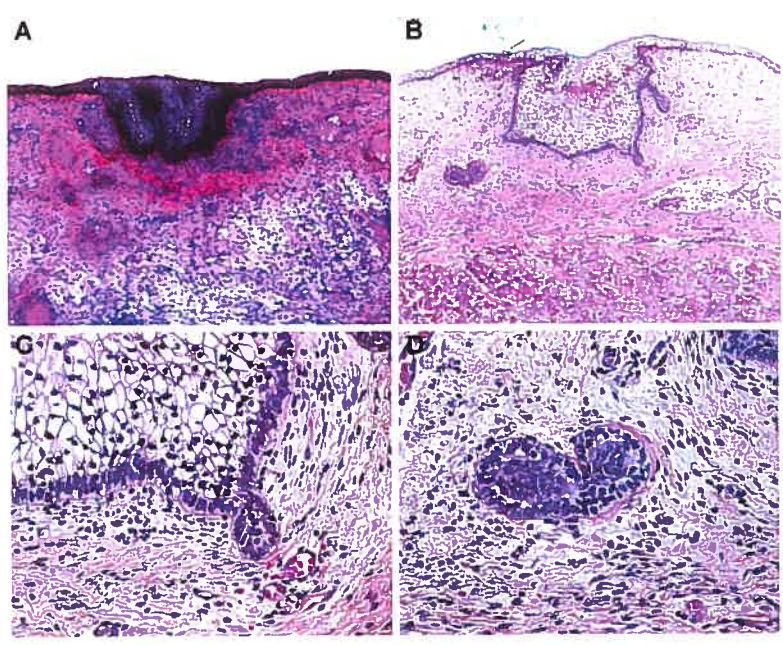


Figure 1. Second trimester fetal breast in light microscopy. General overview of a mammary rudiment at 18 wk of gestation (A; original magnification: $\times 100$) and of a mammary rudiment at 21 wk of gestation (B; original magnification: $\times 100$). In the latter, the basal aspect of the primary bud (C; original magnification: $\times 400$) gives rise to secondary projections with slender stalks and bulbous ramified ends (D; original magnification: $\times 400$).

technique-linked biases within the study (the cases' sections acted as additional controls for one another). Secondary/tertiary reagents from commercial kits (EnVision kit or LSAB2 peroxidase kit, Dako) were applied according to the manufacturer's guidelines. Diaminobenzidine (DAB; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) was used as the chromogen, and hematoxylin (1:2) as the counterstain.

All pictures were taken using an AxioPlan 2/Axiocam imaging system (Carl Zeiss, Göttingen, Germany); all images captured using the imaging system's software were cropped with Corel PHOTO-PAINT9 (Corel Corporation, Ottawa, Canada), resized and assembled in composites (but not otherwise altered) with CorelDRAW9.

RESULTS

Macroscopic examination

The mammary rudiments of 18-wk-old fetuses presented as small, translucent-to-whitish, fleshy puncti of a fraction of a millimeter in diameter. Although the rudiments from older specimens were slightly larger and, usually, readily palpable, they were not associated with significant elevations of the surrounding skin—even at 25 wk.

Histology

By LM, numerous branching blood vessels surrounded the mammary rudiments; hair follicles, sweat glands, and sebaceous lobules were absent in the vicinity of the latter. Each rudiment was surrounded by several layers of mesenchyme which seemingly extended from the skin's surface to the underlying musculature; the mesenchyme away from the rudiments was loose and contained distinctive large aggregates of clear cells (possibly immature subcutaneous fat deposits).

In the specimens of 18 and 20 wk of gestational age (GA), each mammary rudiment consisted of an isolated, roundish collection of ectodermal cells surrounded by a layer of highly cellular mesenchyme. Despite their small size—not much larger than hair follicles—these “primary buds” (PBs) already contained two distinct cell populations: a central population (central PB cells) and a peripheral population (basal PB cells). In the superficial portion of the PBs, these central and basal subpopulations were in physical continuity with the upper and basal layers of the skin, respectively. The central cells were large, round to polygonal; their clear cytoplasm typically contained an eccentric roundish and small nucleus. In contrast,

most basal PB cells were columnar cells with a centrally positioned ovoid nucleus of intermediate size.

The PBs of cases F2 and F3 (18 and 20 wk GA; as illustrated for case F3, 20 wk GA, in Fig. 1A) disclosed irregular shapes owing to the development of baso-lateral protuberances; in the latter, basal cells often adopted a pseudo-stratified disposition. We assume that these protuberances likely evolved into the well-formed mammary projections observed in our two older fetal specimens of 21 and 25 wk of GA (as illustrated for case F4, 21 wk GA, in Fig. 1B–D). Small collections of tightly packed suprabasal PB cells were sometimes seen at the origin of these projections (one visible in Fig. 2A1, and two in Fig. 2E2). The projections penetrated deeply into dense and often highly vascularized mesenchymal layers found underneath the enlarged PBs of the more mature specimens. Prior to lumen formation, basal cells were distinguished from central cells in most of the slender “projection stalks” (PSs) (see Fig. 2E2–K2), but also in most of the bulbous and ramified “projection ends” (PEs) (like that seen in Fig. 1B). In PSs, a central core of ovoid to polygonal central cells disclosed slit-like spaces (possibly nascent lumens); a single regular row of cuboidal (or slightly flattened) basal cells delimited the PSs. The basal PS cells were consistently smaller than the central PS cells. In PEs, the cells occupying a central versus a basal position did not differ markedly from one another morphologically. Less cell–cell cohesion was observed between the central and basal cells of PEs than between those of PSs or PBs.

The PBs, protuberances and projections from all specimens were surrounded by a continuous basement membrane; in cases F4 and F5 (21 and 25 wk GA), the thickness of the basement membrane was less uniform around the projections, especially in PEs, i.e., the basement membrane was very thin around the distal portion of the PE in Figure 1D (on the left), but very thick around its proximal portion (on the right).

Aside from an age-related increase in size, the PBs from all the fetal breasts disclosed no other obvious age- or sex-related distinctive morphological features. However, one slight difference was observed between the secondary projections of the fetal male breast of case F5 and the fetal female

breast of case F4: several PSs in case F5 seemed thinner than the PSs seen in the mammary rudiments of case F4 (despite F4 being approximately 4 wk younger than the 25-wk GA F5).

As seen in Figure 1, the mesenchymal layer in direct contact with the PBs of all specimens, and the proximal portion of projections in older specimens, tended to be highly cellular; it seemed less vascularized and collagenized than the remainder of the rudiment-associated mesenchymal layers. For example, in cases F4 and F5, blood vessels closely surrounded each rudiment's PSs and PEs, but not its PB.

Immunohistochemistry

The antigenic properties of basal PB cells were remarkably constant in the PBs from cases F1 to F5. As summarized in Table 3 and illustrated in Figure 2, basal PS and PE cells—cases F4 and F5—disclosed antigenic profiles different from one another (intra- and interspecimen differences); their respective profiles also differed markedly from that of basal PB cells.

Cell membrane antigens

In cases F1 to F5, most basal PB cells remained systematically negative for CD10 (Fig. 2A1, A2). Although null in the mammary projections of case F4, CD10 immunoreactivity was observed in case F5 in several basal projection cells and in a small group of suprabasal PB cells associated with the origin of a projection (Fig. 2A1).

Staining for CD29, CD49f, and CD104 was moderate-to-strong and predominantly, but not exclusively, basal. The staining for each antigen was basally polarized within most basal epithelial cells, although more clearly so for CD29 (Fig. 2B1, B2) than for CD49f (Fig. 2C1, C2) or CD104 (Fig. 2D1, D2). In the mammary rudiments, the nuclei of most central and basal cells stained for CD29, while only a fraction and almost none reacted for CD49f and CD104, respectively. In the supporting mesenchyme, blood vessels reacted strongly against all three integrin subunits.

Cytoplasmic antigens

At 21 wk GA, basal PB and PS cells were moderately to strongly reactive for KRT14 (Fig. 2E1, E2); basal and central PE cells reacted unevenly and weakly against this antigen, while most central PB

cells remained unstained. In the overlying skin, KRT14 immunoreactivity was confined to basal cell layers. In contrast, staining for KRT17 was extensive in the mammary rudiments, although not in PEs (Fig. 2F1, F2). In the skin, KRT17 immunoreactivity was predominantly basal; in contrast, both the basal and central cells of the mammary PBs and PSs reacted strongly with KRT17. The staining faded abruptly toward the PS/PE junction, becoming almost imperceptible in PE cells. KRT17 immunoreactivity was typically pan-cytoplasmic in most fetal mammary epithelial cells, but there was no obvious basal polarization of the staining in basal PS cells.

KRT19 immunoreactivity was null in the upper layers of the skin and in several cell populations of the mammary rudiments; indeed, most central PB cells, basal PS cells, and PE cells—both central and basal—remained unstained (Fig. 2G1, G2). The distribution of the KRT19 staining was identical in the basal cells of the skin and in basal PB cells, these cells disclosing a moderate pan-cytoplasmic staining with a variable degree of basal polarization. At the PB/PS junction, an area where the central and basal cell compartments seemed to merge, staining for KRT19 became strong in all epithelial cells and was no longer polarized. KRT19 immunoreactivity clearly switched from being confined to the peripheral cell compartment of the PB to being confined to the central cell compartment of the PSs. The mesenchyme in all our specimens remained negative for KRT14, KRT17, and KRT19.

At 21 wk GA, only occasional suprabasal cells stained for vimentin in PBs (Fig. 2H1, H2) while most projection cells did, although unevenly. Indeed, vimentin immunoreactivity typically increased toward the distal end of projections and was consistently stronger in basal than in central cells. Mesenchymal cells reacted extensively against this antigen, both in the vicinity and away from the fetal mammary rudiments.

While the blood vessels surrounding mammary rudiments reacted extensively against α -SMA, only weak-to-moderate staining was observed in a fraction of mammary projection cells from cases F4 and F5. The staining, confined to basal cells near PS/PE junctions in case F4 (Fig. 2I1, I2), was only slightly more intense and exten-

sive in case F5. α -SMA immunoreactivity was consistently null in the PBs of our fetal breast specimens but very strong in mesenchymal blood vessels.

At 21 wk GA, S100 β immunoreactivity was mostly nuclear and predominantly observed in basal projection cells; as illustrated in Figure 2J1 and J2, the staining was very weak upstream from the PS/PE junction of a projection from case F4. Occasional mesenchymal elements reacted with S100 β around the fetal mammary rudiments.

Nuclear antigens

The nuclei of many fetal basal epithelial cells stained variably for p63 in the skin, in the mammary PB, and in mammary protuberances/projections (Fig. 2K1, K2). Some central PB cells were p63-positive, whereas in projections, p63 immunoreactivity was strictly confined to basal cells. Along the basal aspect of the skin, of PBs, PSs, and PEs, the staining properties of cells involved in horizontal or vertical tandems were sometimes identical, but sometimes also strikingly different (as illustrated in the insets of Fig. 2K1, K2).

Basement membrane antigens

Staining for CollIV was continuous and linear around the mammary rudiments examined (apparently concentrated in the lamina densa of the basement membrane); however, in our two older specimens, its distribution seemed more heterogeneous around mammary projections (Fig. 2L1, L2). For example, in case F4, CollIV staining was markedly enhanced at a PS/PE junction (Fig. 2L2) where the basement membrane seemed thickened on a parallel HPS-stained section (Fig. 1D). Many mesenchymal basement membranes reacted strongly for CollIV as well. In contrast, in cases F1 through F5, staining for CollVII was specific to epithelial basement membranes; strong CollVII immunoreactivity lined continuously the basal aspect of all PBs and mammary protuberances/projections examined (Fig. 2M1, M2), as well as the basal aspect of the skin and its adnexae.

Finally, strong LN5 immunoreactivity was generally observed along the basal aspect of the mammary rudiments, of the skin, and of the blood vessels of our fetal specimens (Fig. 2N1, N2). Around the PEs of cases F4 and F5, the staining associated with the basement membrane tended to

decrease slightly (Fig. 2N2) while the cytoplasm of the basal cells resting on it seemed enriched in immunoreactive LN5.

DISCUSSION

Morphological considerations

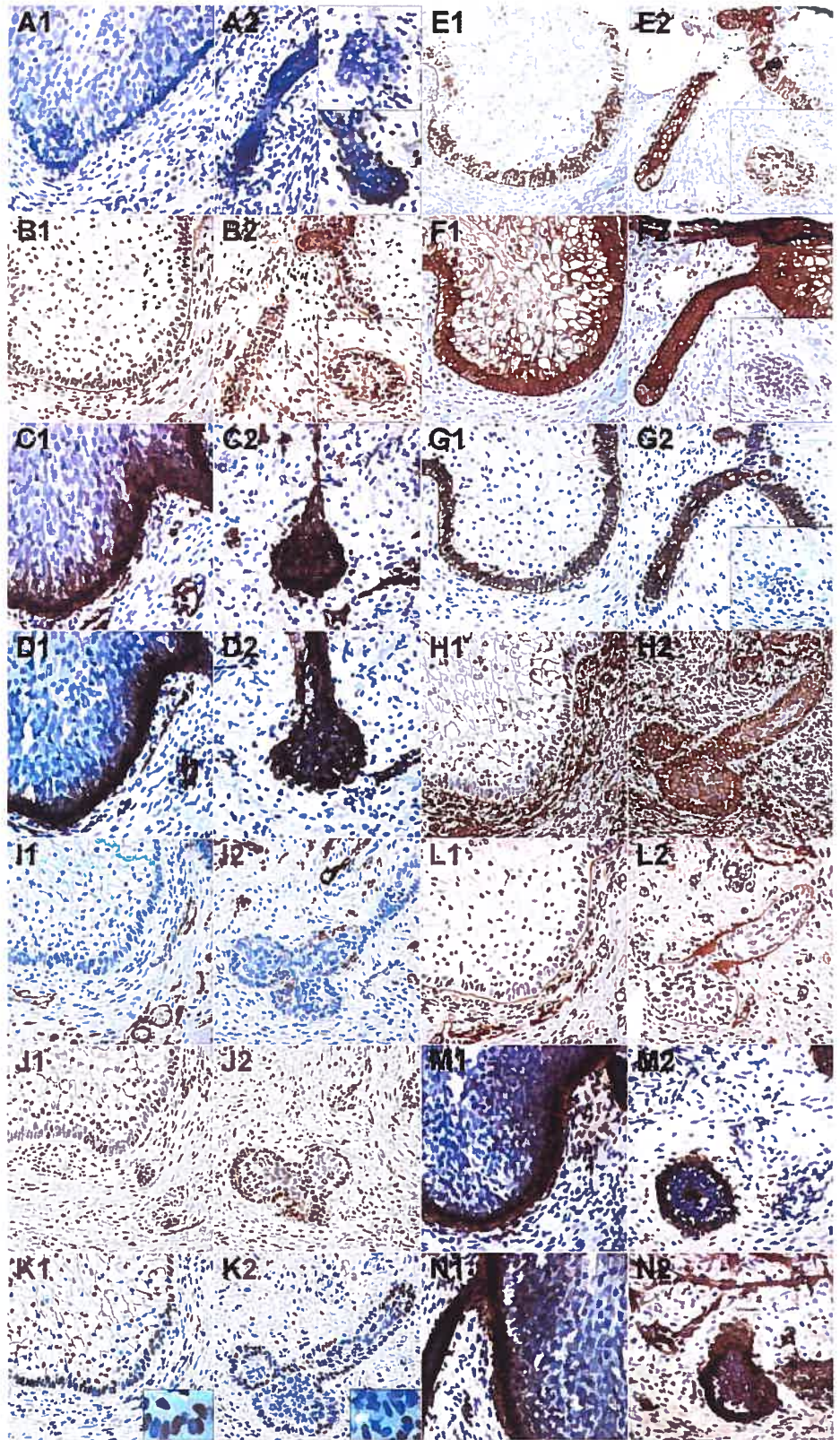
Most studies on the development of the fetal breast in utero have provided data based on the GA—ascertained by the date of the last menstrual period—of their specimens [10–17] rather than on fetal measurements (e.g., cranio-caudal length [18], foot length [19]). The “clinical gestational age” of our cases was concordant with their cranio-caudal and foot lengths; these data are included in Table 1 to facilitate comparison with the recent and older literature, including Hughes’ impressive cohort of 70 human embryos and fetuses published in 1949 [18].

Prior to lumen formation, central and basal cells were easily distinguishable in most portions of our second trimester fetal breast specimens, an observation made by others using electron microscopy [10, 13] or LM [16, 17]. All basal epithelial cells of the rudiments examined rested on a continuous basement membrane, as previously reported [10]. In the literature, the existence of well-formed secondary mammary projections (seen in cases F4 and F5) was seldom documented in comparable specimens [10, 11, 16, 17, 18]. Hughes, in his study of breasts of 150–185-mm fetuses [18], has suggested that “nodules” initially investing the mesenchyme should be regarded as *nipple* primordia: according to him, only the secondary “cellular outgrowths” first seen in older, 150–185-mm, embryos (structures identical to the mammary projections in cases F4 and F5) are genuine *mammary gland* primordia. Our findings tended to support this statement: 1) breasts between 18 and 20 wk GA comprised only PBs with increasingly irregular basal contours, whereas the 21- and 25-wk specimens disclosed well-formed mammary projections identical to the “cellular outgrowths” first seen by Hughes at comparable developmental stages; 2) the PBs were always interposed between the mammary projections and the skin, i.e., they occupied the position of the nipple in relation to the mature breast parenchyma; 3) unlike the PBs which presented as roundish solid structures in all specimens, the projections were slender cellular out-

growths disclosing central clear spaces with branching bulbous ends and thus mimicked the structure of mature mammary ducts and terminal ductal-lobular units (TDLUs); 4) signs suggestive of a reorganization of epithelial compartments (merging of the cell layers and loss of their cells’ distinctive central/basal-like morphological features) were present at the “PB/mammary projection” junction but not at the “skin/PB” junction; 5) unlike the projections which “invaded” the different layers of mesenchyme surrounding the rudiments [17, 20], enlarged PBs only seemed able to push away, without penetrating, the dense and less vascularized mesenchymal layer that immediately surrounded them; 6) unlike the long axis of the basal projection cells (and of most ductal MECs in the adult breast), the long axis of basal PB cells was typically perpendicular to the epithelial basement membrane.

Since IHC results obtained for CD10, KRT19, vimentin, α -SMA, and S100 β in cases F4 and F5 (described later) also supported the idea that precursors of mammary LUCs and MECs should be sought in secondary projections of second trimester breast specimens—not in their PBs—we propose that: 1) the basal PE cells in projections of cases F4 and F5 were likely to represent early MEC precursors; 2) basal cells at PS/PE junctions and in the distal half of PSs probably represented increasingly differentiated MEC precursors; and 3) basal cells in the proximal half of PSs were probably the most mature form of MEC precursors present in the second trimester fetal breasts examined in the present study. The continuous basement membrane surrounding the projections disclosed thick-

Figure 2. Immunohistochemical staining of the basal epithelial cells of second trimester fetal breasts. Staining patterns observed in primary buds (A1–N1) and projections (A2–N2) of the mammary rudiments for CD10 (A1, A2; top A2 inset: at 21 wk; bottom A2 inset: at 25 wk); CD29 (B1, B2; B2 inset: the projection end [PE]); CD49f (C1, C2); CD104 (D1, D2); KRT14 (E1, E2; PE in the E2 inset); KRT17 (F1, F2; PE in the F2 inset); KRT19 (G1, G2; PE in the G2 inset); vimentin (H1, H2); alpha-smooth muscle actin (α -SMA) (I1, I2); S100 β (J1, J2); p63 (K1, K2; in insets K1, K2, tandems of cells disclosing opposite staining properties, original magnification: \times 600); CollIV (L1, L2); CollVII (M1, M2); LN5 (N1, N2). Original magnification: \times 400 unless specified otherwise.



ness variations consistent with the last three assumptions: almost imperceptible under basal PE cells, the basement membrane thickened markedly at the PS/PE junction, suggesting that important stages of the myoepithelial differentiation process might take place at this anatomical site, to finally become uniformly thin and straight around the PSs.

It has been stated that lumen formation most probably begins during the third trimester of pregnancy [14, 19] because no clear spaces were discerned among the epithelial cells of the 16-23-wk fetal breast specimens studied. However, we and others [10, 11] documented that relatively well-defined lumens were already present in projection-like (but not PB-like) structures of mammary rudiments at the end of the second trimester of gestation (e.g., Fig. 2G2, H2). Because this discordant conclusion was based on the study of "breast buds" which apparently lacked projections (no mention, description, or illustration of projection-like structures was made in these studies), these specimens might have been studied at earlier developmental stages than ours due to "gestational age"-induced errors, or alternatively, confusion between *nipple* and *mammary gland* primordia could explain this discordance. During rodent mammary morphogenesis, a correlation reportedly exists between the phenomenon of mammary branching and that of lumen formation [21]; our LM observations indicated that these phenomena might be similarly related in humans.

Unlike the mammary glands of rodents [22, 23], mammary glands in humans are thought to disclose no sexual dimorphisms in utero [11, 19]. For reasons discussed above, we interpreted the absence of morphological differences between the PBs of the male fetal breast specimens (cases F1 and F5) and those of the female specimens as an indication that immature nipples disclosed no obvious sexual dimorphism—a result not inconsistent with the fact that nipples are well-developed in both sexes at maturity. Due to the paucity of cases available, however, it would be premature to attribute any particular significance to the fact that the PSs in the older male fetal breast specimen (case F5) seemed consistently thinner than those of a slightly younger female specimen (case F4). Although conceivably the result of a sectioning arti-

Table 3. Immunohistochemical results in basal epithelial cells and the associated basement membrane of second trimester fetal breasts^a

Target	Primary bud	Projection stalk	Projection end
CD10	-	-	- or + CM, CY
CD29	++ Cmb	++ CM, CY	+ CM, CY
CD49f	+++ Cmb, CY	+++ CM, CY	+++ CM, CY
CD104	+++ Cmb, CY	+++ CM, CY	+++ CM, CY
KRT14	++ CY	+++ CY, CYb	-/+ CY
KRT17	+++ Cmb, CY	+++ Cmb, CY	-/+ CY
KRT19	++ Cmb, CY	-/+ CY	-
Vimentin	-	++ CY	++ CY
α-SMA	-	-/+ or +/+++ CY	-/+ or +/+++ CY
S100β	-	-	++ N
P63	-/+ N	-/+ N	-/+ N
CollIV	+ BM, Cmb	++ BM, Cmb	+ BM, Cmb
CollVII	+++ BM, Cmb, CYb	+++ BM, Cmb, CYb	+++ BM, Cmb, CYb
LN5	+++ BM, Cmb, CYb	+++ BM, Cmb, CYb	+++ BM, Cmb, CYb

^aIntensity of the staining: -, null; +, weak; ++, moderate; +++, strong. Distribution pattern at the cellular level: BM, basement membrane; CM, cell membranes; CY, cytoplasm; N, nucleus; b, basal polarization. Intraspecimen/intrasubdivision variations are designated by slashes; "or" indicates that interspecimen variations were observed.

fact, this finding was nonetheless suggestive of mild sexual dimorphisms between male and female breast specimens at the end of the second trimester. The fact that nipple primordia might have been mistaken for mammary gland primordia in prior studies of fetal breasts could explain why mild dimorphisms have not yet been described in

fetal human mammary glands as opposed to that of rodents.

Immunohistochemistry

According to the literature [24–26] and personal observations (manuscript in preparation), staining for CD10—also referred to as CALLA, NEP—is specifically observed along the apical and lateral membranes of MECs in the adult breast parenchyma; in the mammary gland of infants, staining for CD10 has been described as uniform and confined to basal mammary epithelial cells [27]. In the present study of fetal breasts, staining differences were observed between cases F4 and F5, i.e., CD10 immunoreactivity was only seen in the basal projection cells of the latter. Although these differences were most likely age-related, the possibility that they might have been sex-related (case F4/female at 21 wk GA versus case F5/male at 25 wk GA) cannot be completely ruled out. In the adult breast parenchyma, basal mammary epithelial cells unreactive for CD10 are confined to the lactiferous sinuses found in nipples [28]; the absence of CD10 immunoreactivity in the basal PB cells of all our fetal specimens further supported the concept that most PB cells probably give rise to nipple basal cells rather than become typical mammary MECs.

In the adult breast parenchyma, staining for CD29, CD49f, and CD104—also respectively known as the β 1, the α 6, and the β 4 integrin subunits—is known to be stronger and more uniform in MECs than in LUCs [29–31]. Our results are in accordance with CD29 being a sensitive but non-specific marker of myoepithelial differentiation in the parenchyma of fetal breasts [32]; as reported previously in infant breasts [33], the staining patterns we observed in fetal breasts for CD49f and CD104 were very similar to that obtained for CD29. The concomitant basal polarization of these antigens within the basal epithelial cells of our specimens suggested that second trimester myoepithelial precursors might already be actively involved in the mediation of epithelial-mesenchymal interactions through CD49f-containing integrins. As recently reviewed [7], CD49f/CD104 dimers seem able to promote actin-based cell migration or, conversely, promote IF-dependent cell immobilization and differentiation through hemidesmosome for-

mation [34]; we propose that in fetal breasts, these extracellular matrix (ECM) receptors might promote both processes simultaneously, but in the basal cells of PEs and in the basal cells of PSs, respectively. Finally, the fact that the basal layers of the skin and of the mammary rudiments disclosed similar staining patterns for CD29, CD49f, and CD104 supported the notion that these integrin subunits are crucial for early differentiation events common to several basal epithelial cell types, including the human mammary myoepithelial precursors.

In the adult breast parenchyma, staining for KRT14 is predominantly myoepithelial [35, 36]. The acquisition of KRT14 expression by the basal cells of complex epithelia seems to be coordinated with their ability to stratify [37, 38]. Data regarding the onset of KRT14 expression in basal epithelial cells of the human fetal breast are scarce and often discordant between studies. Anbazhagan and collaborators, in their immunohistochemical study of fetal breasts [14], found no immunoreactive KRT14 in the breast buds of their 16–23-wk GA specimens; as heterogeneous KRT14 expression also seemed delayed in the basal cell population of the infant breasts they examined, these authors concluded that keratin expression is therefore a late marker of the basal mammary epithelial cell population. In contrast, the breasts of several fetal specimens studied by Howard and Gusterson [16] reacted with KRT14: KRT14 immunoreactivity was observed in the basal mammary epithelial cells of fetuses of 28 wk GA and beyond, but not in those of breasts “at the bud stage” of 18-wk-old fetuses. At first glance, the conclusion reached by Anbazhagan and collaborators seems to contradict these latter observations, and ours. Because, as mentioned earlier, the “breast buds” described by Anbazhagan and collaborators were apparently devoid of secondary projections, we propose that these seemingly opposing findings might result from gestational age-induced errors.

KRT17 expression is found in simple and complex epithelia but, in the latter, it is typically confined to basal cell layers [38]. In the adult breast parenchyma, KRT17 immunoreactivity is predominantly myoepithelial [35, 39]. In this study, the differences observed between the fetal staining patterns for KRT14 and KRT17 indicated

that these keratins might serve distinct physiological roles during the maturation of the mammary epithelium and the differentiation of the myoepithelial phenotype. Our staining results for KRT17 in second trimester fetal breast specimens were consistent with the assumption that actively proliferating epithelial cells strongly express this keratin.

The tissue distribution of KRT19 is unusual in that it is not confined to simple or stratified epithelia. In the latter, it can be predominantly apical or, on the contrary, exclusively basal, such as in the skin [40]. KRT19 immunoreactivity tends to be strong but uneven in LUCs of adult breasts, whereas it is typically absent from the mammary myoepithelial compartment [35]. The fact that basal PB and skin cells disclosed similar staining patterns for KRT19 suggested that both cell types might use KRT19 in a similar fashion, possibly to interact with the underlying basement membrane. As KRT19 expression is exclusively "apical" in the mammary epithelium of adults while exclusively "basal" in their skin—including the nipple epidermis [41]—the staining patterns we obtained for KRT19 in PBs versus in projections strengthened our belief that these structures corresponded to nipple and mammary gland primordia, respectively. Finally, the distribution of immunoreactive KRT19 along the PS and PE portions of mammary projections (see Table 3 and Fig. 2G2) was consistent with hypotheses proposing that KRT19-positive mammary LUCs are derived from initially KRT19-negative precursors [42, 43].

In the adult breast parenchyma, vimentin is stably coexpressed with keratins in MECs but not in LUCs [28, 35, 36]; in most other ectodermal derivatives, when present, its expression is an early and typically transient cell differentiation-related event [44]. The staining pattern we observed for vimentin in fetal mammary projections was consistent with the notion that the expression of the vimentin gene is growth-regulated in humans [45], but also seemed consistent with the notion that immature epithelial cells tend to increase their synthesis of vimentin in contexts where the establishment of cell-to-matrix rather than cell-to-cell contacts is needed [46]; this would likely be the case in the basal cells of elongating secondary projections during mammary morphogenesis. The

data published by others on vimentin expression in 16–23-wk-old fetal "breast buds" [14] were identical to the staining results we observed for this antigen in PBs and, therefore, opposite to those we obtained in fetal mammary projections. As mentioned earlier, we believe this could result from the study of fetal breast specimens younger than ours or from a confusion between nipple and mammary gland primordia.

In the adult breast parenchyma, α -SMA is specifically expressed by MECs. As a result, during the last two decades, the development of increasingly specific anti- α -SMA antibodies has led to its recognition as one of the most—if not *the* most—widely used IHC marker of MECs in breast pathology. According to some reports [14, 16, 17], fetal basal mammary epithelial cells first react with anti- α -SMA antibodies around or after mid-gestation. In the present study, α -SMA immunoreactivity was already detectable at 21 and 25 wk GA in several basal cells of fetal mammary projections. It should be noted that the staining patterns obtained for α -SMA in the PBs and in the projections of our fetal specimens resembled those normally found in the epithelium of, respectively, adult nipples and adult breasts.

The human *S100B* gene encodes a S100 protein subunit, S100b, which can form homodimers to produce the S100 β member of the S100 family of calcium-binding proteins, or heterodimers with the subunit S100a encoded by a distinct S100 gene (*S100A1*). S100 β is thought to be preferentially expressed by MECs in the adult breast parenchyma [47–49]. The limited distribution of immunoreactive S100 β in our fetal breast specimens, i.e., staining confined to the nuclei of basal projection cells, was similar to that which we have observed in distal portions of normal adult resting breasts (personal observations). Based on these data, we suggest that strong S100 β expression might be a *transient* phenomenon during the early differentiation process of mammary MECs. The transitory nature of its expression could explain why S100 β immunoreactivity seemed more intense in areas associated with parenchymal growth in fetal and adult breasts, and would be consistent with the reputed lack of sensitivity of the "S100-protein" as a marker of *differentiated* mammary MECs.

The human *TP63* gene encodes multiple homologues of the tumor-suppressor protein p53; their pivotal function in epithelial growth and regeneration processes [50, 51] indicates they might also play crucial roles in tumorigenesis. Members of the p63 family seem to be predominantly—if not exclusively—expressed by *progenitors* (basally-located stem/reserve cells) in the epithelium of many human organs [52]; in the adult breast parenchyma, p63 immunoreactivity is reportedly confined to the nuclei of MECs whereas LUCs and stromal cells do not stain for p63. According to models of epithelial stem cell behavior [53–56], symmetrical and asymmetrical cell divisions allow multipotent epithelial cells to maintain their population-size while giving rise to further-differentiated daughter cells. Because of p63's importance for the processes of growth and repair in human epithelia, we propose that the side-by-side and one-above-the-other cell pairs we observed along the basal aspects of fetal mammary projections (insets in Fig. 2K1, K2) might be the results of recent symmetrical and asymmetrical mitotic events occurring among bipotent progenitors or myoepithelial-committed progenitor/transit cells.

The adult breast parenchyma rests on a continuous basement membrane reactive with CollIV. It has been suggested that mammary MECs are responsible for its synthesis, deposition and enzymatic turnover [57, 58]. The results we obtained for CollIV in our fetal breast specimens were in accordance with comparable data previously published [15]. The fact that staining for CollIV seemed markedly enhanced at a PS/PE junction suggested that MECs precursors probably undergo important steps of their maturation process at the PS/PE junction of projections. This would be consistent with the observation that the mammary basement membrane becomes thicker as myoepithelial differentiation progresses [59], and with data published on the impacts of CollIV deposition during early developmental stages of the human breast [15, 60].

CollVII is referred to as a "minor collagen" because it can only be found on the ECM side of *epithelial* basement membranes where it assembles into hemidesmosome-related filamentous structures known as "anchoring fibrils." Whether its synthesis at the epithelial-mesenchymal junction

of the adult breast [61, 62] is restricted to MECs [63] remains to be clarified. In our fetal specimens, staining for CollVII was extensive along the basal aspect of the mammary rudiments' PBs, PSs, and PEs, but also along that of the skin and its adnexae; according to our results, CollVII might thus represent a marker of basal positioning and/or of early basal differentiation in human epithelia rather than a marker specific for cells of the human mammary myoepithelial lineage.

Several studies suggest that MECs might be the only epithelial cell type able to synthesize laminin chains of the "alpha" type in adult breasts [64]; hence, MECs would theoretically be the only mammary epithelial cell type able to synthesize, assemble, and deposit laminins such as LN5 (also referred to as "epiligrin" or "kalinin" in some studies) in the basement membrane they rest on. Mature LN5, the ligand of many integrins—including CD49f/CD29 and CD49f/CD104—promotes hemidesmosome formation in various basal epithelial cell types and is thus crucial for epithelial-mesenchymal cohesion in many organs [65]. In contrast, immature or truncated forms of LN5 have recently been shown to promote epithelial cell migration through still incompletely understood molecular mechanisms [66]. The results we obtained suggested that several epithelial and mesenchymal cell populations of fetal breasts were able to synthesize LN5 and secrete it in a polarized fashion despite their relative immaturity. The fact that staining for LN5 was weaker and more diffuse around PEs than around PSs suggested that basal PE cells might have been exposed to a greater concentration of newly synthesized/deposited—immature—immunoreactive LN5 than basal PS cells. Although detectable by IHC along both the PEs and PSs of third trimester fetal projections, we propose that in its immature and mature forms, LN5 was possibly able to simultaneously promote the penetration of the stroma by the basal cells of the PEs and the immobilization and differentiation of basal cells in the PSs.

Myoepithelial differentiation in utero

Our LM observations and IHC results for vimentin, α -SMA, and S100 β in second trimester fetal breasts' PBs and projections suggested that only the latter constituted true mammary tissue. The

basal epithelial cells of the projections, rather than those of PBs, were thus considered to be genuine precursors of the human mammary myoepithelial lineage. According to our results, their differentiation process could be a strictly spatiotemporal-regulated physiological process.

Our IHC results suggested that MEC proliferation and MEC differentiation preferentially occurred at a precise topographic location of the human mammary parenchyma: the PS/PE junction, a portion of the projections very similar to the constricted neck region of "end buds" where growth rates are known to be the highest in fetal rat mammary glands [23]. Indeed, in this area of the projections not visibly associated with changes in the composition of the supporting mesenchyme, major changes in the phenotype of basal cells were systematically observed. Namely, at or upstream from the PS/PE junction, basal projection cells adopted LM and IHC features more typical of mature MECs as they coexpressed KRT14, KRT17, vimentin, and α -SMA while remaining negative for KRT19. The staining intensity variations observed for these antigens along the projections strongly supported the intuitive idea that the basal cells in PEs were less mature than those found more proximally, along the PSs.

While the staining for CD10 and α -SMA became more intense in basal projection cells between wk 21 and 25 of gestation, staining for CD29, CD49f, and CD104 remained uniform and consistently strong; hence, even in very early stages of their differentiation, cells of the human mammary myoepithelial lineage seemed more likely than those of the mammary luminal lineage to play active roles in integrin-mediated epithelial-mesenchymal signaling. Interestingly, along fetal projections, clear spaces became centrally located, the basement membrane became more uniform, and the first branching event took place, again, at or upstream from the PS/PE junction. These observations further suggested that, in humans, as in dogs [67] and rodents [68–70], myoepithelial cells might regulate several crucial aspects of the in utero process of normal mammary morphogenesis. Finally, in the PSs of fetal breast specimens F4 and F5, the basal aspect of myoepithelial precursors and their underlying basement membrane reacted strongly with the following "hemidesmosome-related" anti-

gens targeted in this study: the integrin subunits CD29, CD49f, and CD104 (ECM membrane-bound receptors), KRT14 (cytoplasmic constituent), CollIV (extracellular anchoring plates), CollVII (extracellular anchoring fibrils), and LN5 (extracellular anchoring filaments); this also supported an early implication of the myoepithelial lineage in the mediation of local epithelial-mesenchymal interactions.

It should be noted that myoepithelial precursors of second trimester fetal breasts already disclosed IHC features of mature MECs which have been associated with cellular multipotency in human epithelia: 1) immunoreactivity for CD10, a marker of epithelial progenitors [9, 25, 71]; 2) immunoreactivity for KRT17, a marker of epithelial hyperproliferation suggestive of an incomplete cell differentiation status [44, 72, 73]; 3) immunoreactivity for p63, a recently described marker of epithelial progenitors [8, 74–76], and 4) the coexpression of vimentin and basal keratins, believed by many to be an indicator of immaturity in epithelia [44, 53, 77–79]. Whether these myoepithelial features are required to create a microenvironment suitable for the survival of breast stem cells during adulthood or whether they indicate that MECs are themselves multipotent cells remain unresolved issues.

From a more technical standpoint, our IHC results in tissue samples from fetal breasts supported the notion that keratins should probably be regarded as markers for differentiation programs rather than cell lineages [40, 44, 46, 72]; they also illustrated the high specificity of CollVII for human epithelial basement membranes, which contrasted markedly with the unspecific distribution patterns obtained in the same specimens for CollIV and LN5.

Myoepithelial differentiation in fetal versus adult breasts

We noted that while the basal PS cells of fetal breast specimens F4 and F5 shared many features of mature mammary MECs found in the ducts of adult breasts, the strong reaction obtained for vimentin in basal PE cells was more typical of the phenotype of MECs seen in TDLUs of adult breasts. Other similarities between the latter two cell types' phenotypes included a weak cytoplasmic

reaction for KRT14, and nuclear staining for S100 β (weak) and p63 (strong).

The similarities we observed between the MECs of ducts and TDLUs from mature breasts and basal PS and PE cells of fetal projections, respectively, seemed to support the concept that, after puberty, sustained mammary parenchymal growth takes place mainly in distal portions of adult resting breasts. However, because most basal PE cells did not stain for α -SMA (the MECs of ducts and TDLUs react strongly for α -SMA in the adult breast parenchyma), our data suggested that the process of myoepithelial differentiation in mature resting breasts might not be exactly the same as that which takes place before birth in mammary rudiments [14, 80].

In conclusion, the findings of the present study on the attributes of fetal precursors of mammary myoepithelial cells suggested that mammary myoepithelial differentiation is a complex, tightly time- and space-regulated process, and that several IHC markers of MECs (antigens that are smooth muscle-related or not) could prove valuable for research and diagnostic applications. Several of the antibodies used here were previously used, either alone or in various combinations, in studies characterizing neonatal myoepithelial cells; in the present study, we believe they were used simultaneously for the first time—along with antibodies against p63 and LN5—on serial sections of uniformly prepared and processed second trimester fetal breasts. Because MECs are located at the mammary epithelial-mesenchymal interface—a physiologically strategic position in a complex gland which periodically continues to grow throughout adulthood—we believe that a better understanding of their differentiation process might provide, in addition to valuable insights into breast disease, data particularly relevant for the nascent field of artificially produced human tissues and organs.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Montreal Breast Cancer Foundation (group research grant to L.A. Gaboury), the NSERC (M.Sc. grant to F. Jolicoeur), the Centre de Recherche de l'Hôpital Sainte-Justine (Ph.D. grant to F. Jolicoeur), and the Département de Pathologie et Biologie Cellu-

laire de l'Université de Montréal (Ph.D. grant to F. Jolicoeur). We thank Drs. Claude Grenier, Karim Ouallouch, and Linda Abed for their help in collecting the specimens; Mrs. Danielle Grimard for her comprehensive technical support; and Dr. Gilles Tremblay for his insightful critical reading of the manuscript.

REFERENCES

1. Hamperl H. The myoepithelia (myoepithelial cells). Normal state; regressive changes; hyperplasia; tumors. *Curr. Top. Pathol.* 1970;53:161-220.
2. Nagato T, Yoshida H, Yoshida A, Uehara Y. A scanning electron microscope study of myoepithelial cells in exocrine gland. *Cell Tissue Res.* 1980;209:1-10.
3. Vivet F, Hoang C, Lavergne A. The myoepithelial cell. Review of the literature (in French). *Arch. Anat. Cytol. Pathol.* 1983;31:301-309.
4. Foschini MP, Scarpellini F, Gown AM, Eusebi V. Differential expression of myoepithelial markers in salivary, sweat and mammary glands. *Int. J. Surg. Pathol.* 2000;8:29-37.
5. Streuli CH, Schmidhauser C, Bailey N. Laminin mediates tissue-specific gene expression in mammary epithelia. *J. Cell Biol.* 1995;129:591-603.
6. Stahl S, Weitzman S, Jones JC. The role of laminin-5 and its receptors in mammary epithelial cell branching morphogenesis. *J. Cell Sci.* 1997;110(Pt 1):55-63.
7. Mercurio AM, Rabinovitz I. Towards a mechanistic understanding of tumor invasion—lessons from the alpha 6 beta 4 integrin. *Semin. Cancer Biol.* 2001;11:129-141.
8. Barbareschi M, Pecciarini L, Cangi MG. p63, a p53 homologue, is a selective nuclear marker of myoepithelial cells of the human breast. *Am. J. Surg. Pathol.* 2001;25:1054-1060.
9. Stingl J, Eaves CJ, Kuusk U, Emerman JT. Phenotypic and functional characterization in vitro of a multipotent epithelial cell present in the normal adult human breast. *Differentiation* 1998;63:201-213.
10. Tobon H, Salazar H. Ultrastructure of the human mammary gland. I. Development of the fetal gland throughout gestation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1974;39:443-456.
11. Laurence DJ, Monaghan P, Gusterson BA. The development of the normal human breast. *Oxf. Rev. Reprod. Biol.* 1991;13:149-174.
12. Anbazhagan R, Gusterson BA. Ultrastructure and immunohistochemistry of the embryonic type of fat identified in the human infant breast. *Anat. Rec.* 1995;241:129-135.
13. Kamalati T, Niranjan B, Atherton A, Anbazhagan R, Gusterson B. Differentiation antigens in stromal and epithelial cells of the breast. *Cancer Treat. Res.* 1996;83:227-242.
14. Anbazhagan R, Osin PP, Bartkova J, Nathan B, Lane EB, Gusterson BA. The development of epithelial phenotypes in the human fetal and infant breast. *J. Pathol.* 1998;184:197-206.
15. Osin PP, Anbazhagan R, Bartkova J, Nathan B, Gusterson BA. Breast development gives insights into breast disease. *Histopathology* 1998;33:275-283.
16. Howard BA, Gusterson BA. Human breast development. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 2000;5:119-137.
17. Naccarato AG, Viacava P, Vignati S. Bio-morphological events in the development of the human female mammary gland from fetal age to puberty. *Virchows Arch.* 2000;436:431-438.
18. Hughes ESR. The development of the mammary gland. *Ann. R. Coll. Surg. Engl.* 1949;6:99-119.

19. Kellokumpu-Lehtinen P, Johansson RM, Pelliniemi LJ. Ultrastructure of human fetal mammary gland. *Anat. Rec.* 1987;218:66-72.
20. Djonov V, Andres AC, Ziemiecki A. Vascular remodelling during the normal and malignant life cycle of the mammary gland. *Microsc. Res. Tech.* 2001;52:182-189.
21. Hogg NA, Harrison CJ, Tickle C. Lumen formation in the developing mouse mammary gland. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 1983;73:39-57.
22. Durnberger H, Kratochwil K. Specificity of tissue interaction and origin of mesenchymal cells in the androgen response of the embryonic mammary gland. *Cell* 1980;19:465-471.
23. Williams JM, Daniel CW. Mammary ductal elongation: differentiation of myoepithelium and basal lamina during branching morphogenesis. *Dev. Biol.* 1983;97:274-290.
24. Metzgar RS, Borowitz MJ, Jones NH, Dowell BL. Distribution of common acute lymphoblastic leukemia antigen in nonhematopoietic tissues. *J. Exp. Med.* 1981;154:1249-1254.
25. Gusterson BA, Monaghan P, Mahendran R, Ellis J, O'Hare MJ. Identification of myoepithelial cells in human and rat breasts by anti-common acute lymphoblastic leukemia antigen antibody A12. *J. Natl. Cancer Inst.* 1986;77:343-349.
26. Mahendran R, McIlhinney R, O'Hare M, Monaghan P, Gusterson B. Expression of the common acute lymphoblastic leukaemia antigen (CALLA) in the human breast. *Mol. Cell Probes* 1989;3:39-44.
27. Atherton AJ, Anbazhagan R, Monaghan P, Bartek J, Gusterson BA. Immunolocalisation of cell surface peptidases in the developing human breast. *Differentiation* 1994;56:101-106.
28. Viale G, Gambacorta M, Coggi G, Dell'Orto P, Milani M, Doglioni C. Glial fibrillary acidic protein immunoreactivity in normal and diseased human breast. *Virchows Arch. [A]* 1991;418:339-348.
29. Koukoulis GK, Virtanen I, Korhonen M, Laitinen L, Quaranta V, Gould VE. Immunohistochemical localization of integrins in the normal, hyperplastic, and neoplastic breast. Correlations with their functions as receptors and cell adhesion molecules. *Am. J. Pathol.* 1991;139:787-799.
30. Natali PG, Nicotra MR, Bigotti A, De Martino C. Localization of the alpha 6 and beta 4 integrin subunits in normal human non-lymphoid tissues. *J. Cell Sci.* 1992;103(Pt 4):1243-1247.
31. Glukhova M, Koteliensky V, Sastre X, Thiery JP. Adhesion systems in normal breast and in invasive breast carcinoma. *Am. J. Pathol.* 1995;146:706-716.
32. Gould VE, Koukoulis GK, Virtanen I. Extracellular matrix proteins and their receptors in the normal, hyperplastic and neoplastic breast. *Cell Differ. Dev.* 1990;32:409-416.
33. Anbazhagan R, Bartkova J, Stamp G, Pignatelli M, Gusterson B, Bartek J. Expression of integrin subunits in the human infant breast correlates with morphogenesis and differentiation. *J. Pathol.* 1995;176:227-232.
34. Mercurio AM, Rabinovitz I, Shaw LM. The alpha 6 beta 4 integrin and epithelial cell migration. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2001;13:541-545.
35. Gould VE, Koukoulis GK, Jansson DS, Nagle RB, Franke WW, Moll R. Coexpression patterns of vimentin and glial filament protein with cytokeratins in the normal, hyperplastic, and neoplastic breast. *Am. J. Pathol.* 1990;137:1143-1155.
36. Bocker W, Bier B, Freytag G. An immunohistochemical study of the breast using antibodies to basal and luminal keratins, alpha-smooth muscle actin, vimentin, collagen IV and laminin. Part I: normal breast and benign proliferative lesions. *Virchows Arch. [A]* 1992;421:315-322.
37. Moll R, Franke WW, Schiller DL, Geiger B, Krepler R. The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell* 1982;31:11-24.
38. Sun TT, Eichner R, Nelson WG. Keratin classes: molecular markers for different types of epithelial differentiation. *J. Invest. Dermatol.* 1983;81(Suppl 1):109s-115s.
39. Lazard D, Sastre X, Frid MG, Glukhova MA, Thiery JP, Koteliensky VE. Expression of smooth muscle-specific proteins in myoepithelium and stromal myofibroblasts of normal and malignant human breast tissue. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1993;90:999-1003.
40. Purkis PE, Steel JB, Mackenzie IC, Nathrath WB, Leigh IM, Lane EB. Antibody markers of basal cells in complex epithelia. *J. Cell Sci.* 1990;97(Pt 1):39-50.
41. Stasiak PC, Purkis PE, Leigh IM, Lane EB. Keratin 19: predicted amino acid sequence and broad tissue distribution suggest it evolved from keratinocyte keratins. *J. Invest. Dermatol.* 1989;92:707-716.
42. Bartek J, Taylor-Papadimitriou J, Miller N, Millis R. Patterns of expression of keratin 19 as detected with monoclonal antibodies in human breast tissues and tumours. *Int. J. Cancer* 1985;36:299-306.
43. Bartek J, Bartkova J, Taylor-Papadimitriou J. Keratin 19 expression in the adult and developing human mammary gland. *Histochem. J.* 1990;22:537-544.
44. Goldman RD, Steinert PM. *Cellular and Molecular Biology of Intermediate Filaments.* New York: Plenum Press, 1990.
45. Ferrari S, Battini R, Kaczmarek L. Coding sequence and growth regulation of the human vimentin gene. *Mol. Cell Biol.* 1986;6:3614-3620.
46. Ben Ze'ev A. Application of two-dimensional gel electrophoresis in the study of cytoskeletal protein regulation during growth activation and differentiation. *Electrophoresis* 1990;11:191-200.
47. Haimoto H, Hosoda S, Kato K. Differential distribution of immunoreactive S100-alpha and S100-beta proteins in normal nonnervous human tissues. *Lab. Invest.* 1987;57:489-498.
48. Ichihara S, Koshikawa T, Nakamura S, Yatabe Y, Kato K. Epithelial hyperplasia of usual type expresses both S100-alpha and S100-beta in a heterogeneous pattern but ductal carcinoma in situ can express only S100-alpha in a monotonous pattern. *Histopathology* 1997;30:533-541.
49. Funahashi H, Koshikawa T, Ichihara S, Ohike E, Katoh K. Different distributions of immunoreactive S100-alpha and S100-beta protein expression in human breast cancer. *J. Surg. Oncol.* 1998;68:25-29.
50. Mills AA, Zheng B, Wang XJ, Vogel H, Roop DR, Bradley A. p63 is a p53 homologue required for limb and epidermal morphogenesis. *Nature* 1999;398:708-713.
51. Yang A, Schweitzer R, Sun D. p63 is essential for regenerative proliferation in limb, craniofacial and epithelial development. *Nature* 1999;398:714-718.
52. Di Como CJ, Urist MJ, Babayan I. p63 expression profiles in human normal and tumor tissues. *Clin. Cancer Res.* 2002;8:494-501.
53. Smith GH, Chepko G. Mammary epithelial stem cells. *Microsc. Res. Tech.* 2001;52:190-203.
54. Lavker RM, Sun TT. Epidermal stem cells. *J. Invest. Dermatol.* 1983;81(Suppl):121s-127s.
55. Potten CS, Loeffler M. Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt. *Development* 1990;110:1001-1020.
56. Fuchs E, Raghavan S. Getting under the skin of epidermal morphogenesis. *Nat. Rev. Genet.* 2002;3:199-209.
57. Monteagudo C, Merino MJ, San Juan J, Liotta LA, Stetler-Stevenson WG. Immunohistochemical distribution of type

- IV collagenase in normal, benign, and malignant breast tissue. *Am. J. Pathol.* 1990;136:585-592.
58. Ferguson JE, Schor AM, Howell A, Ferguson MW. Changes in the extracellular matrix of the normal human breast during the menstrual cycle. *Cell Tissue. Res.* 1992;268:167-177.
 59. Stirling JW, Chandler JA. The fine structure of the normal, resting terminal ductal-lobular unit of the female breast. *Virchows Arch. [A]* 1976;372:205-226.
 60. Wicha MS, Liotta LA, Garbisa S, Kidwell WR. Basement membrane collagen requirements for attachment and growth of mammary epithelium. *Exp. Cell Res.* 1979;124:181-190.
 61. Watson RJ, Eyden BP, Howell A, Sellwood RA. Ultrastructural observations on the basal lamina in the normal human breast. *J. Anat.* 1988;156:1-10.
 62. Eyden BP, Ferguson J. Anchoring fibrils and type VII collagen in human breast. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* 1990;22:477-479.
 63. Ozzello L. Epithelial-stromal junction of normal and dysplastic mammary glands. *Cancer* 1970;25:586-600.
 64. Slade MJ, Coope RC, Gomm JJ, Coombes RC. The human mammary gland basement membrane is integral to the polarity of luminal epithelial cells. *Exp. Cell Res.* 1999;247:267-278.
 65. Nievers MG, Schaapveld RQ, Sonnenberg A. Biology and function of hemidesmosomes. *Matrix Biol.* 1999;18:5-17.
 66. Rousselle P. Laminine 5, migration cellulaire et cancer (in French). *Med. Sci.* 2002;18:989-994.
 67. Schlotke B. Histochemical studies on the role of myoepithelial cells in the morphogenesis of mammary tumors in the bitch. I: Staining, enzyme histochemical and immunohistochemical demonstration of myoepithelial cells in the normal mammary gland (in German). *Zentralbl. Veterinarmed. [A]* 1976;23:661-669.
 68. Dulbecco R, Allen WR, Bologna M, Bowman M. Marker evolution during the development of the rat mammary gland: stem cells identified by markers and the role of myoepithelial cells. *Cancer Res.* 1986;46:2449-2456.
 69. Neville MC, Daniel CW. *The Mammary Gland. Development, Regulation, and Function.* New York: Plenum Press, 1987.
 70. Cunha GR. Role of mesenchymal-epithelial interactions in normal and abnormal development of the mammary gland and prostate. *Cancer* 1994;74(3 Suppl):1030-1044.
 71. Stingl J, Eaves CJ, Zandieh I, Emerman JT. Characterization of bipotent mammary epithelial progenitor cells in normal adult human breast tissue. *Breast Cancer Res. Treat.* 2001;67:93-109.
 72. Cooper D, Schermer A, Sun TT. Classification of human epithelia and their neoplasms using monoclonal antibodies to keratins: strategies, applications, and limitations. *Lab. Invest.* 1985;52:243-256.
 73. Troyanovsky SM, Leube RE, Franke WW. Characterization of the human gene encoding cytokeratin 17 and its expression pattern. *Eur. J. Cell Biol.* 1992;59:127-137.
 74. Signoretti S, Waltregny D, Dilks J. p63 is a prostate basal cell marker and is required for prostate development. *Am. J. Pathol.* 2000;157:1769-1775.
 75. O'Connell JT, Mutter GL, Cviko A. Identification of a basal/ reserve cell immunophenotype in benign and neoplastic endometrium: a study with the p53 homologue p63. *Gynecol. Oncol.* 2001;80:30-36.
 76. Pellegrini G, Dellambra E, Golisano O. p63 identifies keratinocyte stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2001;98:3156-3161.
 77. Raymond WA, Leong AS. Co-expression of cytokeratin and vimentin intermediate filament proteins in benign and neoplastic breast epithelium. *J. Pathol.* 1989;157:299-306.
 78. Domagala W, Striker G, Szadowska A, Dukowicz A, Harezga B, Osborn M. p53 protein and vimentin in invasive ductal NOS breast carcinoma—relationship with survival and sites of metastases. *Eur. J. Cancer* 1994;30A:1527-1534.
 79. Santini D, Ceccarelli C, Taffurelli M, Pileri S, Marrano D. Differentiation pathways in primary invasive breast carcinoma as suggested by intermediate filament and biopathological marker expression. *J. Pathol.* 1996;179:386-391.
 80. Pechoux C, Gudjonsson T, Ronnov-Jessen L, Bissell MJ, Petersen OW. Human mammary luminal epithelial cells contain progenitors to myoepithelial cells. *Dev. Biol.* 1999;206:88-99.

