

Article original

Etude immunohistochimique des facteurs de la prolifération (Ki67, PCNA) et de l'apoptose (P53) sur 40 kératokystes odontogènes

Ahlem Beltaief^{1,*}, Monia Omezzine¹, Badreddine Sriha², Mohamed Chelbi¹, Samia Ayachi¹, Zouha Mziou¹, Jed Bouguila¹, Ramzi Moatemri¹, Habib Khochtali¹

¹ Service de Chirurgie maxillofaciale, CHU Sahloul, Sousse, Tunisie

² Service de Cytologie et d'Anatomie pathologique, CHU Farhat Hached, Sousse, Tunisie

(Reçu le 14 octobre 2011, accepté le 27 octobre 2011)

Mots clés :
kératokyste
odontogène / P53 /
Ki67 / PCNA / récurrence

Résumé – Introduction : le kératokyste odontogène (KKO) est une des tumeurs odontogènes les plus fréquentes. Plusieurs travaux se sont intéressés à l'étude de cette lésion depuis sa première description afin de pouvoir comprendre son comportement biologique.

Matériel et méthode : il s'agit d'une étude rétrospective immunohistochimique des marqueurs PCNA, Ki67 et P53 chez 40 patients opérés pour un KKO.

Résultats : ces marqueurs sont retrouvés dans les couches suprabasales de l'épithélium de la paroi kystique. Il n'y a pas de différence statistiquement significative dans l'expression de ces marqueurs entre les différentes formes cliniques (sporadique, récurrent et syndromique), et il n'existe pas de corrélation entre ces marqueurs et la survenue d'une récurrence.

Conclusion : PCNA, Ki67 et P53 ne sont pas des marqueurs pour l'histopronostic des KKO.

Key words:
odontogenic
keratocyst / P53 /
Ki67 / PCNA /
recurrence

Abstract – Immunohistochemical study of proliferative (Ki67, PCNA) and apoptotic (P53) factors of 40 cases of odontogenic keratocysts. Introduction: the odontogenic keratocyst (OKC) is one of the most prevalent odontogenic tumours. Since its initial description, a number of studies have focused on different aspects of this lesion, attempting to explain its distinctive biological behavior.

Patients and methods: a retrospective immunohistochemical studies of the expression of PCNA, Ki67 and p53 protein in 40 patients treated for OKC.

Results: in the OKCs, the positivity of these markers was expressed mostly in the suprabasal layers of cystic epithelium. There is no statistically significant difference of expression between the different clinical forms (sporadic, recurrent and syndromic OKC), neither a correlation between the expression of this markers and recurrence.

Conclusion: PCNA, P53 and Ki67 can not be considered as prognostic factors of OKC.

Le kératokyste odontogène (KKO) représente 35,8 % des tumeurs odontogènes, ce qui le place au deuxième rang après l'améloblastome (40,3 % des tumeurs odontogènes) [1]. En raison de son caractère agressif et récidivant, le KKO (forme parakératosique) est apparu pour la première fois dans la classification de l'OMS des tumeurs de la tête et du cou, mise à jour en 2005 [2]; il est classé parmi les tumeurs odontogènes bénignes épithéliales avec stroma fibreux mature, sans induction de l'ectomésenchyme odontogène.

Le but de cette étude est d'analyser la corrélation entre la forme clinique, le type histologique, le profil immunohistochimique (P53, Ki67 et PCNA) et la survenue de récurrence.

Matériel et méthode

Une étude rétrospective des dossiers de patients opérés pour un KKO dans le Service de Chirurgie maxillofaciale du Centre hospitalo-universitaire Sahloul (Sousse, Tunisie), entre

* Correspondance : drbeltaief@gmail.com

1987 et 2007, a été réalisée. Pour chaque pièce opératoire, une étude immunohistochimique a été effectuée dans le Laboratoire de Cytologie et d'Anatomie pathologique de l'Hôpital Farhat Hached (Sousse, Tunisie).

Tous les patients opérés pour KKO au cours de cette période ont été inclus, c'est-à-dire qu'il y avait au moins un recul de 4 ans après la dernière intervention.

Pour l'étude des facteurs de prolifération et de l'apoptose, les anticorps suivants ont été étudiés : P53, Ki67 et PCNA et leur corrélation avec l'existence d'une récurrence.

Les autres variables étudiées sont l'âge, le sexe et le type histologique

Résultats

Quarante patients ont été inclus soit 52 KKO maxillaires ou mandibulaires ; lorsqu'il existait plusieurs KKO chez un patient, un KKO a été étudié. Il s'agit de 23 femmes et 17 hommes. L'âge moyen est de 34,7 ans (de 10 à 75 ans). Vingt huit cas étaient sporadiques, 6 récidivants et 6 syndromiques (naevomatose basocellulaire).

L'étude histologique a montré que 33 cas étaient parakératosiques et 7 cas orthokératosiques. La présence des 3 marqueurs a été observée dans les couches suprabasales de l'épithélium de la paroi kystique. La P53 était positive dans 10 cas (25 %) (Tab. I), le Ki67 dans 10 cas (25 %) (Tab. II), PCNA dans 100 % des cas (Tab. III). La forme parakératosique a présenté une positivité plus fréquente pour les trois marqueurs mais sans différence statistiquement significative (Tab. IV).

Tableau I. Etude de l'expression de la P53.

Table I. Study of P53 expression.

P53	Effectif	Pourcentage (%)
Positif	10	25
Marquage intense	1	2,5
Marquage modéré	5	12,5
Marquage faible	4	10
Négatif	30	75
Total	40	100

Tableau II. Etude de l'expression de Ki67.

Table II. Study of Ki67 expression.

Ki67	Effectif	Pourcentage (%)
Positif	10	25
Marquage intense	0	0
Marquage modéré	3	7,5
Marquage faible	7	17,5
Négatif	30	75
Total	40	100

L'expression de la P53 entre les différentes formes cliniques de KKO (sporadique, récidivant et syndromique) n'a pas montré de différence d'expression statistiquement significative ($p = 0,191$) (Tab. V). Il n'y a pas de différence statistiquement significative ($p = 0,096$) dans l'expression de Ki67, en particulier pour les KKO récidivants et syndromiques (Tab. VI) ; aucun cas de KKO syndromique n'a exprimé cet anticorps. Toutes les formes cliniques de KKO ont exprimé un marquage

Tableau III. Etude de l'expression de PCNA.

Table III. Study of PCNA expression.

PCNA	Effectif	Pourcentage (%)
Positif	40	100
Marquage intense	22	55
Marquage modéré	14	35
Marquage faible	4	10
Négatif	0	0
Total	40	100

Tableau IV. Corrélation entre les marqueurs immuno-histochimiques et le type histologique.

Table IV. Correlation between immunohistochemical factors and histologic type.

Marqueurs	P 53 positif ($P = 0,567$)	Ki67 positif ($P = 0,880$)	PCNA positif
Type histologique			
Parakératosique	9	8	33
Orthokératosique	1	2	7

Tableau V. Corrélation entre l'expression de la P53 et la forme clinique.

Table V. Correlation between P53 expression and clinical form.

	P53 positif	P53 négatif	Total
KKO sporadiques	5 (17,85 %)	23 (82,15 %)	28
KKO récurrents	2 (33,33 %)	4 (66,66 %)	6
KKO syndromiques	3 (50 %)	3 (50 %)	6
Total	10	30	40

Tableau VI. Corrélation entre l'expression de Ki67 et la forme clinique.

Table VI. Correlation between Ki67 expression and clinical form.

	Ki67 positif	Ki67 négatif	Total
KKO sporadiques	6 (21,42 %)	22 (78,58 %)	28
KKO récidivants	4 (66,66 %)	2 (33,33 %)	6
KKO syndromiques	0 (0 %)	6 (100 %)	6
Total	10	30	40

Tableau VII. Corrélation entre l'expression de PCNA et la forme clinique.

Table VII. Correlation between PCNA expression and clinical form.

PCNA	1+	2+	3+	Total
Forme clinique				
KKO sporadiques	3 (10,71 %)	10 (35,71 %)	15 (53,57 %)	28
KKO récidivants	1 (16,66 %)	2 (33,33 %)	3 (50 %)	6
KKO syndromiques	1 (16,66 %)	1 (16,66 %)	4 (66,66 %)	6
Total	5	13	22	40

Tableau VIII. Corrélation entre l'expression de PCNA et la récurrence.

Table VIII. Correlation between PCNA expression and recurrence.

PCNA	Récidive		Total
	Oui	Non	
1+	2 (50 %)	2	4
2+	3 (21,42 %)	11	14
3+	5 (22,72 %)	17	22

intense (3+) prédominant pour le PCNA, sans différence statistiquement significative entre elles (Tab. VII).

L'étude de l'expression de la P53 corrélée à la survenue de récurrence n'a pas montré de différence statistiquement significative ($p = 0,512$). En effet, parmi les 10 cas de KKO qui ont exprimé cet anticorps, 4 cas (40 %) ont récidivé et 2 de ces

4 cas étaient des KKO syndromiques (naevomatose basocellulaire).

De même, il n'y a pas de différence statistiquement significative dans l'expression de Ki67 dans les différentes formes cliniques et la survenue de récurrence ($p = 0,478$). Parmi les KKO positifs pour le Ki67, 30 % (3/10) ont récidivé : ces kystes étaient tous des KKO récidivants et aucun cas de KKO syndromique n'a récidivé.

Il n'existe pas de corrélation entre l'intensité de l'expression de PCNA et la survenue de récurrence ($\chi^2 = 0,475$) (Tab. VIII).

Discussion

Dans ce travail, on a réalisé une étude immunohistochemique des facteurs de prolifération et de l'apoptose dans les KKO pour savoir si leur présence avait un intérêt pronostique. Pour cela, l'expression de P53, Ki67 et PCNA dans l'épithélium de la paroi kystique a été recherchée.

Le mécanisme biologique associé à l'expression de la P53 dans l'épithélium de la paroi des KKO n'est pas encore bien défini, mais l'agressivité et le fort potentiel de récurrence de ces lésions pourraient être en rapport avec l'expression de cette protéine selon Lombardi et al. [3]. En conséquence, certains auteurs se sont orientés vers l'étude de l'expression de la P53 en cherchant à établir l'existence d'une corrélation entre l'expression de cette protéine et la survenue de récurrence des KKO [4-6]. Dans cette étude, 10 cas étaient positifs pour la P53 ; comme cela a déjà été précisé [4, 6-11], cette positivité a été observée dans les couches suprabasales de l'épithélium.

Tableau IX. Comparaison de l'expression de la P53 selon la forme clinique.

Table IX. Comparison of P53 expression in different clinical forms.

	N	P53 (+)	KKO sporadiques	KKO récurrents	KKO syndromiques	P
Lombardi et al. (1995)	30	50	53,33 %	40 %	60 %	0,666
Li et al. (1996)	22	45,45 %	36,36 %	40 %	66,66 %	0,1
Gurgel et al. (2008)	37	91,89 %	66,66 %	85,70 %	100 %	0,319
Notre étude	40	25 %	17,85 %	66,66 %	50 %	0,191

Tableau X. Comparaison de l'expression de Ki67 selon la forme clinique du KKO.

Table X. Comparison of Ki67 expression in different clinical forms.

	N	Ki67(+)	KKO sporadiques	KKO récurrents	KKO syndromiques	P
Li et al. (1995)	27	77,77 %	50 %	100 %	88,88 %	<0,009
Gurgel et al. (2008)	37	97,30 %	100 %	2,85 %	100 %	0,7013
Norio et al. (2009)	32	87,50 %	71,42 %	100 %	0 %	0,025
Notre étude	40	25 %	21,42 %	66,66 %	0 %	0,096

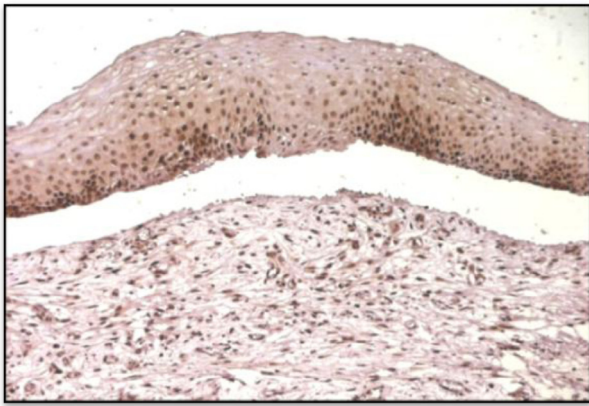


Fig. 1. Immunomarquage modéré (2+) avec l'anticorps anti-PCNA (grossissement $\times 100$).

Fig. 1. Moderate (2+) positive immunoreactivity with antibody anti-PCNA (magnificiance $\times 100$).

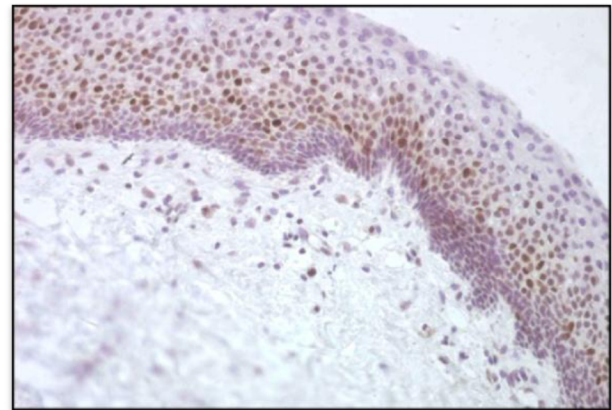


Fig. 3. Immunomarquage modéré avec l'anticorps anti-P53 (grossissement $\times 200$).

Fig. 3. Moderate immunoreactivity with the antibody anti-P53 (magnificiance $\times 200$).

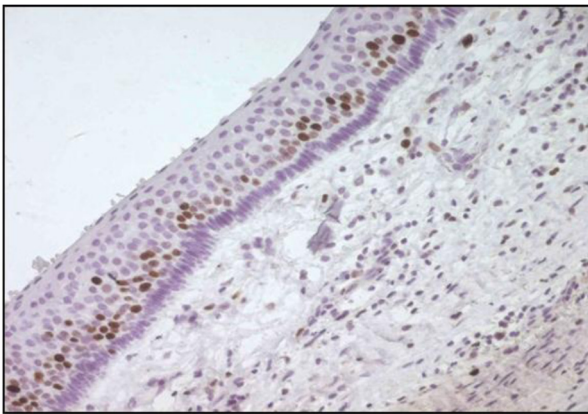


Fig. 2. Immunomarquage faible (1+) avec l'anticorps anti-Ki67 (grossissement $\times 200$).

Fig. 2. Weak immunoreactivity (1+) with the antibody anti-Ki67 (magnificiance $\times 200$).

La comparaison de l'expression de la P53 dans les différentes formes cliniques n'a pas montré de différence statistiquement significative ($\chi^2 = 0.191$). Nos résultats concordent avec ce qui a déjà été publié [3,8,9,11]. Dans les KKO, il existe une l'hyperexpression de la P53 par rapport aux autres kystes odontogènes. Pour Li et al. [8], cette hyperexpression n'est pas secondaire à une mutation du gène p53 mais plutôt le résultat d'une hyperproduction et /ou une stabilisation de la protéine P53 de phénotype normal dont la production évoluerait parallèlement à la prolifération cellulaire [12]. Selon Sloomweg [6], l'hyperproduction de P53 serait plus en relation avec la capacité proliférative des KKO qu'avec l'augmentation des cellules contenant de la P53. D'autres études ont retrouvé une hyperexpression de la P53 dans les couches suprabasales,

concomitante à celle des facteurs de prolifération PCNA et Ki67 [13–15]. Ceci tend à confirmer l'hypothèse que la forte expression de la P53 dans les KKO est probablement en rapport avec l'accumulation d'une P53, de phénotype normal, produite par la prolifération cellulaire intense existant dans ces lésions [16]. L'expression de la P53 est faible dans les couches superficielles [4] car l'apoptose ne se fait pas à ce niveau.

Dans cette étude, le Ki67 était positif dans 10 cas ; aucun cas de KKO syndromique n'a présenté une positivité pour ce marqueur. L'expression de Ki67 n'est pas corrélée aux différentes formes cliniques de KKO. Le Ki67 ne semble pas être un marqueur spécifique des KKO syndromiques ni un marqueur pronostique prédictif de la survenue de récurrence. En effet, la forte positivité de l'expression de Ki67 dans les KKO comparativement à celle observée dans les kystes inflammatoires et dentigères confirme l'importance du potentiel prolifératif des KKO [17]. La localisation de cette positivité dans les couches suprabasales, associée à l'expression de PCNA et de la P53, montre que le pouvoir prolifératif intrinsèque de l'épithélium des KKO se situe à ce niveau [17]. Nos résultats concordent avec ceux de plusieurs études [4, 17–20] qui ont retrouvé une concentration de Ki67 dans les couches suprabasales des KKO sporadiques et une expression uniforme, intéressant toute l'épaisseur de l'épithélium, dans les KKO de la naevomatose basocellulaire. Ces résultats ont fait suspecter une dysrégulation du cycle cellulaire et la présence d'un compartiment prolifératif suprabasal dans l'épithélium des KKO. Selon Kim et al. [17], il n'existe pas de corrélation entre l'expression de Ki67 et la survenue de récurrence et ils ont émis une hypothèse alternative pour expliquer le fort potentiel de récurrence : il serait dû à une augmentation des collagénases, des prostaglandines et des enzymes oxydatives actives. Araujo et al. [11] aussi n'ont pas trouvé de différence significative dans l'expression de Ki67 entre les KKO sporadiques et syndromiques ($p = 0,701$) (Tab. X).

Par contre, dans les KKO syndromiques, Li et al. [21] ont constaté une surexpression de Ki67 statistiquement significative ($p < 0,009$) ce qui correspond à un potentiel de récurrence plus élevé dans cette variété clinique (Tab. X). Nori et al. [22] ont remarqué une intense expression de Ki67 dans les couches suprabasales des KKO récidivants ($p = 0,025$) (Tab. X) et ils en ont conclu que cet antigène nucléaire peut être considéré comme un marqueur pronostique de récurrence et que son évaluation au moment du diagnostic anatomopathologique serait utile pour le suivi postopératoire.

Dans cette étude, 100 % des kystes ont exprimé le PCNA et on n'a pas remarqué de différence statistiquement significative de l'expression de PCNA selon le type de KKO ni dans l'intensité de la positivité et la survenue de récurrence ($p = 0,519$). Li et al. [21], Shear [23] et De Oliveira et al. [24] ont démontré que l'épithélium de la paroi des KKO se distingue de celui des autres kystes odontogènes par la concentration de PCNA dans les couches basales et suprabasales, ce qui suggère la présence d'un potentiel prolifératif à ce niveau.

Shear [20, 23] a montré que l'expression de PCNA est plus particulièrement associée à la naevomatose basocellulaire. Pour El Murtadi et al. [25] et Browne [26], la présence de kystes « filles » qui est associée à l'expression de PCNA, constitue un bon indicateur pour la survenue de récurrences.

Cependant, certaines études ont montré le rôle de SHH et PTCH dans la pathogénie des KKO [27, 28], et ont proposé une thérapie à base de cyclopamine pour diminuer la fréquence des récurrences [29]. La découverte et la caractérisation de la voie de RANK/RANKL/OPG et l'identification de son rôle dans la résorption osseuse [30, 31] ont apporté les éléments pour la recherche d'un traitement modulant l'ostéoclastogénèse RANK induite [28].

Conflits d'intérêt : aucun

Références

- Jing W, Xuan M, Lin Y, Liu L, Zheng X, Tang W, Qiao J, Tian W. Odontogenic tumours: a retrospective study of 1642 cases in a Chinese population. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2007;36:20-5.
- Betaineh AB, Al Qudah M. Treatment of mandibular odontogenic keratocysts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1998;86:42-7.
- Lombardi T, Odell EW, Morgan PR. P53 immunohistochemistry of odontogenic keratocysts in relation to recurrence, basal-cell budding and basal-cell naevus syndrome. *Arch Oral Biol* 1995;40:1081-4.
- Kichi E, Enokiya Y, Muramatsu T, Hashimoto S, Inoue T, Abiko Y, Shimono M. Cell proliferation, apoptosis and apoptosis-related factors in odontogenic keratocysts and in dentigerous cysts. *J Oral Pathol Med* 2005;34:280-6.
- Ogden GR, Kiddie RA, Lunny DP, Lane DP. Assessment of p53 protein expression in normal, benign, and malignant oral mucosa. *J Pathol* 1992;166:389-94.
- Slootweg PJ. P53 protein and Ki-67 reactivity in epithelial odontogenic lesions. An immunohistochemical study. *J Oral Pathol Med* 1995;24:393-7.
- Bornstein MM, Filippi A, Altermatt HJ, Lambrecht JT, Buser D. Le kératokyste odontogène: kyste odontogène ou tumeur bénigne? *Rev Mens Suisse Odontostomatol* 2005;115:123-8.
- Li TJ, Browne RM, Prime SS, Paterson IC, Matthews JB. P53 expression in odontogenic keratocyst epithelium. *J Oral Pathol Med* 1996;25:245-55.
- Piattelli A, Fioroni M, Santinelli A, Rubini C. P53 protein expression in odontogenic cysts. *J Endod* 2001;27:459-61.
- Kolar Z, Geierova M, Bouchal J, Pazdera J, Zboril V, Tvrdy P. Immunohistochemical analysis of the biological potential of odontogenic keratocysts. *J Oral Pathol Med* 2006; 35:75-80.
- Gurgel CA, Ramos EA, Azevedo RA, Sarmiento VA, Da Silva Carvalho AM, Dos Santos JN. Expression of Ki67, p53 and p63 proteins in keratocyst odontogenic tumors: an immunohistochemical study. *J Mol Histol* 2008;39:311-6.
- Regezi JA. Odontogenic cysts, odontogenic tumors, fibrous, and giant cell lesions of the jaws. *Mod Pathol* 2002;15:331-41.
- Agaram NP, Collins BM, Barnes L, Lomago D, Aldeeb D, Swalsky P, Finkelstein S, Hunt JL. Molecular analysis to demonstrate that odontogenic keratocysts are neoplastic. *Arch Pathol Lab Med* 2004;128:313-7.
- Nishimaki H, Kasai K, Kozaki K, Takeo T, Ikeda H, Saga S, Nitta M, Itoh G. A role of activated Sonic hedgehog signaling for the cellular proliferation of oral squamous cell carcinoma cell line. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;314:313-20.
- Makowski GJ, McGuff S, Van Sickels JE. Squamous cell carcinoma in a maxillary odontogenic keratocyst. *J Oral Maxillofac Surg* 2001;59:76-80.
- Barnes EA, Heidtman KJ, Donoghue DJ. Constitutive activation of the shh-ptc1 pathway by a patched1 mutation identified in BCC. *Oncogene* 2005;24:902-15.
- Kim DK, Ahn SG, Kim J, Yoon JH. Comparative Ki-67 expression and apoptosis in the odontogenic keratocyst associated with or without an impacted tooth in addition to unilocular and multilocular varieties. *Yonsei Med J* 2003;44:841-6.
- Kaplan I, Hirshberg A. The correlation between epithelial cell proliferation and inflammation in odontogenic keratocyst. *Oral Oncol* 2004;40:985-91.
- Lo Muzio L, Staibano S, Pannone G, Bucci P, Nocini PF, Bucci E, De Rosa G. Expression of cell cycle and apoptosis-related proteins in sporadic odontogenic keratocyst and odontogenic keratocyst associated with the nevoid basal cell carcinoma syndrome. *J Dent Res* 1999;78:1345-5.
- Shear M. The aggressive nature of the odontogenic keratocyst: is it a benign cystic neoplasm? Part 3. Immunocytochemistry of cytokeratin and other epithelial cell markers. *Oncology* 2002;8:407-15.
- Li TJ, Browne RM, Matthews JB. Epithelial cell proliferation in odontogenic keratocysts. A comparative immunohistochemical study of Ki67 in simple, recurrent and basal cell naevus syndrome (BCNS)-associated lesions. *J Oral Pathol Med* 1995;24:221-6.
- Kuroyanagi N, Sakuma H, Miyabe S, Machida J, Kaetsu A, Yokoi M, Maeda H, Warnakulasuriya S, Nagao T, Shimozaoto K. Prognostic

- factors for keratocystic odontogenic tumor (odontogenic keratocyst): analysis of clinico-pathologic and immunohistochemical findings in cysts treated by enucleation. *J Oral Pathol Med* 2009;38:386-92.
23. Shear M. The aggressive nature of the odontogenic keratocyst: is it a benign cystic neoplasm? Part 2. Proliferation and genetic studies. *Oral Oncol* 2002;38:323-31.
 24. De Oliveira MG, Lauxen Ida S, Chaves AC, Rados PV, Sant'Ana Filho M. Immunohistochemical analysis of the patterns of p53 and PCNA expression in odontogenic cystic lesions. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2008;13:275-80.
 25. El Murtadi A, Grehan D, Toner M, Mc Cartan BE. Proliferating cell nuclear antigen staining in syndrome and non syndrome odontogenic keratocysts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1996;81:217-20.
 26. Browne RM. The odontogenic keratocyst. Histological features and their correlations with clinical behaviour. *Br Dent J* 1971;131:249-59.
 27. Li TJ, Browne RM, Matthews JB. Expression of epidermal growth factor receptors by odontogenic jaw cysts. *Pathol Anat Histopathol* 1993;423:137-44.
 28. Meghji S. et al. The role of endotoxin and cytokeratines in the pathogenesis of odontogenic cysts. *Arch Oral Biol* 1996;41:523-31.
 29. Taipale J, Chen JK, Cooper MK, Wang B, Mann RK, Milenkovic L, Scott MP, Beachy PA. Effects of oncogenic mutations in smoothened and patched can be reversed by cyclopamine. *Nature* 2000;406:1005-9.
 30. Da Silva TA, Batista AC, Mendonça EF, Leles CR, Fukada S, Cunha FQ. Comparative expression of RANK, RANKL, and OPG in keratocystic odontogenic tumors, ameloblastomas, and dentigerous cysts. *Oral Maxillofac Pathol* 2008;105:333-41.
 31. Wang EB, Cui NH, Shibahara T, Nomura T, Yu GY. Histochemical and immunohistochemical double staining of osteolytic related factors in keratocystic odontogenic tumour. *Beijing Da Xue Xue Bao* 2010;42:85-9.