

UNIVERSITE SIDI MOHAMMED BEN ABDELLAH
FACULTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE

FES



Année 2009

Thèse N° 135/09

LA CLASSIFICATION MOLÉCULAIRE DU CANCER DU SEIN

THESE

PRESENTEE ET SOUTENUE PUBLIQUEMENT LE 21/12/2009

PAR

Mme. CHAHBOUNI SANAË

Née le 28 Juillet 1982 à FES

POUR L'OBTENTION DU DOCTORAT EN MEDECINE

MOTS-CLES :

Cancer du sein - classification moléculaire - Immunohistochimie
Pronostic

JURY

M. BANANI ABDELAZIZ.....	PRESIDENT
Professeur de Gynécologie Obstétrique	
Mme. AMARTI RIFFI AFAF.....	RAPPORTEUR
Professeur d'Anatomie pathologique	
M. MELHOUF MY ABDELILAH.....	} JUGE
Professeur de Gynécologie Obstétrique	
Mme. BOUCHIKHI CHEHRAZED.....	} MEMBRE ASSOCIE
Professeur agrégé de Gynécologie Obstétrique	
M. EL MESBAHI OMAR.....	
Professeur assistant d'Oncologie médicale	

PLAN

INTRODUCTION	7
HISTOLOGIE, MORPHOLOGIE, ET IHC DU SEIN NORMAL	10
I- Structure générale.....	11
II- Le lobule.....	12
1-structure	12
2-la cellule épithéliale	14
2-1- Aspect morphologique	14
2-2- Aspect immunohistochimique	15
3-la cellule myoépithéliale.....	17
3-1- Aspect morphologique	17
3-2- Aspect immunohistochimique	17
4-la membrane basale	18
5-Le tissu palléal.....	18
CLASSIFICATION DE L'OMS.....	19
1-Carcinomes non infiltrants	22
1-1- Carcinome canalaire in situ (intra-canalaire)	22
1-1-1- Le grade nucléaire	22
1-1-2- La nécrose tumorale	22
1-1-3- Le type architectural	22
1-2- Carcinome lobulaire in situ	24
2-Carcinomes canauxiaux infiltrants de type non spécifique	24
3-Carcinomes lobulaires infiltrants	26
4-Carcinomes tubuleux	26
5-Carcinomes médullaires	26
6-Carcinomes mucineux.....	27
7-Carcinomes adénoïdes kystiques ou cylindromes.....	27
8-Carcinomes inflammatoires.....	27
9-Maladie de paget du mamelon.....	28
CLASSIFICATION ANATOMO-CLINIQUE (TNM).....	29
I-Classification clinique	30
1-Classification de la tumeur primitive (T)	30
2-Classification des adénopathies régionales (N)	31
3-Classification des métastases à distance (M).....	32
II-Classification histo-pathologique	32
1- Classification de la tumeur primitive (pT)	32
2-Classification des adénopathies régionales (pN)	32

III- Groupement en stades	34
IV- Au Total.....	38
MATERIELS ET METHODES.....	39
I-Matériels.....	40
II-Méthodes.....	40
1-Fiche d'exploitation	40
2-Etape macroscopique.....	40
2-1- Généralités	40
2-2- La biopsie	41
2-3- Exérèse partielle d'un cancer infiltrant	41
2-4- Mastectomie	42
2-5- Curage axillaire.....	43
3-Histologie.....	43
3-1- L'obtention des coupes	43
3-2- La coloration des coupes par Hématéine-Eosine-Safran (HES)	44
3-3- L'étude en microscopie optique	45
4-Classification histologique	45
5-Classification moléculaire	45
6-Saisie et analyse des données	46
RESULTATS.....	48
I-Caractéristiques générales de la population.....	49
1-Répartition selon l'âge	49
2-Type de prélèvement	49
3-Type histologique.....	50
4-Le grade SBR	51
5-La taille en cm	51
6-La taille TNM	52
7-L'envahissement ganglionnaire	52
8-La présence de métastases à distance	53
9-Les embolies vasculaires.....	53
10-L'association avec une composante intracanalair	53
11-Profil d'expression des récepteurs hormonaux et de l'Her-2.....	53
II-Classification moléculaire du cancer du sein	54
1-Selon l'âge.....	59
2-Selon le type histologique	59
3-Selon le grade SBR	60
4-Selon la présence d'embolies vasculaires.....	60
5-Selon l'association avec un carcinome in situ.....	61

6-Selon la taille tumorale	61
7-Selon l'envahissement ganglionnaire.....	62
8-Selon la présence de métastases à distance.....	62
III- Analyse multivariée des métastases à distance.....	63
DISCUSSION	64
I- Problématique de la prise en charge des cancers du sein	65
II- Bases immunohistochimiques.....	67
1-Technique	68
1-1-Choix de l'échantillon pour la technique immunohistochimique	68
1-2-Fixation – imprégnation en paraffine	68
1-3-Adhérence des coupes	69
1-4-Restauration antigénique par la chaleur	69
1-5-Anticorps primaires.....	70
1-6-Systèmes révélateurs.....	70
1-7-Contre coloration	71
1-8-Automatisation	71
1-9-Témoins	71
2-Lecture.....	72
2-1- Récepteurs hormonaux	72
2-1-1- Appréciation des marquages.....	72
2-1-2- Chiffrage des résultats – valeur seuil.....	73
2-1-3- Interprétation des tumeurs sans marquage avec des glandes non tumorales négatives ou absentes.....	74
2-2- Her-2	75
2-2-1- Appréciation des marquages	75
2-2-2- Chiffrage des résultats	75
III- Bases génétiques.....	77
1-Altérations génétiques somatiques dans le cancer du sein.....	77
1-1Méthode d'étude des altérations somatiques	77
1-1-1-Mesure du contenu en ADN	77
1-1-2-Analyse cytogénétique.....	77
1-1-3-Hybridation in situ.....	78
1-1-4-Analyse moléculaire.....	78
1-2-Gènes altérés dans le cancer du sein	78
1-2-1- Amplification et surexpression de proto-oncogènes	78
1-2-2- Inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs	80
2- Profils d'expression géniques en cancérologie mammaire.....	83
IV- Les sous types du cancer du sein	88
1- Type luminal	89

1-1- Type luminal A.....	90
1-1-1- Caractères morphologiques	90
1-1-2- Caractères immunohistochimiques	90
1-1-3- Corrélation histo-pronostique	91
1-1-4- Implications thérapeutiques.....	91
1-2- Type luminal B	91
1-2-1- Caractères morphologiques	91
1-2-2- Caractères immunohistochimiques	92
1-2-3- Corrélation histo-pronostique	92
1-2-4- Implications thérapeutiques.....	92
2- Type normal	93
3- Type Her-2	93
3-1- Caractères morphologiques.....	93
3-2- Caractères immunohistochimiques	94
3-3- Corrélation histo-pronostique	94
3-4- Implications thérapeutiques	94
4- Type basal	95
4-1- Caractères morphologiques.....	95
4-2- Caractères immunohistochimiques	95
4-3- Corrélation histo-pronostique	96
4-4- Implications thérapeutiques	96
V. Limites de cette classification.....	97
 CONCLUSION ET PERSPECTIVES	 98
RESUME	100
REFERENCES	106

ABREVIATIONS

ADN	: Acide désoxyribonucléique
ARN	: Acide Ribonucléique
ATM	: Ataxia-Telangiectasia-Mutated
BLBK	: Basal Like Breast Kancer
BRCA	: Breast Cancer susceptibility gene
CCDN1	: Cyclin D1
CCI	: Carcinome canalaire infiltrant
CCIS	: Carcinome Canalaire In Situ
CDH1	: Cadherin 1
c-erbB-2	: Erythroblastic Leukemia Viral Oncogene Homolog 2
CGH	: Comparative Genomic Hybridization
CIS	: Carcinome In Situ
CISH	: Chromogenic In Situ Hybridization
CK	: cytokératine
CLI	: Carcinome lobulaire infiltrant
CLIS	: Carcinome Lobulaire In Situ
CT	: chimiothérapie
DCIS	: Ductal Carcinoma In Situ
EDTA	: Acide Ethylène Diamine Tetra Acétique
EGF	: Epidermal Growth Factor
EGFR	: Epidermal Growth Factor Receptor
ER	: Estrogen Receptor
ESR1	: Estrogen Receptor 1
FGF	: Fibroblast Growth Factor
FGFR	: Fibroblast Growth Factor Receptors
FISH	: Fluorescence In Situ Hybridization
FLOT2	: Flotillin 2
GATA3	: GATA binding protein 3
GRB7	: Growth Factor Receptor Bound Protein 7
HER-2	: Human Epidermal growth factor Receptor 2
HER-2/neu	: Human Epidermal growth factor Receptor Neuro/glioblastoma 2
HES	: Hématoxyline-Eosine-Safran
HNF3	: Hepatocyte Nuclear Factor 3
HT	: hormonothérapie
IGF 1	: Insulin-like Growth Factor 1
IGF 1R	: Insulin-like Growth Factor 1 Receptor
IHC	: Immunohistochimie

Ki-67	: cell cycle related nuclear protein
KRT18	: Kératine 18
LCIS	: Lobular Carcinoma In Situ
LIN	: Néoplasie Intra-Lobulaire
LOH	: Loss Of Heterogysosity
MALT	: Mucosa-Associated Lymphoid Tissue
MAP Kinase	: Mitogen-Activated Protein Kinase
MIB-1	Mindbomb Homolog 1
MUC1	: Mucine 1
MYBL2	: Myeloblastosis Like 2
MYC	: Myelocytomatosis oncogene
OMS	: Organisation mondiale de la santé
P53	: protéine 53
P63	: protéine 63
PAI1	: Plasminogen Activator Inhibitor-1
RE	: Récepteur Œstrogénique
RH	: Recepteurs Hormonaux
RP	: Récepteur Progestatif
RT-PCR	: Reverse Transcriptase- Polymerase Chain Reaction
SAI	: Sans Autre Indication
SBR	: Scarff Bloom et Richardson
TDLU	: Terminal Duct Lobular Unit
TMA	: Tissue Microarrays
TN	: Triple Négatifs
TNS	: Type Non Spécifique
UPA	: Urokinase-type Plasminogen Activator
XBP1	: X-box Binding Protein 1

INTRODUCTION

Le cancer du sein est le cancer le plus fréquent dans le monde, c'est la deuxième cause de décès par cancer [1]. Il prend naissance des cellules épithéliales qui tapissent l'unité terminale ductulo-lobulaire et on peut le classer comme carcinome invasif ou non invasif selon le franchissement ou non de la membrane basale. Le carcinome invasif est divisé en deux principales catégories : le carcinome canalaire infiltrant qui constitue 80 % des cas, et le carcinome lobulaire qui constitue 10 à 15 % des cas. Certaines tumeurs montrent des aspects de proliférations et des morphologies cellulaires différentes et elles sont classées en se basant sur ces caractéristiques comme par exemple le tubulaire, le mucineux, le médullaire, le papillaire et le cribriforme.

Les traitements systémiques (chimiothérapie CT, hormonothérapie HT, thérapeutiques ciblées) sont délivrés sur la base de facteurs pronostiques et prédictifs de la réponse thérapeutique. Malheureusement, malgré l'évolution considérable qu'a connue depuis une quinzaine d'années la prise en charge du cancer du sein [2], le dépistage et les traitements avec une bonne survie généralement, les facteurs histologiques, cliniques et moléculaires, ont globalement peu évolué et sont insuffisants pour rendre compte de l'hétérogénéité évolutive de la maladie [3], conduisant un certain nombre de patientes vers des traitements inadaptés, inutiles ou inefficaces, mais toxiques [4]. Cette incapacité à identifier ces sous-classes pronostiques coïncide aujourd'hui avec la disponibilité croissante de nouvelles molécules antitumorales [5].

Il est donc crucial d'améliorer la classification pronostique du cancer du sein pour affiner les indications thérapeutiques et améliorer les taux de survie.

Depuis plusieurs années, les techniques de biologie se sont largement répandues dans les laboratoires de recherche. De nombreuses études ont permis d'améliorer notre compréhension de l'oncogenèse mammaire en identifiant quelques gènes clés (ERBB2, P53, BRCA1/2 par exemple).

Le cancer du sein apparaît aujourd'hui comme une maladie complexe caractérisée par l'accumulation de multiples altérations moléculaires qui confèrent à chaque tumeur un phénotype et un potentiel évolutif propres.

Perou et Sorli ont utilisé la technique de puces à ADN pour créer la nouvelle classification du cancer du sein [6-7]. Ils ont démontré que cette néoplasie peut être classifiée selon les profils d'expression génique en quatre groupes :

Type luminal : tumeurs qui expriment les récepteurs oestrogéniques.

HER-2 ou Erb-B2 : tumeurs qui sur expriment l'HER-2

Type normale : dont les cellules ressemblent à celles du sein normal et aux fibroadénomes.

Type basal ou « triple négatif » : tumeurs qui n'expriment pas les récepteurs hormonaux et qui expriment les gènes trouvés normalement dans les cellules basales et myoépithéliales.

Les tumeurs de type luminal sont associées à un meilleur pronostic en comparaison avec les tumeurs de type basal ou HER-2 qui ont un profil clinique plus agressif.

HISTOLOGIE, MORPHOLOGIE, ET IHC DU SEIN NORMAL

I. Structure générale

La glande mammaire est un organe à développement continu depuis le stade embryonnaire, à travers la puberté, les cycles menstruels et la grossesse, jusqu'à l'atrophie à travers la ménopause.

Au sommet du mamelon s'abouchent 10 à 20 canaux. Certains sont rapidement borgnes mais la plupart vont, après une dilatation ampullaire fusiforme appelée sinus lactifère et située à hauteur de la plaque aréolaire, se ramifier en canaux de plus petit calibre jusqu'à aboutir aux structures terminales périphériques que sont les lobules éparpillés dans tout le sein.

L'organe renferme donc deux structures essentielles, une structure à visée sécrétoire qui est le lobule et une structure à visée excrétrice qui est le canal excréteur encore appelé canal galactophore [8].

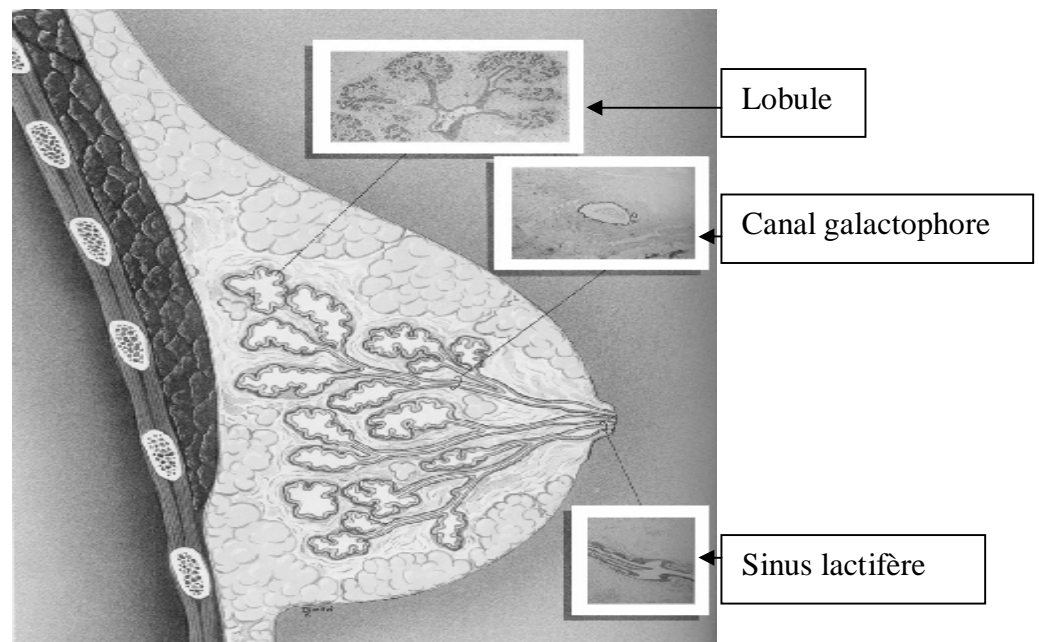


Figure 1 : représentation schématique de la structure générale d'un sein

La ramification d'un galactophore donne lieu à une formation arborescente qui, avec le tissu conjonctif ou adipeux qui l'entoure, est appelé lobe. Ce lobe mammaire, de forme pyramidale à pointe mamelonnaire, n'a pas de limites anatomiques propres et ne peut être matérialisé qu'à l'aide d'une injection intracanaulaire de colorants ou d'une galactographie.

Les lobules sont essentiellement situés à la périphérie de l'organe (par rapport au mamelon) et ils sont plus particulièrement nombreux dans le quadrant supéro-externe [8].

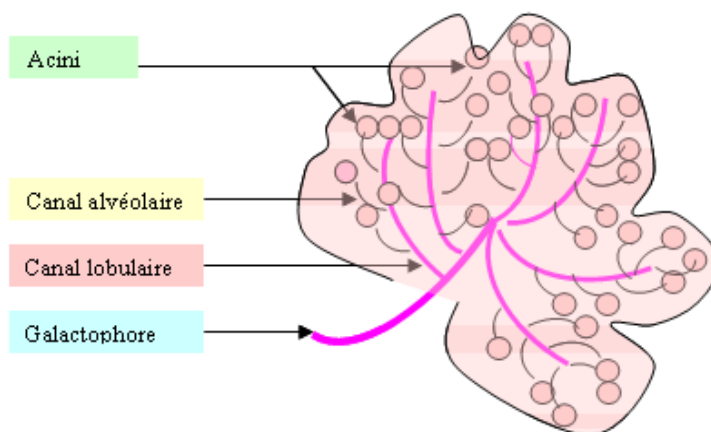


Figure 2 : représentation schématique d'un lobule mammaire

II. Le lobule

1. Structure

Le lobule est une formation sphérique d'environ 0,5 à 1mm de diamètre constituée de petits tubes borgnes (appelés ductules terminaux) agencés de manière radiée autour d'un canal collecteur intralobulaire (le galactophore terminal intralobulaire).

Ces ductules terminaux, au nombre de 20 à 100, sont entourés par un tissu fibro-collagène lâche appelé tissu palléal et dont les limites périphériques séparent le lobule du tissu fibro-collagène de soutien.

Le revêtement épithélial des lobules est à double couche, la couche interne faite de cellules épithéliales bordant la lumière, la couche externe de cellules myoépithéliales [9].

En 1975, Wellings a développé le concept de TDLU (terminal duct lobular unit ou unité terminale ductulo-lobulaire) qui englobe le lobule et le galactophore terminal extralobulaire [10]. Ce galactophore terminal représente la dernière division du galactophore avant le lobule. Il est court et de longueur voisine de celle du diamètre lobulaire, soit environ 1mm. Ce TDLU, de par sa grande hormonoréceptivité, représente le lieu de développement de la plupart des proliférations épithéliales bénignes et malignes.

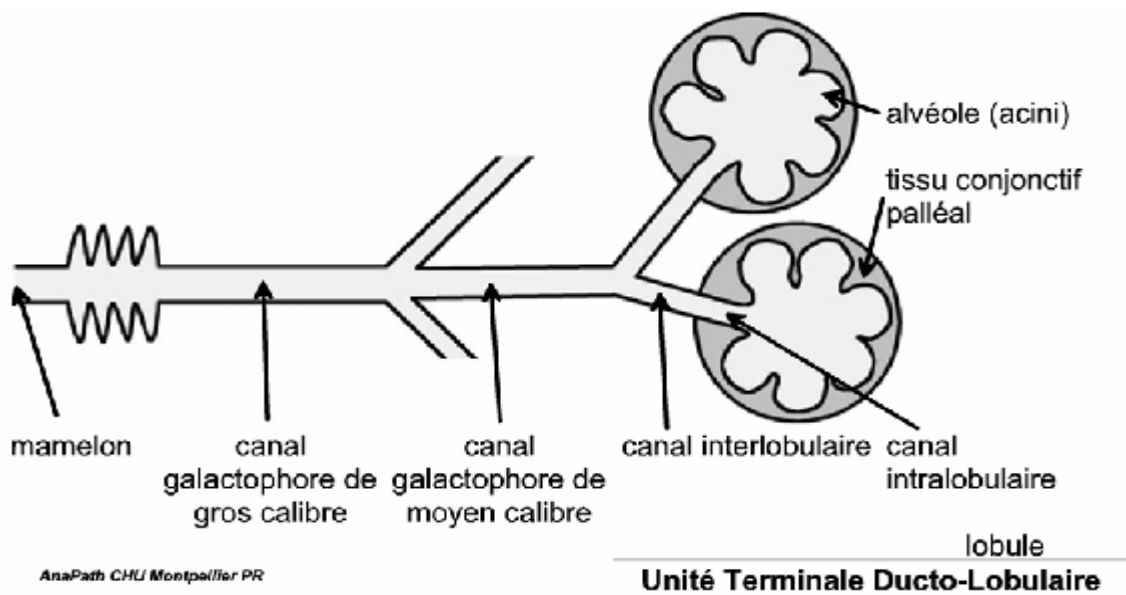


Figure 3: représentation schématique d'une unité terminale ductulo-lobulaire

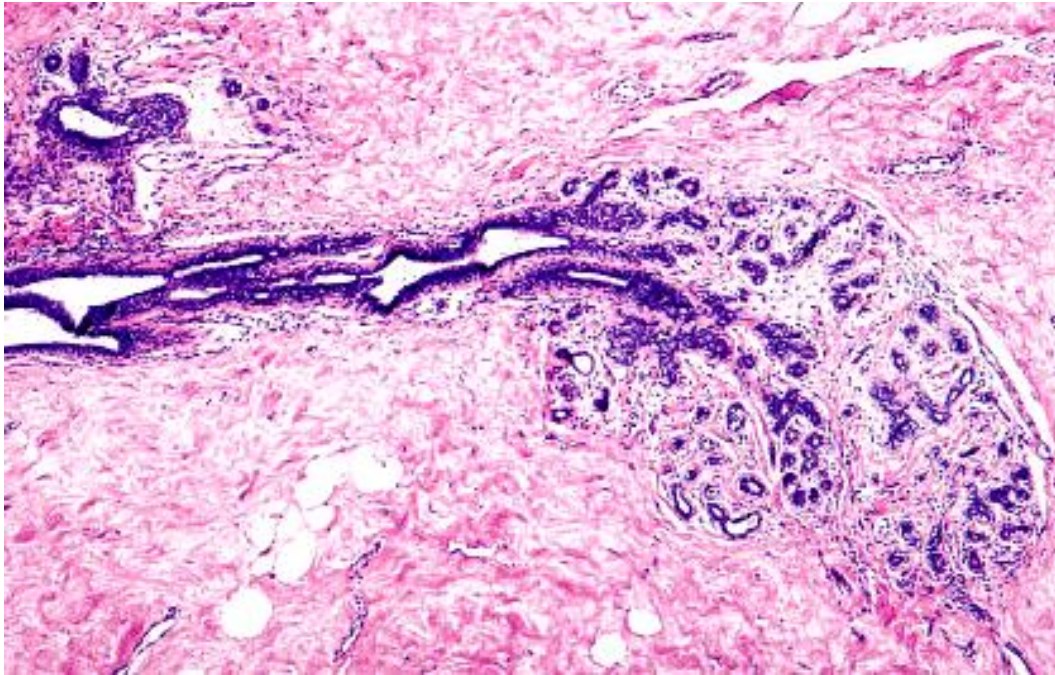


Figure 4 : microphotographie d'une unité terminale ductulo-lobulaire
comme vue dans un tissu mammaire normal

2- La cellule épithéliale

Elle est le point de départ de la très grande majorité des carcinomes mammaires. Dans au moins 98% des cas le cancer du sein est un adénocarcinome développé à partir de l'épithélium glandulaire (principalement de celui de ces unités terminales).

Même à l'état de repos, le lobule est le siège d'une sécrétion a minima provenant des cellules épithéliales. Cette sécrétion n'est pas extériorisée au mamelon.

2-1 Aspect morphologique

Les cellules glandulaires ou lactocytes présentent en effet des cycles d'activité que traduisent d'importants changements de la morphologie. Au repos elles sont basses, cuboïdes avec un noyau central ovalaire et un cytoplasme relativement peu abondant. Dans la phase de sécrétion elles deviennent au contraire hautes, avec un

cytoplasme plus abondant qui déplace l'extrémité apicale dans la lumière glandulaire.

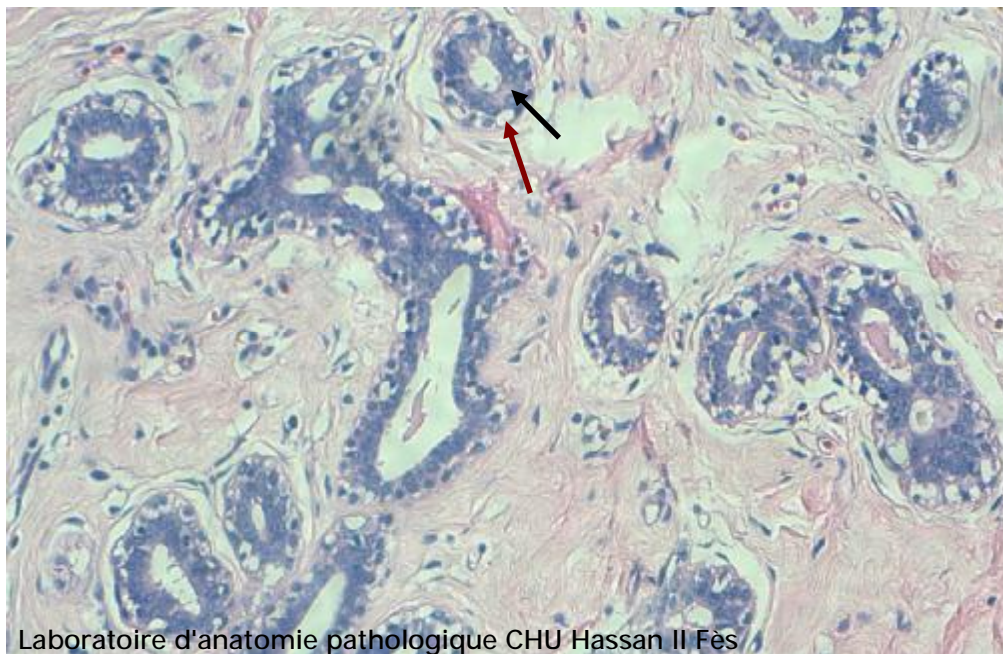


Figure 5 : microphotographie d'un tissu mammaire normal comportant des acini et des ductules tapissés par une double assise cellulaire

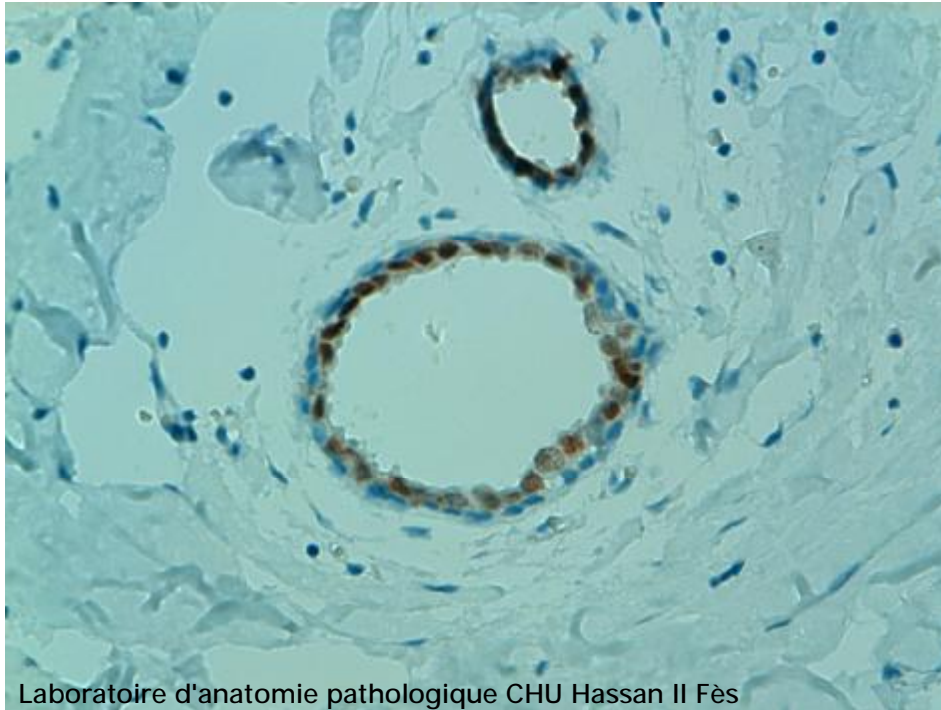
Flèche noire : cellule luminaire

Flèche rouge : cellule myoépithéliale

2-2 Aspect immunohistochimique

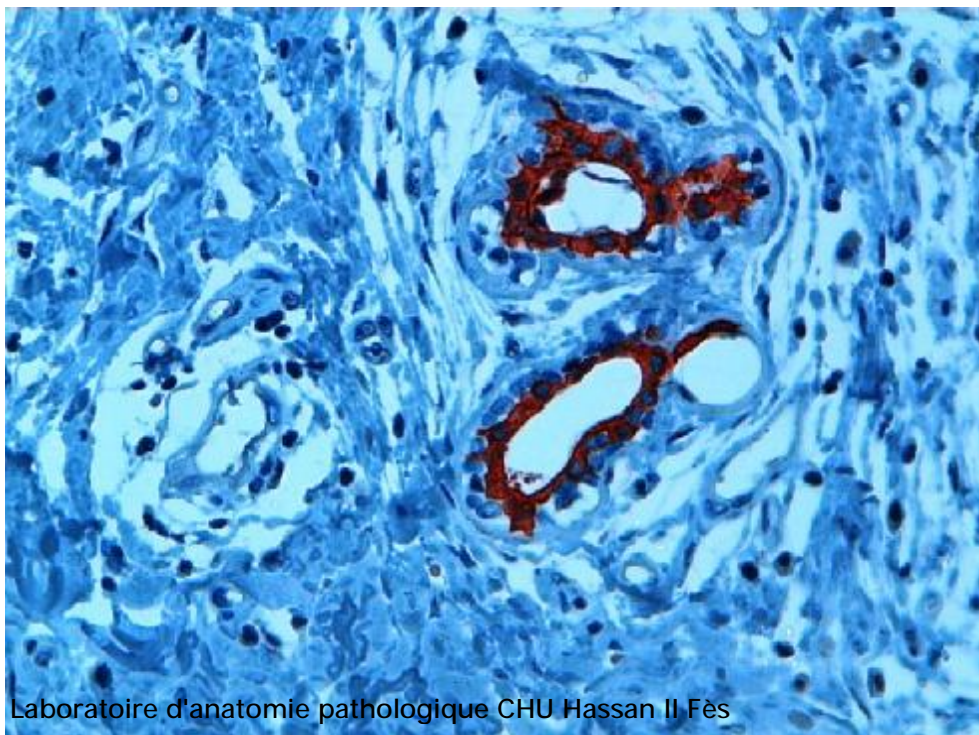
L'expression de l'antigène épithélial spécifique (ASE) et de l'antigène épithélial membranaire (EMA) a été longtemps associé aux cellules lumineuses, mais la plupart utilisent actuellement pour la reconnaissance de ces cellules leur profil unique d'expression de cytokératines qui appartiennent aux filaments intermédiaires et qui sont divisés en deux types : acide (type I) et basale (type II) en se basant sur leurs caractéristiques de point isoélectrique, et en cytokératine de haut et de bas poids moléculaire. Les cytokératines 1 à 8 appartiennent au type I, alors que les cytokératines 9 à 20 appartiennent au type II. Chaque cellule épithéliale exprime au moins deux types différents de cytokératines [11].

Les cellules luminales expriment des marqueurs associés aux récepteurs hormonaux (récepteurs des œstrogènes et de la progestérone) [12-13], certaines cytokératines (CK8, CK14, CK18) ainsi que des facteurs de transcription spécifiques comme GATA3 et FOXA1 [11-14].



Laboratoire d'anatomie pathologique CHU Hassan II Fès

Figure 6: expression des récepteurs oestrogéniques par les cellules luminales des canaux normaux



Laboratoire d'anatomie pathologique CHU Hassan II Fès

Figure 7 : expression de la cytokératine 8/18 par les cellules luminales des acini mammaires, alors que les cellules basales sont négatives

3- La cellule myoépithéliale

Cette cellule n'est pas spécifique du sein puisqu'on la retrouve également dans les glandes salivaires et sudorales. Elle est située entre les cellules épithéliales et la membrane basale.

La cellule myoépithéliale participe à l'élaboration de la membrane basale et a des propriétés contractiles qui favorisent l'éjection du lait et l'apparition d'espaces intercellulaires permettant de meilleurs échanges entre l'épithélium et le tissu palléal.

3-1 Aspect morphologique

Les cellules basales sont morphologiquement hétérogènes, elles sont soit fusiformes ou cubiques, selon leur endroit dans le système canalaire du sein et selon le statut hormonal du tissu [15].

Les cellules myoépithéliales situées à la périphérie des canaux ont typiquement des hémidesmosomes, des filaments cytoplasmiques avec des densités focales et des vésicules de pinocytose le long de la membrane plasmique.

3-2 Aspect immunohistochimique

Les cellules basales sont le plus souvent définies par leur expression de l'actine muscle lisse. En plus, la vimentine, la glial fibrillary acid protein, le CD 10, la p63, la myosine muscle lisse, la protéine S100, la calponine et le caldesmon peuvent aussi définir les cellules myoépithéliales [16].

En ce qui concerne les cytokératines, les cellules myoépithéliales possèdent des profils différents de cytokératine qui diffèrent de celui des cellules luminales. Elles expriment en général les cytokératines 5/6, 14 et 17 [11-14-17].

4- La membrane basale

Il s'agit d'une structure membranaire soutenant l'épithélium, synthétisée par les cellules épithéliales.

La membrane basale est une zone d'échange et de contact entre les structures épithéliales et le tissu conjonctif. En cancérologie, la membrane basale s'oppose au passage des cellules cancéreuses et son respect par les cellules néoplasiques a permis de définir le concept de carcinome in situ. Au-delà, se situe le tissu palléal ou manteau.

En immunohistochimie, la membrane basale exprime la laminine ou le collagène de type IV [11].

5- Le tissu palléal

Il s'agit d'un tissu conjonctif très vascularisé enveloppant les ductules terminaux et généralement bien séparé du tissu conjonctif inter lobulaire environnant qui est plus dense.

Sa densité est variable, en fonction du cycle hormonal ou de l'âge. Très actif, le tissu palléal est :

- un lieu d'échange où se produisent les modifications cycliques d'origine hormonale,
- un site privilégié de la croissance du tissu mammaire, en particulier à l'adolescence et chez l'adulte dans le phénomène d'adénose,
- propice au développement d'une réaction inflammatoire, en particulier dans les mastites ou au contact d'un carcinome in situ,
- à l'origine de tumeurs à dominance conjonctive comme le fibroadénome ou la tumeur phyllode.

CLASSIFICATION HISTOLOGIQUE DU CANCER DU SEIN

Tableau 1: classification des tumeurs mammaires selon l'OMS 2003 [18]

Tumeurs épithéliales malignes
Carcinomes non infiltrants
<ul style="list-style-type: none">• Carcinome canalaire in situ (intra-canalaire) (CCIS)• Carcinome lobulaire in situ (CLIS)
Carcinome canalaire infiltrant de type non spécifique (canalaire TNS) (40 à 75%)
<ul style="list-style-type: none">• Carcinome de type mixte• Carcinome pléomorphe• Carcinome avec cellules géantes ostéoclastiques• Carcinome avec aspects choriocarcinomateux• Carcinome avec aspects mélanocytaires
Carcinome lobulaire infiltrant (5 à 15%)
Carcinome tubuleux (2 à 7%)
Carcinome cribiforme infiltrant (0,8 à 3,5%)
Carcinome médullaire (1 à 7%)
Carcinome produisant de la mucine
<ul style="list-style-type: none">• Carcinome mucineux (2%)• Cystadénocarcinome et carcinome à cellules cylindriques sécrétantes• Carcinome à cellules en bague à chaton
Tumeurs neuroendocrines du sein (5 à 10%)
<ul style="list-style-type: none">• Carcinome neuroendocrine de type solide• Carcinoïde atypique• Carcinome à petites cellules• Carcinome neuroendocrine à grandes cellules
Carcinome papillaire infiltrant (<1 à 2%)
Carcinome micropapillaire infiltrant (<2%)
Carcinome apocrine
Carcinome métaplasique (<5%)
<ul style="list-style-type: none">• Carcinome métaplasique de type épithélial pur<ul style="list-style-type: none">• Carcinome épidermoïde• Adénocarcinome avec métaplasie à cellules fusiformes• Carcinome adénosquameux• Carcinome mucoépidermoïde• Carcinome métaplasique mixte à composante épithéliale et conjonctive
Carcinome à cellules riches en lipides (<1 à 6%)
Carcinome sécrétant (<0,15%)
Carcinome oncocytique
Carcinome adénoïde kystique (0,5%)

Carcinome à cellules acineuses
Carcinome à cellules claires (riches en glycogène)
Carcinome sébacé
Carcinome inflammatoire
Maladie de Paget du mamelon
Tumeurs myoépithéliales
Myoépithéliome malin
Tumeurs mésenchymateuses malignes
Hémangiopéricytome
Fibrosarcome
Schwannome malin
Angiosarcome
Liposarcome
Rhabdomyosarcome
Ostéosarcome
Léiomyosarcome
Tumeurs malignes mixtes épithéliales et conjonctives
Sarcome phyllode
Carcinosarcome
Lymphomes malins
Lymphome B diffus à grandes cellules
Lymphome de Burkitt
Lymphome du MALT de la zone marginale
Lymphome folliculaire
Métastases mammaires
Tumeurs du sein de l'homme
Carcinome in situ
Carcinome infiltrant

La classification actuelle utilisée est celle de l'OMS 2003. Les tumeurs épithéliales malignes ou carcinomes représentent la grande majorité des tumeurs malignes du sein. Les tumeurs malignes non carcinomateuses (sarcomes, lymphomes malins non hodgkiniens primitifs, métastases intramammaires) sont rares (moins de 1% des cancers du sein) [18].

1- Carcinomes non infiltrants:

1-1- Carcinome canalaire in situ (intra-canalaire) (CCIS)

L'OMS définit le CCIS comme une lésion intra-canalaire caractérisée par une prolifération cellulaire accrue, des atypies cellulaires légères à marquées et une tendance inhérente mais non obligatoire vers un carcinome mammaire infiltrant [18].

La classification des CCIS est actuellement principalement basée sur le grade nucléaire, la présence de nécrose, et le type architectural [19]:

1-1-1- Le grade nucléaire:

- Noyaux de bas grade: noyaux d'apparence monotone dont la taille est de 1,5 à 2 fois la taille des globules rouges, avec une chromatine fine et rarement des nucléoles ou des mitoses.
- Noyaux de haut grade: noyaux pléomorphes dont la taille est supérieure à 2,5 fois la taille des globules rouges, avec une chromatine hétérogène, des nucléoles proéminents et multiples et des mitoses.
- Noyaux de grade intermédiaire: ces que l'on ne peut pas classer dans les précédentes catégories.

1-1-2- La nécrose tumorale:

Le pathologiste doit préciser s'il y a une nécrose ou non. Elle est classée en:

- Comédonécrose: toute zone de nécrose centrale, linéaire en section longitudinale, au sein d'un canal.
- Nécrose ponctuée: toute zone de nécrose non linéaire en section longitudinale.

1-1-3- Le type architectural:

- CCIS de type comédocarcinome: il s'agit en général de lésions de grande taille. La lumière des canaux et des lobules est comblée par une nécrose centrale. Des calcifications peuvent se développer à partir de cette

nécrose. Des cellules carcinomateuses plus ou moins cohésives ou formant une bordure massive entourent la nécrose centrale. Ces cellules sont de grande taille et ont des noyaux par définition de haut grade.

- CCIS de type cribriforme: les canaux et les lobules sont comblés par une prolifération cellulaire criblée de lumières secondaires à l'emporte pièce.
- CCIS de type micropapillaire: les cellules carcinomateuses s'organisent en structures digitiformes sans axe conjonctivo-vasculaire central, se projetant dans la lumière des canaux colonisés.
- CCIS de type massif: les cellules s'organisent en plages massives et cohésives comblant et distendant les structures mammaires. Les cellules ont des limites cytoplasmiques nettes.

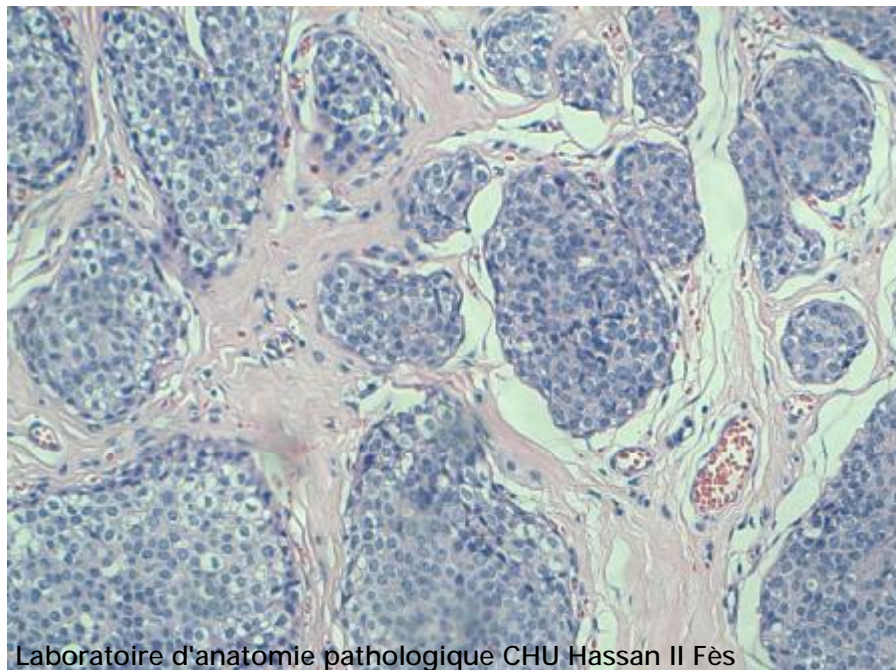


Figure 8: CCIS de grade nucléaire intermédiaire et d'architecture massive sans nécrose (HES x400)

1-2- Carcinome lobulaire in situ (CLIS)

Le CLIS est une lésion rare (1 à 3,8 % des cancers du sein), il est retrouvé dans 0,5 à 4 % des biopsies réalisées pour lésions bénignes. C'est une prolifération épithéliale développée à partir de l'épithélium des lobules. Les acini apparaissent comblés et distendus par des petites cellules rondes monotones et non cohésives. Le CLIS peut s'accompagner d'altérations épithéliales extralobulaires, en particulier sous la forme d'une infiltration dite pagétoïde de l'épithélium des canaux galactophores juxtalobulaires. Le diagnostic peut être difficile, notamment avec l'hyperplasie lobulaire atypique, ce qui justifie pour beaucoup leur regroupement sous le terme de néoplasie lobulaire. Des études de pièces de mastectomie faite après diagnostic de CLIS ont montré que la multicentricité de ces lésions était fréquente (jusque 90 %), ainsi que la bilatéralité (jusque 69 % des cas) [18-19].

Il existe une classification des néoplasies lobulaires (Grading de Tavassoli) qui distingue 3 grades: LIN 1, LIN 2 et LIN 3; mais qui n'est pas validé cliniquement [19].

2- Carcinome canalaire infiltrant de type non spécifique

Il s'agit de la forme la plus fréquente des cancers du sein représentant environ 80 % des carcinomes mammaires infiltrants. Les termes "de type non spécifique" (TNS) ou "sans autre indication" (SAI) correspondent au fait que ces tumeurs ne présentent pas de caractéristiques morphologiques suffisantes pour les classer dans une autre catégorie, comme le carcinome lobulaire ou tubulaire [18].

Il s'agit le plus souvent d'une tumeur palpable, plus rarement d'une image mammographique isolée. Le dépistage a permis d'augmenter l'incidence globale et la fréquence des cancers infracliniques, et de diminuer ainsi la taille moyenne de ces tumeurs [19].

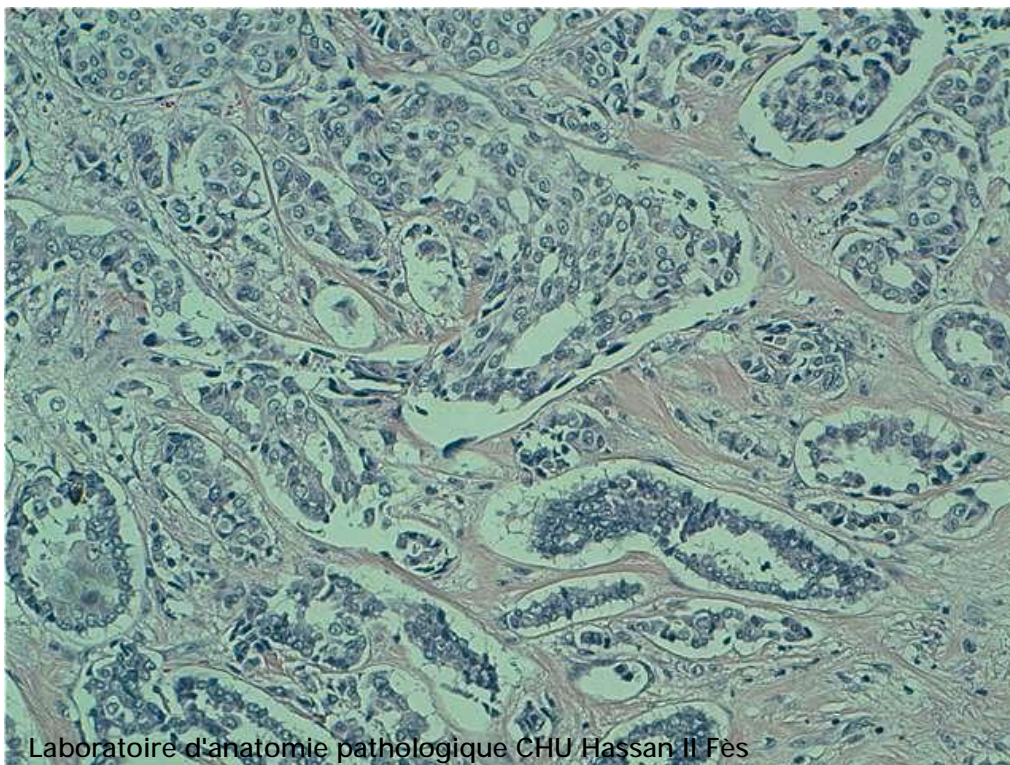
Macroscopiquement, l'aspect est très variable selon la taille de la tumeur. Il s'agit le plus souvent d'une tumeur à contours étoilés, irréguliers. Les contours sont

mal définis, avec une consistance ferme à dure et une couleur blanc-grisâtre à la coupe [18].

Histologiquement, les aspects sont très variés en fonction du degré de différenciation, la capacité des cellules tumorales à former des tubes, glandes, travées, ou massifs. La taille des cellules, les atypies nucléaires (taille et contours des noyaux, degré d'anisocaryose, nucléole) confèrent également un aspect morphologique différent à chaque tumeur.

La densité en structures tumorales dépend du stroma plus ou moins abondant. De même les mitoses sont plus ou moins nombreuses.

La présence d'une composante intracanaulaire parfois très développée modifie également l'aspect de la tumeur, son pronostic et les possibilités de prise en charge thérapeutique. Le degré de différenciation, d'anisocaryose et le comptage des mitoses interviennent dans l'établissement du grading de SBR modifié selon Elston et Ellis [18-19].



Laboratoire d'anatomie pathologique CHU Hassan II Fès

Figure 9 : carcinome canalaire infiltrant grade II de SBR (HES x400)

3- Carcinome lobulaire infiltrant

C'est un carcinome invasif représentant 5 à 15 % des cancers. Il peut se traduire par une masse palpable plus ou moins bien définie, associée à une opacité mammographique ou à une surdensité palpable [18].

Macroscopiquement, il s'agit en général d'une lésion irrégulière et mal définie.

Microscopiquement, les cellules sont non cohésives, de petite taille, à noyau rond à chromatine fine, et à cytoplasme abondant. Ces cellules sont isolées ou organisées en « fils indiennes », dans un stroma fibreux. Les mitoses sont le plus souvent rares [19].

Sur le plan génétique, il se caractérise par une perte de l'expression membranaire de l'E-cadhérine qui est une protéine intervenant dans l'adhésion intercellulaire [18].

4- Carcinome tubuleux

C'est un type spécial de carcinomes mammaires, qui se caractérise par un pronostic favorable. Il est composé de structures tubulaires bien différenciées, tapissées par une seule couche de cellules épithéliales. C'est une entité rare qui représente moins de 2 % des cancers du sein [18-19].

5- Carcinome médullaire

Le carcinome médullaire représente de 1 à 7 % des cancers du sein. C'est un carcinome bien circonscrit composé de cellules peu différenciées disposées en nappes, sans aucune structure glandulaire, un stroma peu abondant et un important infiltrat lymphoplasmocytaire [18-19].

Microscopiquement, 5 critères sont essentiels pour le diagnostic [18]:

- une architecture syncytiale dans plus de 75% des cas.

- des contours microscopiquement nets, non infiltrants.
- un infiltrat mononucléé diffus, de modéré à marqué.
- des atypies nucléaires modérés ou marqués.
- l'absence de différenciation glandulaire.

6- Carcinome mucineux

Le carcinome colloïde du sein appelé aussi mucineux ou gélatineux est défini comme un carcinome contenant de larges quantités de mucus extracellulaire dans lesquelles sont disposées des amas de cellules carcinomateuses. Il en existe deux formes histologiques : pur et impur ou mixte qui selon la présence ou non de carcinome intracanalair associé, de pronostic différent. C'est une entité histologique rare, constituant 2 % de tous les cancers du sein [18-19].

7- Carcinome adénoïde kystique ou cylindrome :

C'est un carcinome très rare dont l'aspect histologique est comparable aux tumeurs de même type des glandes salivaires.

Macroscopiquement c'est une tumeur à contours généralement assez nets, dure à la coupe.

Microscopiquement, se distingue généralement par l'association d'un contingent de cellules basaloides et un contingent de cellules épithéliales. L'agencement épithélial se fait sur un mode cribriforme, tubulaire, trabéculaire ou massifs [18-19].

8- Carcinome inflammatoire

C'est une forme particulière de carcinome mammaire avec une présentation clinique secondaire à une obstruction lymphatique à partir d'un carcinome infiltrant

sous-jacent. La majorité des cas présente une infiltration lymphatique dermique proéminente par la tumeur. Le carcinome inflammatoire est une forme des carcinomes mammaires avancés. L'invasion lymphatique dermique sans l'image clinique caractéristique est insuffisante pour poser le diagnostic [19].

9- Maladie de Paget du mamelon

Cliniquement, elle se présente comme un eczéma du mamelon. La maladie de paget du mamelon est la présence de cellules épithéliales glandulaires malignes dans l'épithélium malpighien du mamelon, elle est presque toujours associée à un carcinome intracanalair sous-jacent, qui évolue habituellement plus qu'un canal lactifère avec ou sans infiltration profonde du sein. La maladie de paget du mamelon sans carcinome sous-jacent est rare. L'incidence est estimée à 1 à 4,3 % des cancers du sein [18].

Les autres formes de carcinomes (papillaire, tubuleux, adénoïde kystique, apocrine....) sont plus rares.

CLASSIFICATION ANATOMO-CLINIQUE DU CANCER DU SEIN

Les différents cancers du sein ainsi que leur degré d'évolution locale et métastatique sont classifiés selon des stades bien définis, basés sur l'apparence des cellules. L'indice TNM résume les stades de la maladie. La lettre T fait référence à la taille de la tumeur primaire, la lettre N aux adénopathies, c'est-à-dire aux anomalies des ganglions, et la lettre M à la présence ou non de métastases.

Nous présentons la nouvelle classification TNM établie en 2003 où une classe «micro-invasion» est ajoutée. Elle est définie par un compartiment invasif inférieur ou égal à 0,1cm.

I. Classification clinique [20]

1. Classification de la tumeur primitive (T)

Tx : la tumeur primitive ne peut être évaluée.

T0 : pas de tumeur primitive décelable.

Tis : carcinome in situ.

Tis (DCIS) : carcinome canalaire in situ

Tis (LCIS) : carcinome lobulaire in situ

Tis (Paget) : maladie de paget du mamelon sans tumeur associée

NB : la maladie de paget associée à une tumeur est classée selon la taille de la tumeur sous-jacente.

T1 : $T \leq 2$ cm dans sa plus grande dimension :

T1 mic : micro-invasion $\leq 0,1$ cm dans sa plus grande dimension.

T1a : $0,1 \text{ cm} < T \leq 0,5$ cm dans sa plus grande dimension.

T1b : $0,5 \text{ cm} < T \leq 1$ cm dans sa plus grande dimension.

T1c : $1 \text{ cm} < T \leq 2$ cm dans sa plus grande dimension.

T2 : $2 \text{ cm} < T \leq 5$ cm dans sa plus grande dimension.

T3 : $T > 5$ cm dans sa plus grande dimension.

T4 : tumeur de toute taille avec extension directe à la paroi thoracique (a) ou à la peau (b) :

T4a : extension à la paroi thoracique sans inclusion du muscle pectoral.

T4b : oedème (y compris peau d'orange) ou ulcération de la peau du sein ou nodule de perméation cutané localisé sur le même sein.

T4c : association T4a et T4b.

T4d : carcinome inflammatoire.

2. Classification des adénopathies régionales (N)

Nx : les adénopathies régionales ne peuvent être évaluées.

N0 : pas d'adénopathie régionale métastatique.

N1 : adénopathie(s) métastatique(s) axillaire(s), homolatérale(s) mobile(s).

N2 : adénopathies métastatiques axillaires homo latérales fixées entre elles ou indurées :

N2a : adénopathies métastatiques axillaires homolatérales fixées entre elles ou à une autre structure

N2b : adénopathies métastatiques mammaires internes homo latérales mis en évidence au travers des techniques d'imageries (sauf lymphoscintigraphie)

N3 : adénopathies métastatiques infra claviculaires homo latéral :

N3a : adénopathies métastatiques infra-claviculaires homo latérales avec ou sans adénopathies métastatiques axillaires ou adénopathies métastatiques mammaires internes

N3b : adénopathies métastatiques mammaires internes homo latérales avec adénopathies métastatiques axillaires

N3c : adénopathies métastatiques supra-claviculaires homo latérales

3. Classification des métastases à distance (M)

Mx : les métastases à distance ne peuvent être évaluées.

M0 : absence de métastases à distance.

M1 : existence de métastases à distance.

II. Classification histo-pathologique [20]

1. Classification de la tumeur primitive (pT)

La classification histo-pathologique nécessite l'examen de la tumeur primitive sans tumeur macroscopique au niveau des limites d'exérèses. Une tumeur associée à une tumeur microscopique à cette limite sera classée pT. La classification pT correspond à la classification T.

Dans la classification pT, la taille de la tumeur mesure la composante invasive. S'il existe une tumeur importante avec une faible composante invasive, la tumeur est codée pT1a.

En cas de chimiothérapie néo-adjuvante le préfixe « y » est utilisé.

2. Classification des adénopathies régionales (pN)

La classification est basée sur l'exploration des ganglions axillaires avec ou sans exploration du ganglion sentinelle. Si seule l'exploration du ganglion sentinelle est possible, on lui assigne les lettres (sn) pour «ganglion sentinelle».

pNx : les adénopathies régionales ne peuvent être évaluées.

pN0 : pas d'adénopathie régionale métastatique histologiquement démontrée:

pN0(i-) : pas d'adénopathies régionales métastatiques histologiquement démontrée, IHC négative.

pN0(i+) : pas d'adénopathies régionales métastatiques histologiquement démontrée, IHC positive, absence de groupe IHC+ > 0,2 mm : cellules isolées.

pN0(mol-) : pas d'adénopathies régionales métastatiques histologiquement démontrée, technique moléculaire négative.

pN0(mol+) : pas d'adénopathies régionales métastatiques histologiquement démontrée, technique moléculaire positive.

pN1 : métastases atteignant 1 à 3 ganglions axillaires et/ou mammaires internes avec atteinte microscopique mise en évidence par biopsie du ganglion sentinelle mais non apparente cliniquement* :

pN1mi : micro-métastases $0,2 < mi < 2$ mm.

pN1a : métastases atteignant 1 à 3 ganglions axillaires.

pN1b : métastases atteignant les ganglions mammaires internes avec atteinte microscopique mise en évidence par biopsie du ganglion sentinelle mais non apparente cliniquement.

pN1c : métastases atteignant les ganglions axillaires et mammaires internes avec atteinte microscopique mises en évidence par biopsie du ganglion sentinelle mais non apparente cliniquement.

*Non cliniquement apparent est défini par « l'absence de mise en évidence à travers des techniques d'imageries (sauf lympho-scintigraphie) ou des examens cliniques approfondis »

PN2 : métastases atteignant 4 à 9 ganglions axillaires.

pN2a : métastases atteignant 4 à 9 ganglions axillaires (avec au moins un foyer tumoral > 2 mm).

pN2b : métastases atteignant les ganglions mammaires internes de façon cliniquement apparente sans atteinte métastatique des ganglions axillaires.

pN3 : métastases atteignant au moins 10 ganglions axillaires :

pN3a : atteinte métastatique ≥ 10 ganglions axillaires (avec au moins un foyer tumoral > 2 mm) ou métastases ganglionnaires infra-claviculaires.

pN3b : métastases cliniquement apparentes dans les ganglions mammaires internes homo latéraux avec présence d'au moins 1 ganglion axillaire positif ou métastases atteignant plus de 3 ganglions axillaires et ganglions mammaires internes avec atteinte microscopique mise en évidence par biopsie du ganglion sentinelle mais non cliniquement apparente.

PN3c : métastases atteignant les ganglions supra-claviculaire homo latéral.

III. Groupement en stades

Stade 0 TisNOMO

Stade I T1NOMO

Stade IIa T0N1M0, T1N1M0, T2NOMO

Stade IIb T2N1M0, T3NOMO

Stade IIIa T0N2M0, T1N2M0, T2N2M0, T3N1M0, T3N2M0

Stade IIIb T4NOMO, T4N1M0, T4N2M0

Stade IIIc n'importe quel TN3M0

Stade IV n'importe quel T et N, M1

Chaque cancer est classifié, selon ses caractéristiques, à l'aide de la liste précédente. Au niveau clinique, les différentes combinaisons possibles des indices

TNM sont regroupées en 5 stades. Avant d'être cancéreuses, les cellules formant les canaux galactophores se trouvent à une position normale et sont bien différenciées. Lentement, un peu d'hyperplasie commence, quelques cellules inutiles s'accumulent à des endroits inhabituels, puis de plus en plus de cellules commencent à avoir une apparence anormale.

Au stade 0, la maladie est in situ, c'est-à-dire qu'elle est localisée aux canaux et aux lobules, les cellules cancéreuses n'ont pas envahi les tissus adjacents. Il peut y avoir des micro-calcifications dans le sein en entier parfois. Le seul indice TNM de ce stade est TisNOMO. Le traitement, à ce stade, est souvent une mastectomie partielle à laquelle on ajoute de la radiothérapie. Certains chirurgiens recommandent la chirurgie seule lorsque le problème est localisé. Les chances de survie sont excellentes à ce stade, pratiquement 100 % des patientes survivent au moins 5 ans.

Le stade 1 englobe les tumeurs de diamètre inférieur à 2cm (figure). Contrairement au stade 0, les cellules cancéreuses s'étendent au-delà des canaux, mais il n'y a pas de signe d'invasion des ganglions. Le traitement privilégié à ce stade est la mastectomie partielle combinée à la radiothérapie.

Cependant, une biopsie des ganglions est effectuée et la chimiothérapie ou l'hormonothérapie peuvent être suggérées à certaines femmes. Entre 95 % et 98% des femmes survivent plus de 5 ans et la plupart vivent beaucoup plus longtemps.

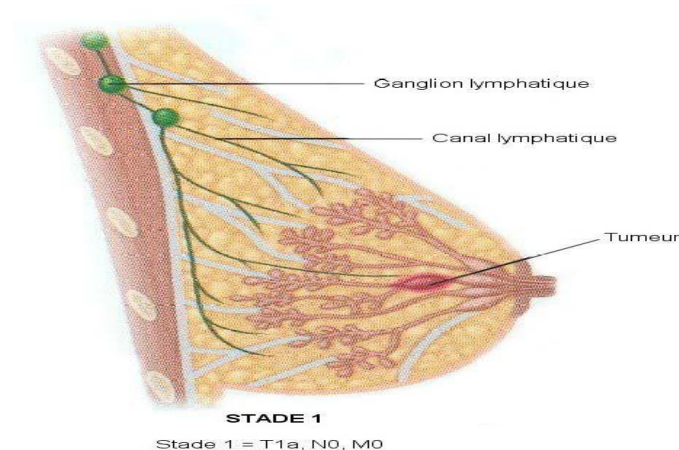


Figure 10 : stades 1 du cancer du sein

Tout dépendant de la taille de la tumeur et de l'extension de la maladie, de 75 % à 90 % des femmes survivent plus de 5 ans à un cancer du sein de stade 2 (figure). La taille de la tumeur est alors supérieure à 2cm et inférieure à 5cm et, dans la majorité des cas, les ganglions ne sont pas atteints.

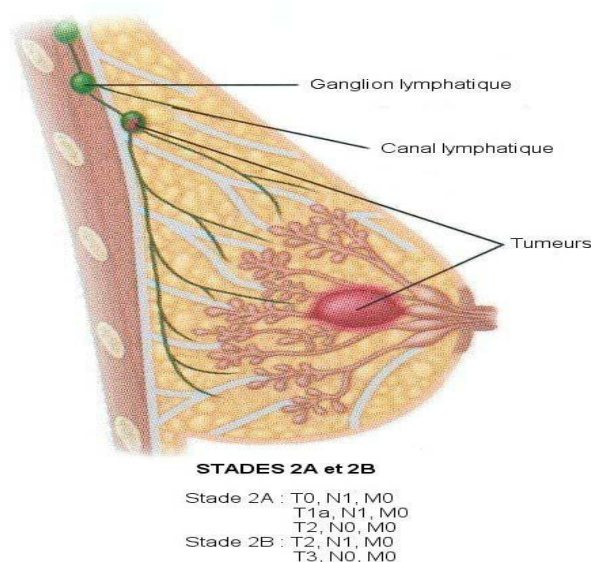


Figure 11 : stades 2 du cancer du sein

Comme pour les deux premiers stades, la mastectomie partielle suivie de radiothérapie est le traitement le plus efficace. La chimiothérapie sera utilisée s'il y a envahissement ganglionnaire ou si la tumeur a une taille importante ; l'hormonothérapie est parfois indiquée.

Au stade 3, la maladie a attaqué les ganglions lymphatiques. La taille de la tumeur primaire n'a pas d'importance et le traitement du cancer est encore une combinaison de radiothérapie, chimiothérapie et hormonothérapie à la suite d'une mastectomie partielle ou totale. Seulement 50 % à 55 % des femmes survivent au moins 5 ans à un cancer de stade 3.

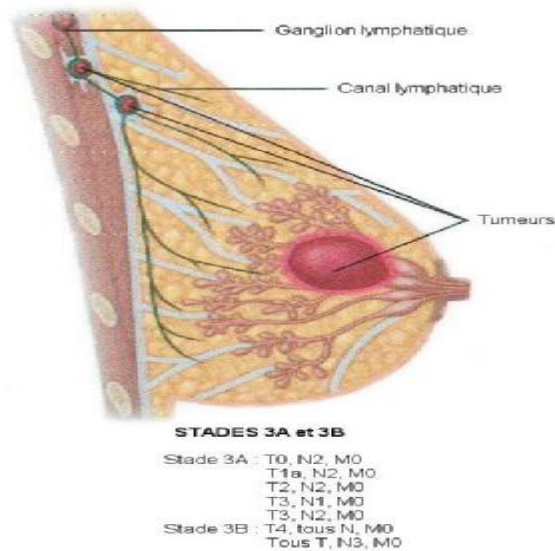


Figure 12 : stades 3 du cancer du sein

Si la maladie n'a pas été diagnostiquée à un des quatre stades précédents, les chances de survie sont fortement réduites. En effet, une femme atteinte d'un cancer du sein au stade 4 n'a que 15 % à 20 % des chances de survivre 5 ans, car la maladie s'est étendue au-delà du sein : au foie, au cerveau, au(x) poumon(s) ou à l'autre sein. Le traitement est palliatif, visant à réduire la souffrance et à prolonger la vie de quelques mois ou années.

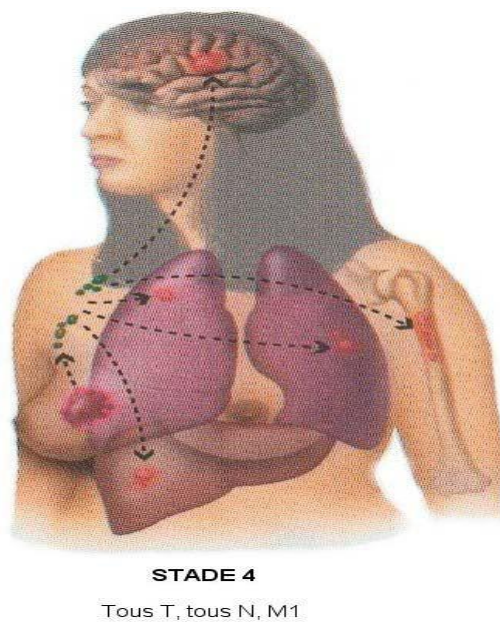


Figure 13 : stades 4 du cancer du sein

IV. Au Total

Cette nouvelle classification TNM est basée sur des données récentes. Il s'agit d'un exemple de médecine basée sur des preuves. Elle a pris en compte les données récentes de l'imagerie, la modification des pratiques cliniques (ganglion sentinelle, chimiothérapie néoadjuvante) et du travail des pathologistes pour la mise en évidence des micrométastases dans les ganglions sentinelles. Cette nouvelle classification devrait nous permettre de mieux appréhender le cancer du sein en terme de pronostic et de traitement et de compiler des données homogènes. L'avenir nous dira si cette nouvelle classification était pertinente.

MATERIELS ET METHODES

I- Matériels :

C'est une étude prospective menée dans le service d'Anatomie pathologique du centre hospitalier universitaire Hassan II de Fès.

Pour réaliser ce travail, nous avons recueillis les cas des cancers du sein diagnostiqués au service d'Anatomopathologie entre Janvier 2008 et septembre 2009.

II- Méthodes :

1- Fiche d'exploitation :

Pour réaliser ce travail, nous avons collecté les données suivantes :

- L'identité du malade
- L'âge.
- Le type du prélèvement.
- Les résultats anatomopathologiques.
- Les résultats de l'étude immunohistochimique.

2- Etape macroscopique :

2-1- Généralités:

La prise en charge macroscopique des pièces d'exérèse mammaire a pour objectif d'obtenir des informations concernant les aspects morphologiques, topographiques et histopronostiques utiles pour le diagnostic et le traitement des lésions mammaires.

Dans tous les cas, il est important de fournir au pathologiste des renseignements cliniques et radiologiques.

La prise en charge macroscopique doit être adaptée au type du prélèvement reçu. Elle se déroule selon une séquence assez stéréotypée:

- Mesure dans les trois plans de l'espace de la taille du ou des fragment(s) tissulaire(s) transmis.
- Orientation du fragment tissulaire, qui dépend des repères (fils, clips...) mis par le chirurgien sur le prélèvement.
- Encrage de la surface de la pièce opératoire avec un marqueur indélébile (encre de chine), identifiable sur les coupes histologiques.
- Analyse macroscopique de la pièce opératoire par la vue et le toucher (il faut décrire et mesurer).
- Fixation des prélèvements. Un retard à la fixation ou une mauvaise fixation nuisent à la qualité morphologique des coupes histologiques.

2-2- La biopsie:

Les fragments sont mesurés et examinés en totalité.

2-3- exérèse partielle d'un cancer infiltrant:

Le pathologiste effectue les prélèvements des limites d'exérèse sur la pièce opératoire.

En pratique:

- La pièce opératoire est <3cm: des sections sagittales, parallèles les unes aux autres, sont effectuées tous les 3-4mm et repérées sur un schéma, puis la pièce est examinée en totalité.
- La pièce opératoire est >3cm: une grille complète intéressant une tranche de section de la pièce de tumorectomie prise dans sa plus grande dimension est prélevée, ainsi que des prélèvements perpendiculaires aux deux autres plans de l'espace, à l'endroit où la tumeur est la plus proche de la limite d'exérèse.

2-4- Mastectomie

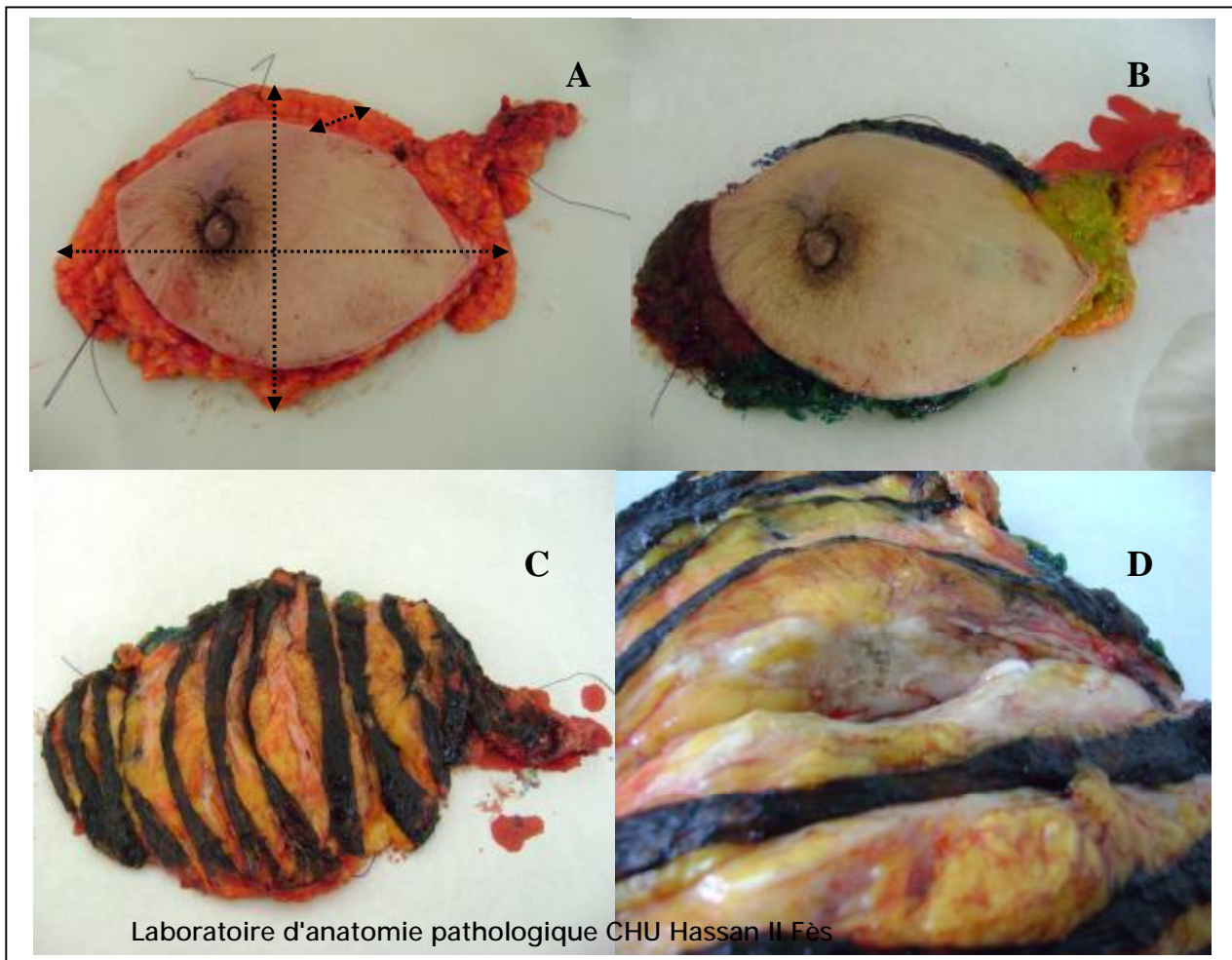


Figure 14 : étapes de la prise en charge macroscopique d'une pièce de mastectomie

A: mesure de la pièce dans les trois plans de l'espace

B: ancrage des berges de la pièce

C: coupes sériées de la pièce de 1cm en gardant le lambeau cutané intact

D: analyse de la pièce par la vue et le toucher, montrant une tumeur blanchâtre dure et spiculée

Les prélèvements systématiques effectués sur:

Les limites de résection chirurgicales périphériques et la limite profonde.

Tumeur: 3 prélèvements au minimum, dans 3 directions, en incluant une section représentative de la tumeur dans son plus grand axe.

En cas de mastectomie complémentaire après tumorectomie diagnostique: 10 à 15 prélèvements réalisés au niveau du lit de la tumorectomie antérieure.

Mamelon: 2 à 3 prélèvements perpendiculaires au plan cutané, un prélèvement rétro-mammelonnaire parallèle au plan cutané.

Autres quadrants: prélèvements systématiques.

2-5- Curage axillaire:

Tous les ganglions sont prélevés et inclus en totalité. Une tranche de section représentative suffit pour les ganglions manifestement envahis à l'examen macroscopique. Les plus grands ganglions sont coupés en tranches macroscopiques sériées de 2mm d'épaisseur. Les plus petits ne pouvant être coupés en tranches sont inclus isolément ou à plusieurs en une ou plusieurs cassettes. Il est nécessaire d'examiner un minimum de 10 ganglions pour considérer l'information pronostique fournie par l'étude histologique d'un curage axillaire comme fiable. Dans le compte rendu il faut préciser le nombre de ganglions de curage retrouvés.

3- Histologie :

Les différents **prélèvements** reçus au service, passent par une série de préparation :

3.1- Obtention des coupes :

ü Fixation :

La fixation a pour but de s'opposer à la déshydratation prématurée des cellules et surtout à la putréfaction des tissus.

On utilise au service la **solution** de formol à 10 %, car il permet une bonne étude immunohistochimique et de biologie moléculaire.

ü Déshydratation :

L'échantillon tissulaire est fixé, puis progressivement déshydraté par passages successifs dans des **solutions** alcooliques de plus en plus concentrées jusqu'à ce que toute l'eau (des tissus et du milieu de fixation) ait été soustraite et que l'échantillon soit totalement imprégné d'alcool absolu. L'alcool est ensuite remplacé par un

solvant organique dans lequel peuvent se dissoudre à la fois l'alcool et la paraffine (la paraffine n'est pas soluble dans l'alcool)

ü Inclusion en paraffine chauffée :

L'échantillon est alors immergé dans de la paraffine chauffée à une température dépassant juste son point de fusion, puisque celle-ci est solide à température ambiante.

ü Refroidissement :

Une fois l'échantillon bien imprégné, on le laisse refroidir dans un moule rempli de paraffine qui se solidifie.

ü Réalisation de coupes :

En se refroidissant, le fragment, imbibé de paraffine, se trouve inclus dans un bloc solide à partir duquel, grâce à un microtome comportant un rasoir, des coupes de 5 microns d'épaisseur sont obtenues.

ü Réhydratation :

Une fois les plans de coupe réalisés, ils sont déposés sur une lame de verre et paraffine est dissoute par un solvant organique avant un temps de réhydratation par des solutions alcooliques de plus en plus diluées. Quand la réhydratation est achevée, les coupes sont colorées.

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

- Colorer par l'hématéine pendant 5 à 7 min (teintant les noyaux en bleu ou en noir)
- Rincer à l'eau courante puis à l'eau distillée
- Transférer dans la carbonate de lithium (facultatif)
- Rincer à l'eau courante puis distillée
- Colorer dans une solution d'éosine à 1 % pendant 2 min (teintant le cytoplasme en rose ou Rouge)

- Rincer rapidement à l'eau courante
- Déshydrater dans l'alcool à 100°
- Colorer dans le safran alcoolique pendant 1 min (se fixe sur le tissu conjonctif)
- Passer rapidement dans les alcools (Méthanol - Ethanol pour éclaircissement)
- Montage au toluène.

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

3.3- Etude en microscopie optique :

L'observation des coupes colorées est effectuée à l'aide d'un microscope optique. Cet appareil permet d'obtenir une image agrandie (20 à 1000 fois) par une combinaison optique de la coupe éclairée par une lumière qui la traverse.

4- Classification histologique :

Au terme de cette étude morphologique, les cas ont été classés selon la classification histologique de l'OMS et gradés selon le grading de SBR.

5- Classification moléculaire :

Dans cette étude, on s'est basé sur la classification de Perou et Sorlie qui distingue:

- Le sous type luminal exprimant le gène des récepteurs aux oestrogènes et les gènes qu'il régule ou ceux co-exprimés. Ces tumeurs sont classées en deux catégories A et B, qui diffèrent par l'expression plus élevée de récepteurs aux oestrogènes et du récepteur alpha et une prolifération plus faible pour les luminales A.

- Le sous type HER2 dont les tumeurs surexpriment l'oncogène HER2 et les gènes liés plus ou moins aux récepteurs aux oestrogènes et à la progestérone.
- Le sous type basal-like où les tumeurs sont « triple-négatifs » c'est-à-dire qu'ils n'expriment ni les récepteurs aux oestrogènes ni ceux à la progestérone, ni HER2.
- Enfin, le cinquième phénotype, est celui des tumeurs dites normal-like parce qu'il est artefactuel, provenant de la contamination des échantillons tumoraux par les tissus mammaires normaux, il n'est donc pas utilisé en clinique.

L'analyse a été réalisée en deux étapes : une phase d'identification des différents sous-types en utilisant les récepteurs hormonaux et le test Her-2, et une phase de confirmation des types luminal et basal en utilisant respectivement les anticorps anti-CK8/18 et anti-CK5/6.

Le tableau suivant résume les critères immunohistochimiques utilisés dans cette étude pour la classification moléculaire.

Tableau 2 : critères utilisés dans notre étude pour la classification moléculaire du cancer du sein

Sous type moléculaire	Critères utilisés dans cette étude
Luminal A	ER (+) et Her-2 (-) et CK8/18 (+)
Luminal B	ER (+) et Her-2 (+) et CK8/18 (+)
Her-2	ER (-) et Her-2 (+)
Basal	ER (-) et Her-2 (-) et CK5/6 (+)

6 - Saisie et d'analyse des données :

Dans un premier temps, une analyse descriptive des caractéristiques cliniques, histologiques et immunohistochimiques patientes a été effectuée. Pour les variables quantitatives nous avons calculé la moyenne, la médiane, minimum et maximum et le pourcentage pour les variables qualitatives.

Ensuite une analyse univariée a été faite pour rechercher l'association entre les différents sous types de la classification moléculaire des cancers du sein et plusieurs variables explicatives potentielles. Lors de la comparaison de groupes, nous avons utilisé les tests paramétriques classiques (Test de Khi2, test de Student, ANOVA) en fonction de la nature des variables à comparer.

La variable dépendante était la présence de métastases à distance. Une régression logistique a été utilisée pour expliquer la survenue de métastases. Les variables explicatives associées à la survenue de métastase en univariée avec un degré de signification $p < 0,25$ ont été retenues pour l'analyse multivariée. Puis, on a retiré, au fur et à mesure, les variables les moins significatives, donc ayant les plus grands p en vérifiant à chaque étape de la modélisation, la présence de facteurs de confusion. Cette démarche a été entreprise jusqu'à l'obtention d'un modèle ne contenant que des variables significatives au seuil de 5%.

Lorsque l'Odds Ratio est supérieur à 1 (avec un $p < 0,05$) le facteur étudié est un facteur de risque de se présenter avec des métastases, alors que s'il est inférieur à 1 il est considéré comme facteur protecteur de se présenter avec des métastases.

Pour chaque test statistique utilisé, le test était considéré comme significatif lorsque p (degré de signification) était inférieur à 0,05.

L'analyse statistique est effectuée en utilisant le logiciel Epi-info (version 3.3.2).

RESULTATS

I- Caractéristiques générales de la population :

Dans notre étude, on a noté 130 cas de carcinomes mammaires au sein du service d'anatomie pathologique du CHU Hassan II de Fès entre Janvier 2008 et septembre 2009.

1- Répartition selon l'âge :

L'âge moyen était de 48 ans avec une médiane de 46 ans et des extrêmes de 22 à 100 ans. La distribution de la population en fonction de l'âge est représentée dans la figure 15.

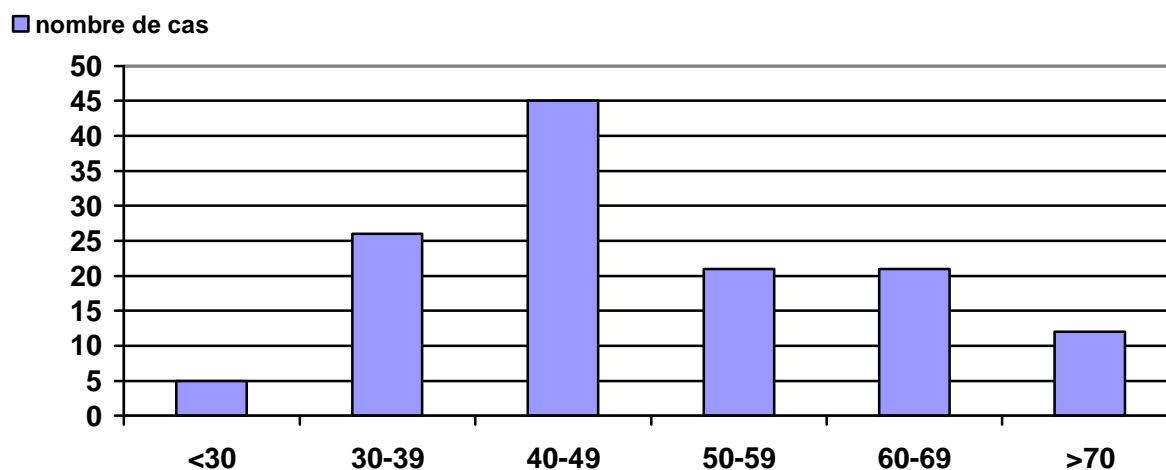


Figure 15 : répartition des malades selon les tranches d'âge.

2- Type de prélèvement :

Presque la moitié des diagnostics ont porté sur des pièces de mastectomie représentant 43 % des cas, suivis par des biopsies qui représentaient 39,7 % des cas.

La tumorectomie était réalisée dans 13,7 % des cas et la mastectomie de propreté dans 3,1 % des cas.

Le curage ganglionnaire était associé à toutes les pièces de mastectomie et 7 tumorectomie.

3- Type histologique :

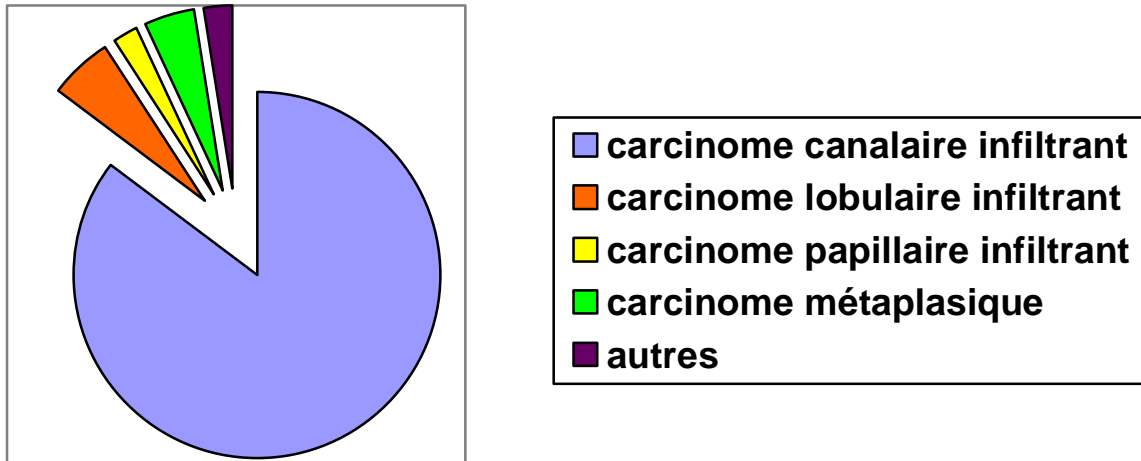


Figure 10 : représentation graphique des différents types histologiques

Sur le plan histologique, le carcinome canalaire infiltrant était prédominant représentant 85,4 % des cas, suivis par le carcinome lobulaire infiltrant qui représentait 5,4 % des cas. Le carcinome métaplasique était présent dans 4,6 % des cas et le carcinome papillaire infiltrant dans 2,3 % des cas. Le reste des tumeurs était représenté par des cas rares :

Carcinome apocrine : 0,8 % des cas.

Carcinome médullaire : 0,8 % des cas.

Carcinome indifférencié : 0,8 % des cas.

4- Le grade SBR:

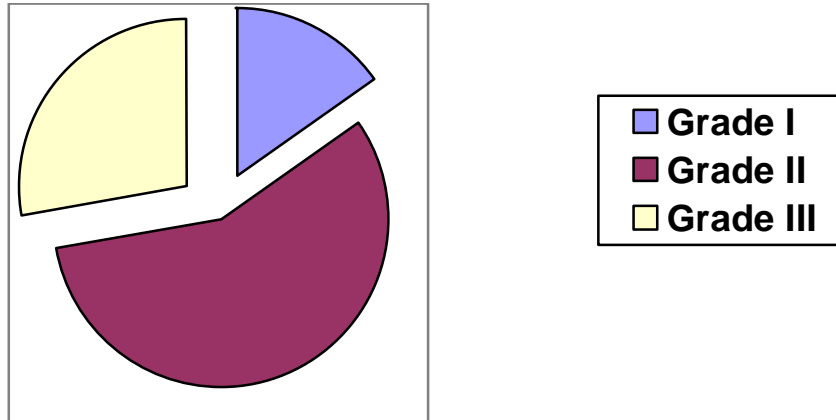


Figure 11: répartition selon le grading SBR

Selon la présente série, 27,7 % des cas étaient de grade III.

Les tumeurs de grade II étaient majoritaires, ils représentaient 56,9 % des cas.

Les tumeurs de grade I ne représentaient que 15,4 % des cas.

5- La taille en cm:

La taille moyenne était de 3,9cm avec une médiane de 3cm et des extrêmes allant de 0,2cm à 16cm. Seulement 17 % des patientes avait un diamètre inférieur à 2cm, la majorité des tumeurs soit 59,1 % des cas avait un diamètre entre 3 et 5cm et 23,9 % des cas dépassent 5cm de diamètre.

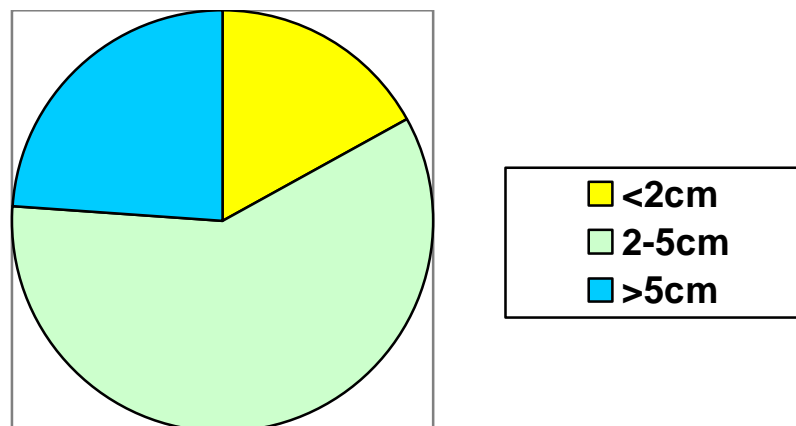


Figure 12 : répartition des cas selon la taille tumorale

6- La taille TNM:

Dans cette étude, on a noté un pourcentage élevé des tumeurs classées en T2 qui représentait 35,5 %, suivi par les tumeurs classées en T4 représentant 25,6 %. La classe T1 vient en troisième position avec un taux de 22,3 %. La proportion des tumeurs classées en T3 est la plus faible, elle est de 16,5 %.

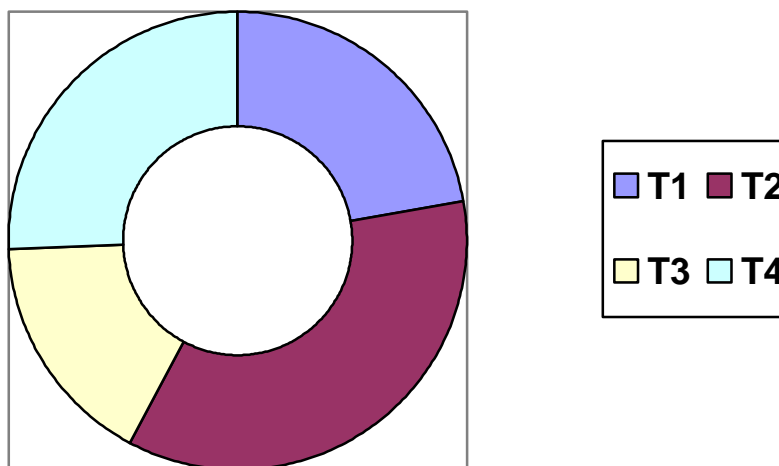


Figure 13: répartition de la taille tumorale selon la classification TNM

7- L'envahissement ganglionnaire:

Le curage ganglionnaire a été réalisé chez 46 % des cas soit 60 patientes / 130.

32,2 % des patientes avaient des ganglions non envahis. Les métastases ganglionnaires étaient classées en N1 chez la majorité des patientes, soit 39,1 % des cas. La classe N2 est retrouvée chez 25,3 % des cas. La classe N3 ne représente que 3,4 % des curages ganglionnaires réalisés.

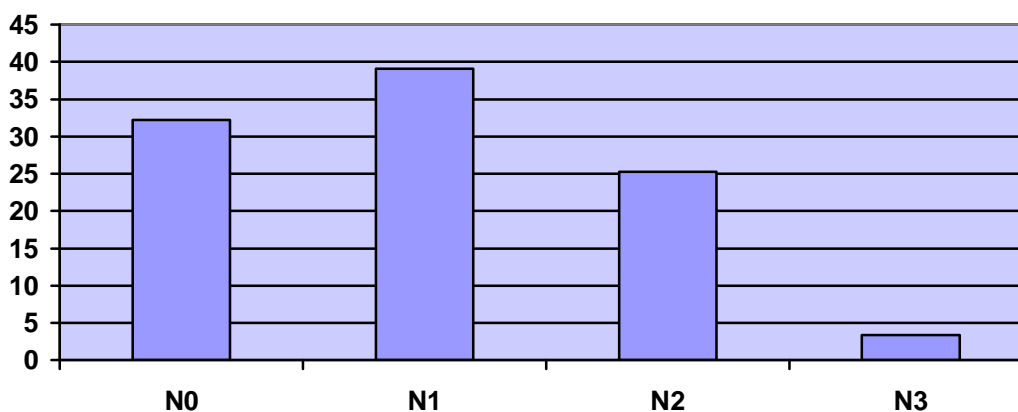


Figure 20 : répartition selon le staut ganglionnaire

8- La présence de métastases à distance:

Dans notre série, seulement 24,5 % des cancers présentent des métastases à distance, le reste demeure confiné au sein.

9- Les embolies vasculaires

Les embolies vasculaires péri-tumorales étaient présents dans 40,5% des cas.

10- l'association avec une composante intra-canales:

La composante in situ était associée à la tumeur dans 38,2 % des cas.

11- Profils d'expression des récepteurs hormonaux et de l'Her2:

Les récepteurs œstrogéniques présentent un marquage nucléaire de plus de 10 % des cellules tumorales dans 59,7 % des cas contre 68 % pour les récepteurs progestatifs.

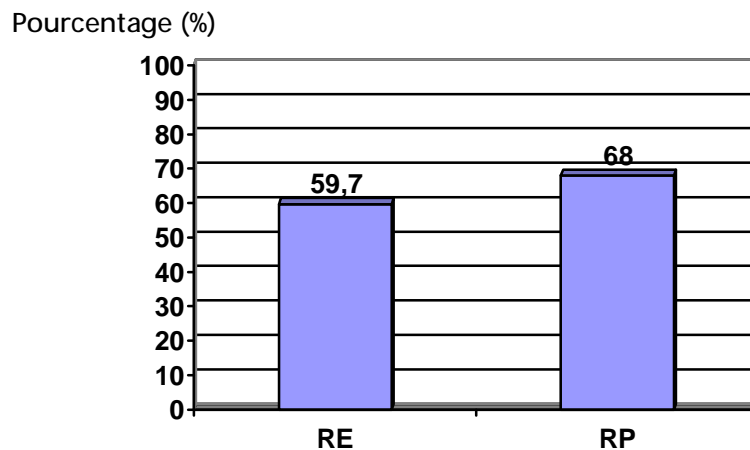


Figure 21 : comparaison entre le taux d'expression des récepteurs oestroéniques et des récepteurs progestatifs

En ce qui concerne l'Her2, il est positif dans 24,6 % des cas (score 3+). Il n'est classé score 2+ que dans 7,7 % des cas et il est négatif dans 67,6 % des cas.

Tableau 3 : répartition des cas du cancer du sein selon les résultats du test Her-2

Score Her2	Pourcentage	effectif
0+	43,8 %	57
1+	23,8 %	31
2+	7,7 %	10
3+	24,6%	32

II- Classification moléculaire du cancer du sein

Des 130 tumeurs analysées, 55 (42,3 %) étaient classées de type luminal A, 20 (15,4%) de type luminal B, 18 (13,8%) de type Her-2, et 18 (13,8%) de type basal.

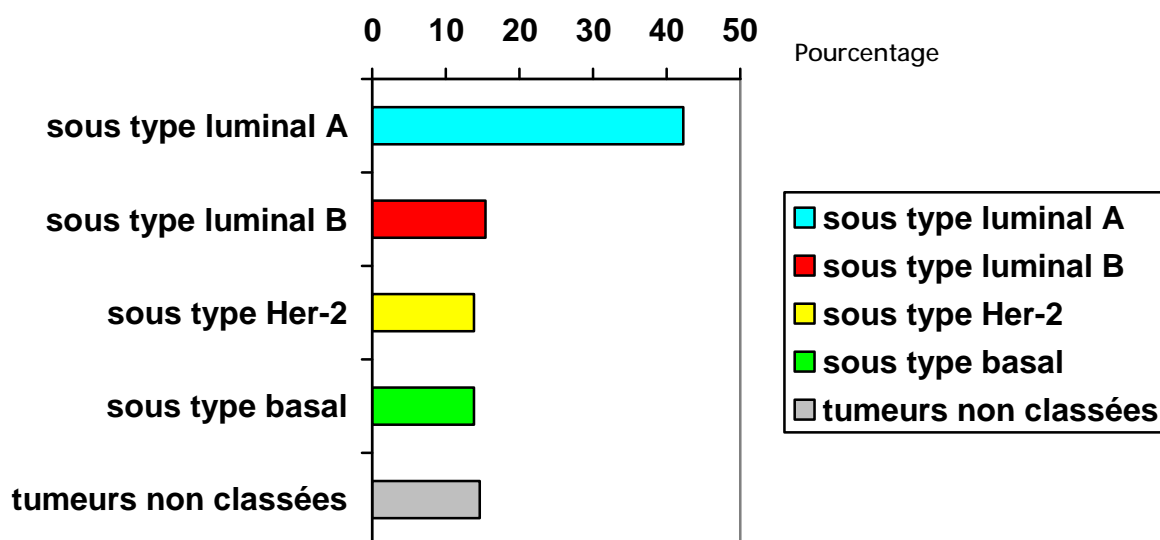
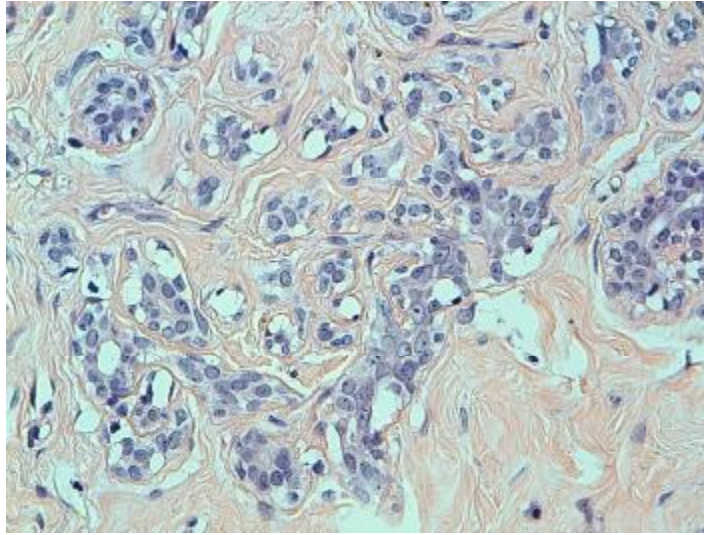
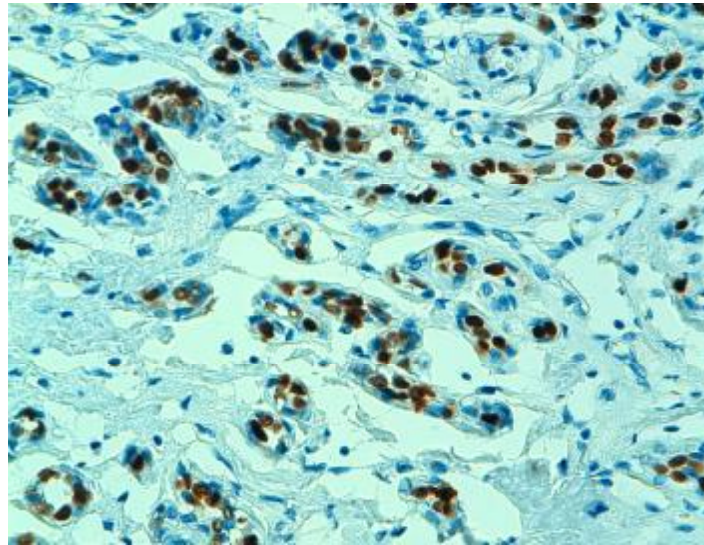


Figure 22 : répartition des tumeurs mammaires selon la classification moléculaire du cancer du sein

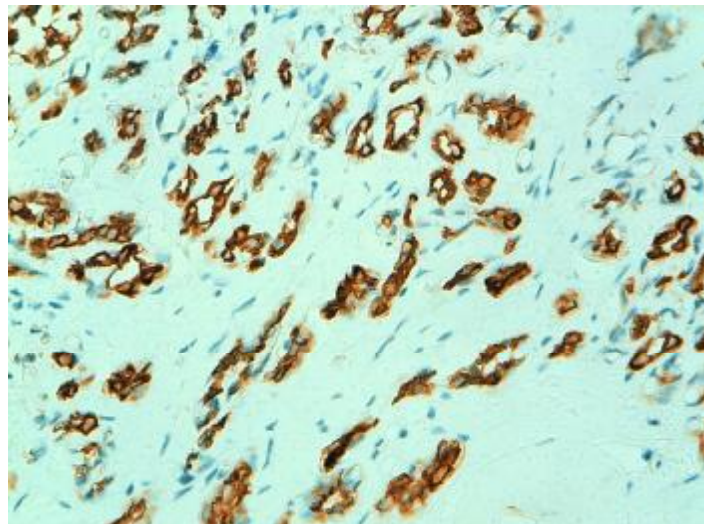
A



B



C



Laboratoire d'anatomie pathologique CHU Hassan II Fès

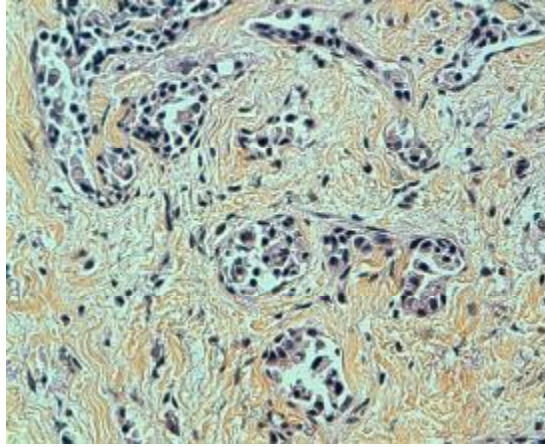
Figure 23 : carcinome canalaire infiltrant de phénotype luminal A

A: HES x400

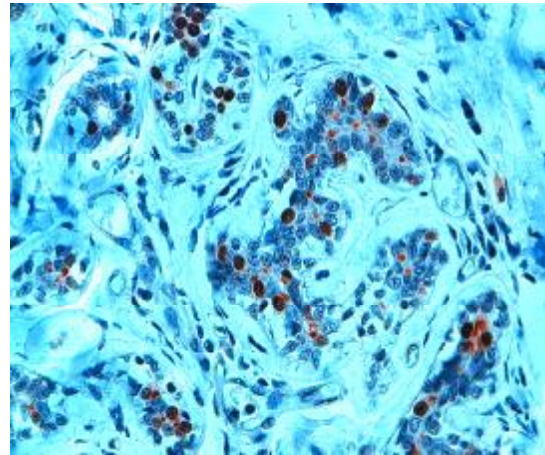
B: immunohistochimie par les récepteurs oestrogéniques

C: immunohistochimie par l'anticorps anti-CK8/18

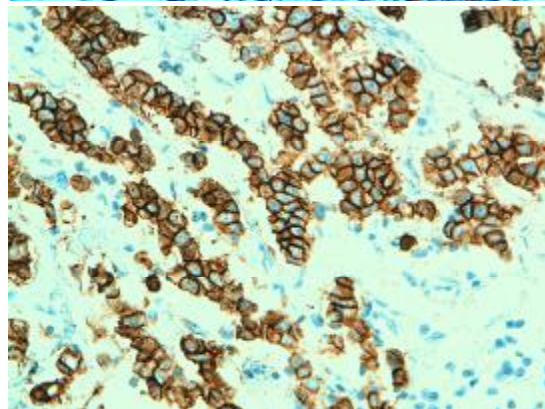
A



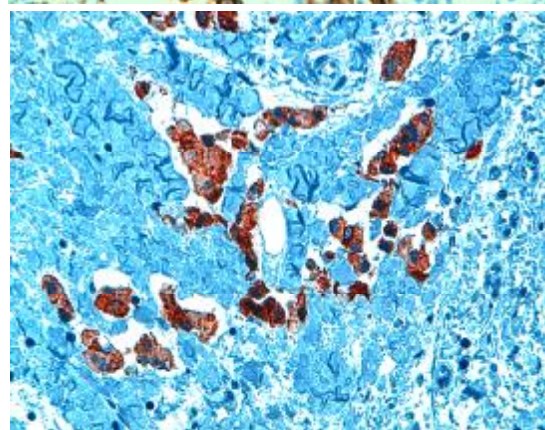
B



C



D



Laboratoire d'anatomie pathologique CHU Hassan II Fès

Figure 24 : carcinome canalaire infiltrant de phénotype luminal B

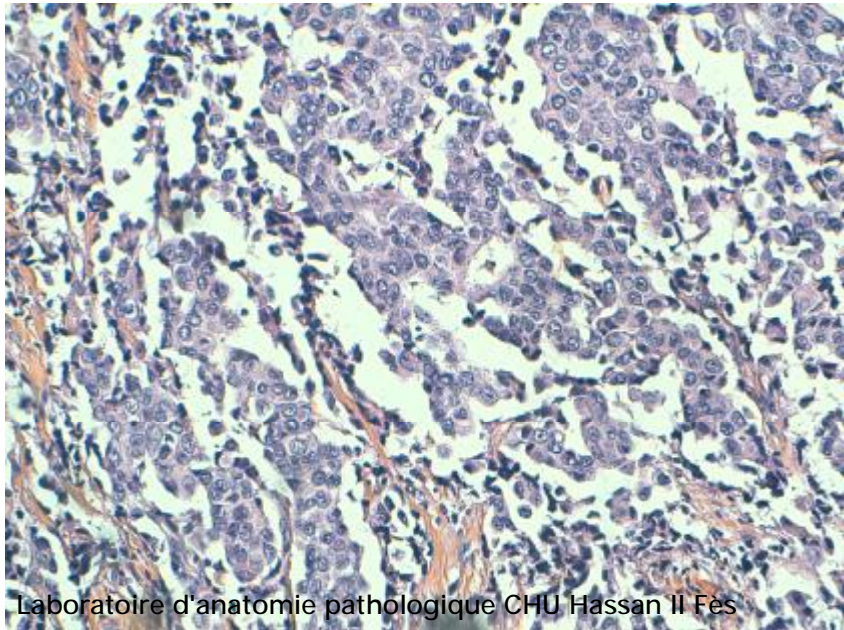
A: HES x400

B: immunohistochimie par les récepteurs oestrogéniques

C: immunohistochimie par l'Her-2

D: immunohistochimie par l'anticorps anti-CK8/18

A



B

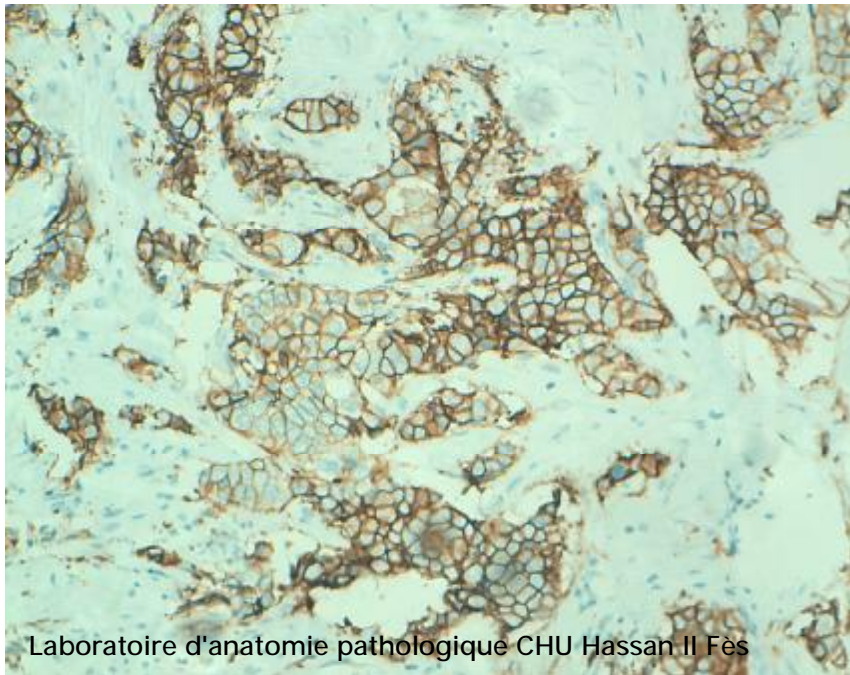


Figure 25 : carcinome canalaire infiltrant de phénotype Her-2

A: HES x400

B: immunohistochimie par l'Her-2

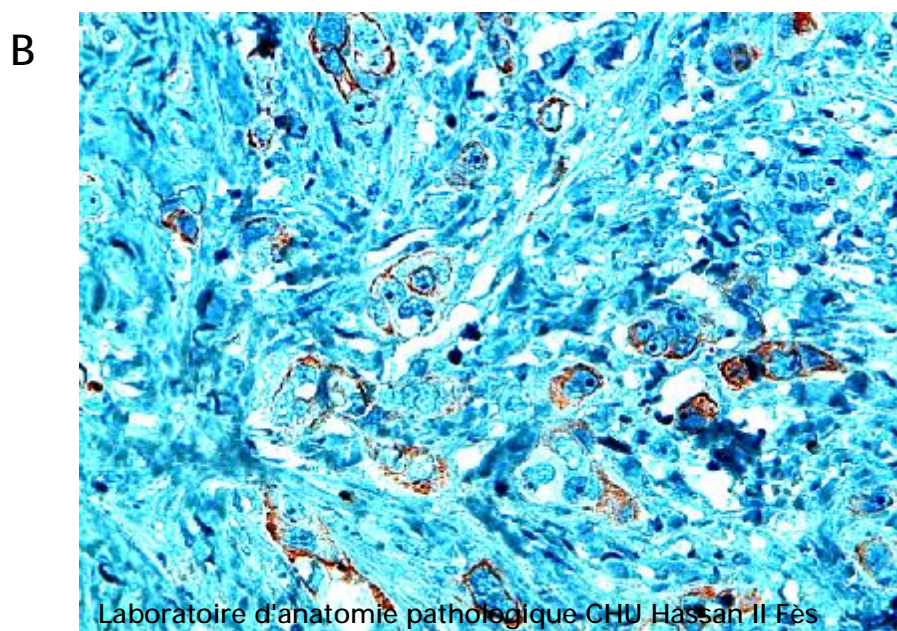
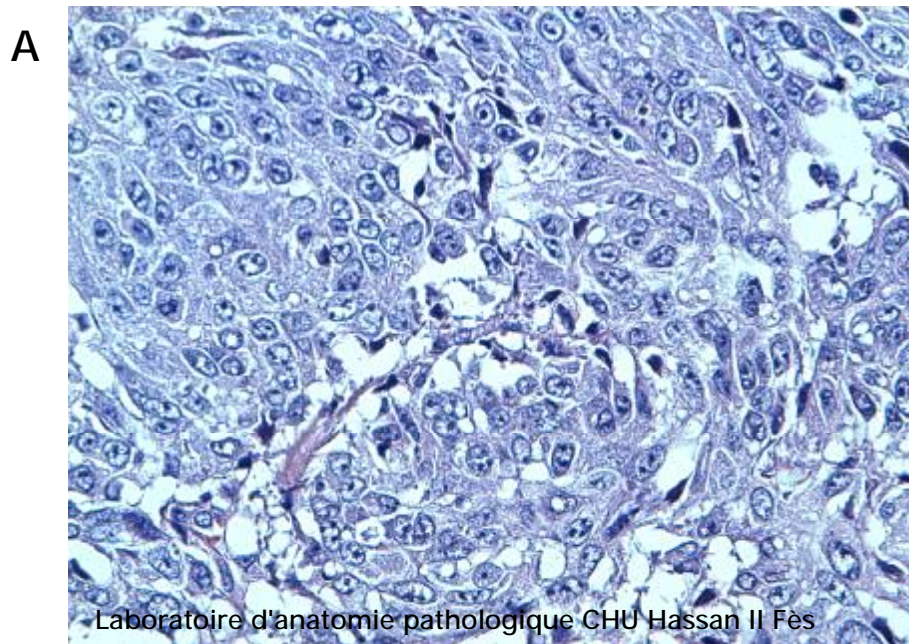


Figure 26: carcinome métaplasique de phénotype basal.

A: HES X 400

B: immunomarquage par l'anticorps anti-CK5/6.

1- Selon l'age:

Les sous types moléculaires du sein présentaient une différence selon l'âge du diagnostic, mais avec un $p=0,45$ du fait de la petite taille de l'échantillon. Les patientes du sous type basal étaient les plus jeunes avec une moyenne d'âge de 42,5 ans, en comparaison avec les patientes du sous type luminal A qui avaient un âge moyen de 50,1 ans.

Tableau 4 : l'âge moyen des différents sous types moléculaires des cancers du sein

Sous type (effectif)	luminal A (n=55)	luminal B (n=20)	Her-2 (n=18)	Basal (n=18)	Inclassable (n=19)
Age moyen (an)	50,1	47,5	45,8	44,5	50,2

2- selon le type histologique

Quant ils étaient groupés selon le type histologique, les sous types moléculaires présentaient une différence significative ($p=0,03$). Parmi les tumeurs basales, on a noté une haute prévalence des types histologiques de mauvais pronostic: carcinome métaplasique, papillaire et indifférencié. On a noté également une association entre le sous type luminal A et le carcinome lobulaire in situ.

Tableau 5 : répartition des différents sous types moléculaires selon le type histologie

Sous type (effectif)	luminal A (n=55)	luminal B (n=20)	Her-2 (n=18)	Basal (n=18)	Inclassable (n=19)	TOTAL (n=130)
Type histologique %						
CCI	43,2	16,2	13,5	10,8	16,2	100
CLI	57,1	14,3	14,3	14,3	0,0	100
Autres	25	8,3	16,7	50	0,0	100

3- Selon le grading SBR:

On a noté que les sous types moléculaires présentaient une différence significative selon le grade SBR ($p=0,001$). Les tumeurs basales se caractérisaient par le grade histologique le plus haut, contrairement aux tumeurs luminales qui se caractérisaient par un bas grade SBR.

Tableau 6 : répartition des différents sous types moléculaires selon le grade SBR

Sous type (effectif)	luminal A (n=55)	luminal B (n=20)	Her-2 (n=18)	Basal (n=18)	Inclassable (n=19)
Grade SBR %					
I	21,8	10,0	11,1	5,6	15,8
II	58,2	65,0	61,1	22,2	26,3
III	20	25,0	27,8	72,2	57,9
TOTAL	100	100	100	100	100

4- Selon la présence d'emboles vasculaires:

On n'a pas noté de différences significatives entre les différents sous types moléculaires en ce qui concerne la présence d'emboles vasculaires ($p=0,30$).

Tableau 7 : répartition des différents sous types moléculaires selon la présence d'emboles vasculaires

Sous type (effectif)	luminal A (n=55)	luminal B (n=20)	Her-2 (n=18)	Basal (n=18)	Inclassable (n=19)
Emboles %					
Présence	50,9	55,0	77,8	66,7	63,2
Absence	49,1	45,0	22,2	33,3	36,8
TOTAL	100	100	100	100	100

5- Selon l'association avec un carcinome in situ:

Le sous type luminal est significativement associé avec un contingent de carcinome in situ que les autres sous types ($p=0,029$).

Tableau 8 : répartition des différents sous types moléculaires selon l'association avec un carcinome in situ

Sous type (effectif)	luminal A (n=55)	luminal B (n=20)	Her-2 (n=18)	Basal (n=18)	Inclassable (n=19)	TOTAL (n=130)
CIS %						
Présence	55,8	15,4	15,4	5,8	19,2	100
Absence	33,3	15,4	12,8	19,2	7,7	100

6- Selon la taille tumorale:

Les sous types moléculaires présentait une différence significative selon la taille tumorale ($p=0,01$). Le sous type Her-2 avait la taille la plus élevée (4,5cm), suivi par le sous type luminal B (4,3cm), et le sous type basal (3,8cm), contrairement au sous type luminal A qui était associé avec une petite taille tumorale (2,9cm).

Tableau 9 : la taille moyenne des différents sous types moléculaires

Sous type (effectif)	luminal A (n=55)	luminal B (n=20)	Her-2 (n=18)	Basal (n=18)	Inclassable (n=19)
Taille moyenne (cm)	2,9	4,3	4,5	3,8	4,1

7- Selon l'envahissement ganglionnaire:

On a noté une différence significative entre les sous types moléculaires selon l'envahissement ganglionnaire ($p < 0,05$).

Parmi les tumeurs de phénotype Her-2; 86,7% étaient associées à un envahissement ganglionnaire, suivies par les tumeurs de phénotype basal (81,3%), les tumeurs de phénotype luminal B (68,8%), et enfin les tumeurs de phénotype luminal A qui ne présentaient que 52,4% des cas avec envahissement ganglionnaire.

8- Selon la présence de métastase à distance:

Parmi les différents sous types moléculaires, le sous type basal est fortement associé avec la présence de métastase, suivi par le sous type Her-2 ($p < 0,00001$).

Tableau 10 : répartition des différents sous types moléculaires selon la présence de métastases à distance

Sous type (effectif)	luminal A (n=55)	luminal B (n=20)	Her-2 (n=18)	Basal (n=18)	Inclassable (n=19)
Métastase %					
Présence	8,2	31,6	43,8	87,5	14,3
Absence	91,8	68,4	56,2	12,5	85,7
TOTAL	100	100	100	100	100

III- Analyse multivariée des métastases à distance

Tableau 11 : analyse multivariée à la recherche de facteurs associés aux métastases à distance

Variable	OR a	p
Association avec un CIS		
Oui	0,30	0,04
Non	1	
Classification moléculaire :		
Luminal A	1	
Luminal B	4,8	0,03
Her-2	8,6	0,003
basal	64,5	<0,0001

ORa : Odds Ratio ajusté

Le tableau 10 présente les résultats de la régression logistique. Notre modèle initial comportait l'âge, le grade SBR, l'association avec un carcinome in situ, la présence d'emboles vasculaires, la taille tumorale, l'envahissement ganglionnaire et la classification moléculaire du cancer du sein.

On a retenu pour le modèle final l'association avec un carcinome in situ et la classification moléculaire du cancer du sein.

L'analyse multivariée montrait un risque de survenue de métastases moins important chez les patientes qui ont une composante in situ. Après ajustement sur la classification moléculaire, on a noté que les phénotypes luminal B, Her-2 et basales présentent un risque plus élevé que le phénotype luminal A, avec un ORa= 64,5 pour le phénotype basal ($p < 0,00001$).

DISCUSSION

I. PROBLEMATIQUE DE LA PRISE EN CHARGE DU CANCER DU SEIN

Le cancer du sein est le cancer le plus fréquent et le plus meurtrier chez la femme au Maroc. Malgré les progrès accomplis ces dernières années, la survie stagne autour de 70 % à 5 ans. Les indications thérapeutiques sont fondées sur des facteurs pronostiques qui, globalement, ont peu évolué depuis une quinzaine d'années [21]. Pourtant, ces facteurs, histologiques, cliniques et moléculaires, sont insuffisants pour rendre compte de l'hétérogénéité évolutive de la maladie, conduisant un certain nombre de patientes vers des thérapeutiques inadaptées, toxiques, inutiles ou inefficaces. Étant donné la disponibilité croissante de nouvelles molécules antitumorales, il est crucial d'améliorer la classification pronostique du cancer du sein pour en affiner les indications thérapeutiques et améliorer la survie des patientes.

Face aux limites des approches conventionnelles, il est apparu que de nouvelles percées thérapeutiques ne seraient possibles qu'à travers une caractérisation moléculaire plus globale, détaillée et objective de la maladie.

Les altérations moléculaires du cancer du sein sont nombreuses et complexes. Certaines conduisent au cancer, d'autres concourent à un aspect phénotypique particulier, d'autres encore au caractère rapidement évolutif ou à la réponse à certains types de chimiothérapie.

Donc, l'initiation et la progression du cancer du sein sont un processus comportant des changements moléculaires multiples, dont beaucoup sont reflétés par des changements d'expression de gènes au niveau des cellules malignes.

Les exemples de tels gènes incluent ERBB2, CCDN1, MYC, UPA et PAI1 [23]. Il est ainsi probable que ces gènes aient limité la puissance prédictive une fois considérée isolément, mais que leur pertinence clinique peut être augmentée quand plusieurs gènes sont considérés ensemble.

Ceci implique que les cancers du sein sont un groupe hétérogène de tumeurs. La base génétique polygénique et multifactorielle de la maladie confère à chaque tumeur un phénotype et un potentiel évolutif propres [22]. Cette hétérogénéité mal appréhendée par les paramètres pronostiques actuels est une raison majeure des échecs thérapeutiques. Tandis que la plupart des patientes atteintes de cancer de sein reçoivent la chimiothérapie, moins de 20% d'entre elles auront une réponse anatomopathologique complète (disparition des cellules invasives dans les échantillons pathologiques de tissu), qui prévoit fortement la survie à long terme [21]. En conséquence, le taux de survie sans métastase des patients recevant la chimiothérapie néoadjuvante est seulement 60% [21]. Il y a un besoin véritable d'identifier les paramètres qui pourraient exactement prévoir l'efficacité de ce traitement pour chaque patiente.

Le développement récent des outils efficaces pour surveiller l'expression de gène sur une grande échelle fournit de nouvelles perspectives dans la participation des réseaux de gène et des voies de normalisation dans divers processus de tumeur. Il a également mené à la découverte de nouveaux indicateurs diagnostiques et pronostiques, et à l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques. Ces outils incluent les microarrays d'ADN, qui peuvent être employés pour explorer l'expression des milliers de gènes à la fois, et les analyses en temps réel de RT-PCR pour des études plus précises et plus quantitatives de l'expression d'un plus petit nombre de gènes choisis [4].

II. BASES IMMUNOHISTOCHIMIQUES

L'immunohistochimie en pathologie mammaire a pris une place de plus en plus importante au cours des dernières années, elle apporte les paramètres indispensables de la définition du pronostic et fournit le statut de marqueurs prédictifs de réponse à des thérapeutiques ciblées ou cytotoxiques classiques [24].

L'identification des sous-types moléculaires du cancer du sein met en lumière l'hétérogénéité de ces tumeurs, de leur pronostic et de leur réponse au traitement. Le sous-type basal-like correspond le plus souvent à des carcinomes de grade III, triples négatifs (RO-, RP-, HER2-) et exprimant les cytokératines de haut poids moléculaire (CK5/6, CK14) ou l'EGFR. Cette entité est associée à un pronostic très péjoratif qui devrait dans un avenir proche bénéficier d'une prise en charge thérapeutique spécifique [4-6]. Il est donc utile de rechercher l'expression des marqueurs basal-like parmi les tumeurs triples négatives de grade III.

La détermination immunohistochimique des marqueurs pronostiques et prédictifs de réponse aux traitements adjuvants et aux thérapeutiques ciblées est indispensable. La détermination du statut des récepteurs aux oestrogènes et à la progestérone et du statut de HER2 doit être faite au diagnostic initial.

L'évaluation de la prolifération par immunohistochimie est parfois utile, en particulier quand les lésions carcinomateuses infiltrantes sont de trop petite taille et que le grade histopronostique ne peut être établi selon les règles de Elston et Ellis avec une évaluation de l'index mitotique sur 10 champs à fort grossissement.

Les marqueurs superflus sont ceux dont la valeur diagnostique, pronostique ou prédictive, n'est pas validée ou incontestée, ou bien encore dont la détermination par d'autres méthodes s'avère plus fiable comme c'est le cas du statut de TP53 fourni par séquençage [24].

1. Technique

1-1 choix de l'échantillon pour la technique immunohistochimique :

En règle générale, un seul bloc de paraffine est suffisant pour réaliser la technique immunohistochimique [25-26]. L'échantillon utilisé doit être représentatif de la tumeur et de ses diverses composantes lorsque cela est nécessaire. Il est idéalement accompagné de tissu non tumoral pour servir de témoin (prélèvement réalisé à l'interface entre la tumeur et le tissu environnant ou fragment tumoral accompagné d'un autre fragment prélevé dans une zone non tumorale et inclus dans le même bloc). Sauf impossibilité, la technique immunohistochimique ne doit pas être réalisée sur le fragment congelé pour l'examen extemporané, car les résultats peuvent être aléatoires [27]. Il est pratiqué, lorsque cela est possible, de sélectionner lors de la macroscopie un échantillon bien taillé de 15mm de côté au plus et de 3mm d'épaisseur maximale, avec peu ou pas de graisse, destiné à l'étude immunohistochimique. L'utilisation de coupes préalablement stockées à température ambiante pendant plusieurs mois ou années ne permet pas d'obtenir des résultats fiables [28].

1-2 fixation - imprégnation en paraffine:

La maîtrise des conditions de fixation est un des éléments majeurs de la fiabilité de l'étude immunohistochimique [29]. Le délai avant fixation doit être le plus court possible [27]. La tumeur doit être tranchée pour permettre une bonne pénétration du fixateur dans le tissu. Le temps de fixation idéal avec le formol tamponné est de 24 heures [27]. L'utilisation d'une durée de fixation standardisée améliore la reproductibilité. Une fixation prolongée (48-72 heures) est sans conséquence sur la production d'un signal immunohistochimique correct lorsque la restauration antigénique est adaptée, alors qu'une fixation incomplète entraîne un résultat médiocre [27].

Un changement régulier des solutions dans les automates d'imprégnation en paraffine influe favorablement sur la qualité des coupes, la tolérance des tissus aux conditions de restauration antigénique par la chaleur et sur les résultats immunohistochimiques.

1-3 adhérence des coupes:

Les coupes doivent être étalées sur des lames recouvertes d'un adhésif performant (lames silanisées, lames en verre prétraité) et séchées pendant au moins une heure à 56-58°C et/ou toute la nuit à 37°C. Une baisse de l'intensité du signal immunohistochimique a été notée dans certains protocoles, lorsque le séchage des coupes est effectué à 56-58°C pendant plus d'une heure mais n'a pas été retrouvée dans d'autres études [30]. La finesse des coupes (2-3 microns) favorise une meilleure adhérence [31].

1-4 restauration antigénique par la chaleur:

Cette étape est essentielle et indispensable avec la majorité des anticorps [32-33]. Elle est facultative avec l'anticorps KD68 mais améliore parfois les résultats obtenus avec celui-ci [34]. La restauration antigénique peut être effectuée dans un four à micro-ondes, un autocuiseur, un autoclave, une étuve, un bain marie ou un dispositif de cuisson à la vapeur [35-36]. Les tampons les plus utilisés sont le citrate 0,01M, pH6 ou l'EDTA 1mM, pH8. Bien que certaines études suggèrent que le chauffage à hautes températures sous pression puisse produire les meilleurs résultats [36-29], il semble possible d'obtenir des résultats appropriés avec chaque type de chauffage sous réserve que la température atteinte et le temps d'exposition à cette température soient adaptés : par exemple, deux minutes sous pression dans un autocuiseur (température aux environs de 120°C) sont équivalents à une nuit à l'étuve à 60 °C. Chaque laboratoire doit effectuer un calibrage de son temps de

restauration antigénique, en sachant qu'il vaut mieux pratiquer un temps de restauration antigénique un peu plus long que court, dans la mesure où un temps prolongé ne génère pas de faux positifs [37]. Cependant, l'utilisation d'un temps de restauration antigénique long nécessite une préparation parfaite des coupes pour éviter les phénomènes de décollement. Les protocoles utilisant une restauration antigénique à des températures inférieures à 100°C produisent moins d'artéfacts [38]. Leur contrepartie est un allongement du temps technique.

1-5 anticorps primaires:

Sur coupes de tissus fixés et inclus en paraffine, les anticorps donnant des résultats corrélés avec les méthodes biochimiques et significatifs sur le plan clinique sont :

- pour le récepteur aux oestrogènes : le clone 1D5 [39] et le clone 6F11 [40];
- pour le récepteur à la progestérone : les clones 1A6 et KD68 [41].
- pour l'HER2: l'anticorps polyclonal DAKO DA485 et 4B5 Ventana [29].

1-6 systèmes révélateurs:

Les systèmes révélateurs (principalement systèmes avidine-biotine ou streptavidine-biotine), les marqueurs enzymatiques (peroxydase de raifort et plus rarement phosphatase alcaline), et les chromogènes (pour la peroxydase, diaminobenzidine ou amino-ethyl-carbazole) qui sont couramment utilisés permettent d'obtenir de bons résultats. L'avantage de la diaminobenzidine est de produire des marquages s'altérant peu au stockage. L'usage de systèmes comportant une amplification du signal (catalyse par la tyramine) n'est pas nécessaire.

1-7 contre coloration:

La contre coloration doit être minime, suffisante pour visualiser tous les noyaux et pas trop forte pour ne pas empêcher l'appréciation de marquages faibles.

1-8 automatisation:

Les automates ne produisent pas forcément des résultats supérieurs à la technique manuelle mais peuvent améliorer la reproductibilité interne. Actuellement, ils ne prennent pas en charge la restauration antigénique par la chaleur qui est une étape-clé dans la détection immunohistochimique des récepteurs hormonaux sur coupes en paraffine. Pour certains anticorps primaires ont été décrits des effets délétères dus à certains additifs rentrant dans la composition des tampons utilisés dans les automates [42].

1-9 témoins :

Glandes non tumorales (témoins internes)

Chaque fois que cela est possible, l'échantillon à analyser doit inclure du tissu mammaire non tumoral (structures épithéliales normales, dystrophiques ou hyperplasiques) pour servir de témoin interne. Exceptionnellement, une analyse minutieuse peut ne pas retrouver de marquage du tissu mammaire non tumoral, en raison de variations physiologiques ou étant donné la proportion parfois très faible d'éléments non tumoraux marqués [25-29].

Témoins externes

Le témoin externe qui fournit les informations les plus pertinentes sur la performance technique est représenté par un cas faiblement positif. Un cas fortement positif, un cas faiblement positif et un cas négatif peuvent être regroupés dans un seul bloc. Les lames témoins sont coupées dans le bloc à chaque emploi. Si elles sont préparées à l'avance, les lames témoins doivent être utilisées dans les

deux mois car, au-delà, leur réactivité devient aléatoire [43]. Le stockage des blocs témoins ne nécessite pas de condition particulière. Les témoins externes ont plusieurs usages : calibrage de la technique à chaque changement de lots d'anticorps ou de système révélateur; utilisation en tant que témoin lorsque l'échantillon ne renferme pas de témoin interne ou comporte des glandes non tumorales négatives. L'utilisation systématique de témoins externes lors de chaque technique est recommandée. Elle est indispensable pour conclure qu'une tumeur ne contient pas de récepteurs hormonaux lorsqu'il n'est pas observé de témoin interne positif [29].

2. Lecture

2-1 Récepteurs hormonaux :

2-1-1 appréciation des marquages:

L'appréciation doit se faire sur l'ensemble de la lame. À la lumière des connaissances actuelles, seul le marquage nucléaire d'éléments carcinomateux invasifs a une valeur clinique reconnue. Le marquage nucléaire peut parfois être accompagné d'un léger marquage cytoplasmique dont la présence ne doit pas faire invalider la technique. Lorsque le marquage cytoplasmique est prédominant, ou lorsqu'il est important en intensité et en étendue, il est recommandé de recommencer la technique et, si cette prédominance persiste, de formuler les résultats avec réserves. L'analyse des marquages doit aboutir à déterminer le pourcentage de cellules marquées par rapport à l'ensemble des cellules carcinomateuses dans le contingent invasif et à apprécier l'intensité moyenne de ce marquage (0 = absence de marquage ; 1 = marquage faible visible seulement à un fort grossissement ; 2 = marquage d'intensité moyenne repérable à un faible grossissement; 3 = marquage de forte intensité apparaissant très nettement dès le faible grossissement) [25].

2-1-2 chiffrage des résultats – valeur seuil:

Il n'y a pas de consensus international sur les valeurs-seuils et sur la formulation des résultats immunohistochimiques des récepteurs hormonaux. Il est néanmoins recommandé d'utiliser comme seuil la valeur de 10 % de cellules marquées, sans prendre en considération l'intensité du marquage. Ce choix est justifié par les arguments suivants :

- ce seuil de 10 % de cellules marquées a été utilisé par plusieurs études avec corrélation clinique [44-45]
- il est pratiquement équivalent à d'autres seuils utilisés (positivité à partir d'une cellule marquée ou de 5 % de cellules marquées) [25];
- et il constitue un paramètre relativement reproductible.

En pratique, l'appréciation de ce paramètre ne nécessite pas l'emploi d'un analyseur d'images. Le résultat formulé sur la base de ce seuil de 10 % de cellules marquées peut être accompagné d'un score prenant en compte à la fois l'intensité et le pourcentage, notamment si ce paramètre a été validé par le laboratoire à partir d'études corrélatives avec la biochimie ou avec la clinique.

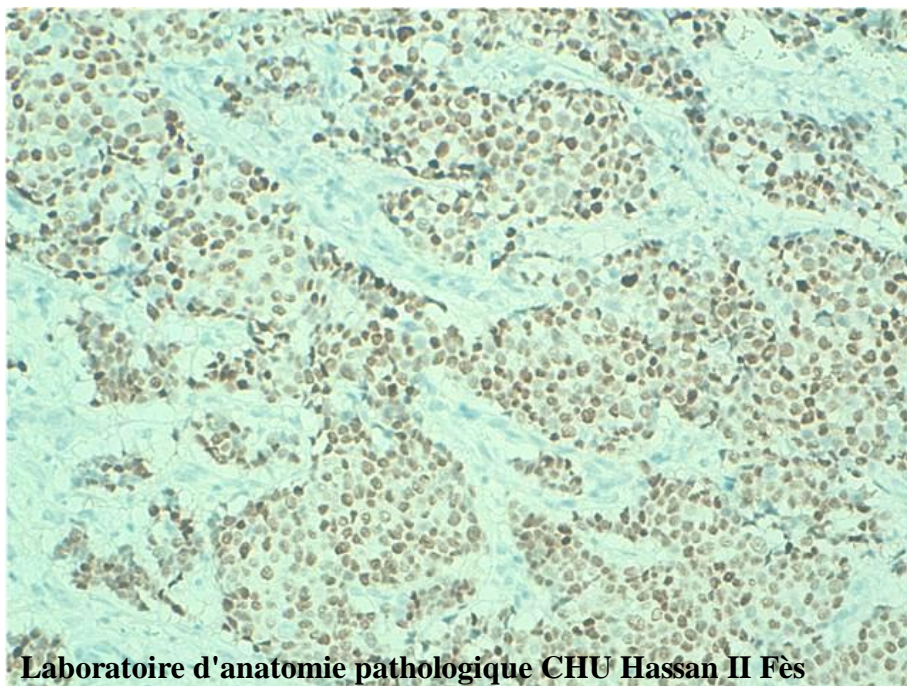


Figure 27 : récepteurs progéstatifs d'intensité ++ sur 90% des cellules tumorales

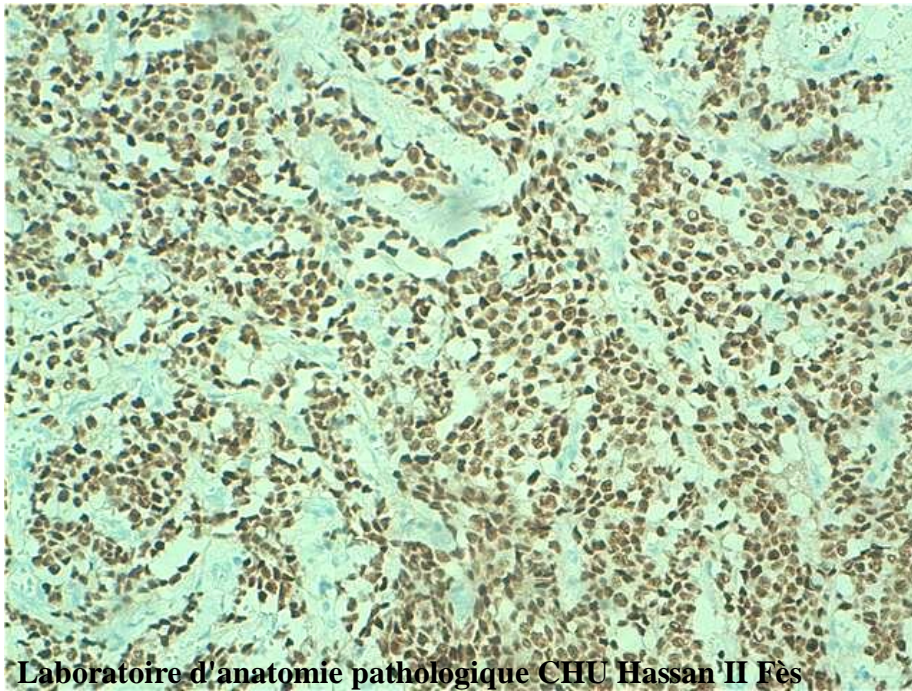


Figure 28: récepteurs oestrogéniques d'intensité +++ sur 95% des cellules tumorales

2-1-3 interprétation des tumeurs sans marquage avec glandes non tumorales négatives ou absentes:

La technique doit comporter impérativement des témoins externes qui prennent toute leur valeur si la tumeur a été fixée selon des modalités comparables à celles des témoins. Lorsque les conditions de fixation de la tumeur sont mal connues ou différentes de celles des témoins externes, il est conseillé de formuler l'interprétation avec des réserves et de considérer le marquage d'autres paramètres (MIB-1 notamment). La technique peut être refaite en prenant un autre bloc de tumeur. Dans des conditions techniques optimales et lorsque la tumeur est accompagnée de deux ou trois lobules mammaires non tumoraux, la présence de quelques noyaux de glandes non tumorales marqués avec une intensité au minimum moyenne est observée de façon pratiquement constante [25].

2-2 l'HER-2 :

2-2-1 appréciation des marquages:

Le signal immunohistochimique spécifique est un marquage membranaire intense et complet des cellules néoplasiques. Ce signal « en maille de filet » peut être également observé dans les carcinomes intracanalaires, le plus souvent de haut grade. Seul un marquage du contingent carcinomateux invasif doit être pris en compte dans l'évaluation du statut ERBB-2 dans la perspective d'un traitement par Herceptine®. Un marquage cytoplasmique seul n'est pas significatif. Il peut être associé avec le marquage membranaire, principalement avec les anticorps dirigés contre la portion cytoplasmique. Il s'observe plus fréquemment dans des tissus fixés avec des fixateurs alcooliques et peut être gênant en cas d'évaluation par analyse d'image. Un signal dans le parenchyme mammaire normal témoigne d'un niveau de sensibilité trop élevé de la technique, détectant un niveau d'expression normal de ERBB-2 [46]. Ces aspects s'observent en particulier en cas de démasquage antigénique préalable par la chaleur et avec les anticorps polyclonaux.

2-2-2 chiffrage des résultats:

Il faut transcrire le résultat et l'exprimer selon le score utilisé pour la décision thérapeutique [47] :

- Au faible grossissement (Objectif X2 ou X4) : si la majorité des cellules tumorales présentent une positivité nette et distincte, il s'agit d'un 3+, à contrôler au X10. Le score 3+ se porte au faible grossissement (marquage membranaire intense et complet de plus de 30% de cellules tumorales).
- Au grossissement moyen (Objectif X10) : s'il y a un marquage net de la majorité des cellules, mais à un niveau moindre qu'un 3+, il s'agit d'un 2+ ; si le marquage est moins distinct, incomplet et « demande » à être observé à un grossissement supérieur, il s'agit d'un 1+. Les scores faibles (1+, 2+)

se portent au grandissement moyen et se confirment au fort (X40) grandissement. Si l'on doit vérifier à l'objectif X20 ou au X40, l'intégrité d'un marquage membranaire, il ne peut pas s'agir d'un 3+.

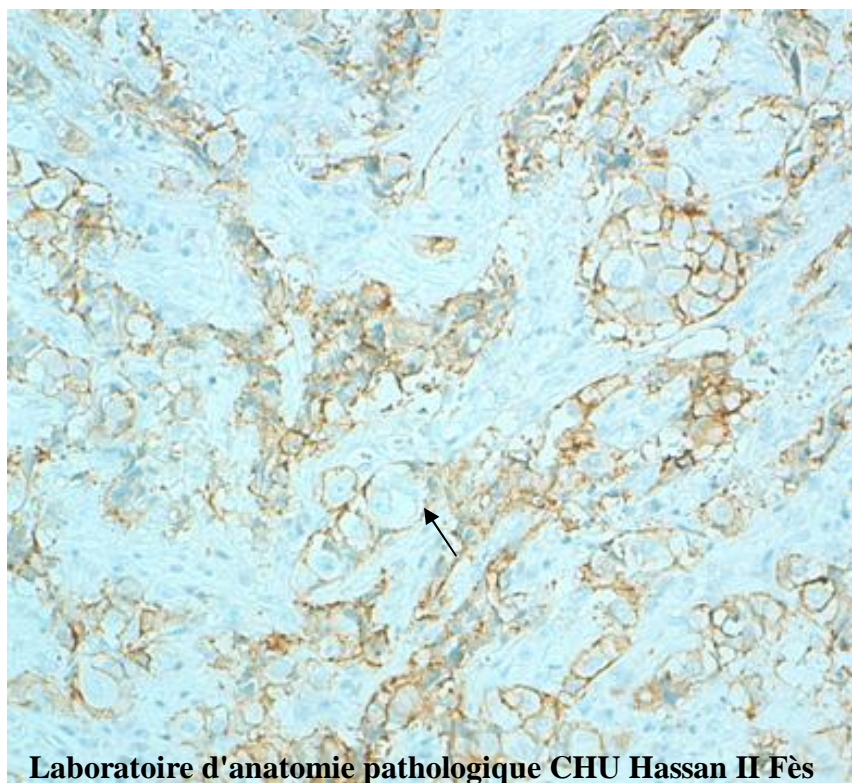


Figure 29 : HER2 score 2+

Flèche: marquage membranaire complet et faible

Dans le compte rendu final, qui est conclu par le score à usage thérapeutique, doivent figurer en clair le pourcentage et l'intensité des cellules marquées [46].

Tableau 13 : score HER2 utilisé par l'AMM de Herceptine

Score	Marquage	Interprétation	Indication d'Herceptine
0	Absence < 10% cellules +	Négatif	Non
1+	≥ 10% cellules +, marquage membranaire incomplet et faible.	Négatif	Non
2+	≥ 10% cellules +, marquage membranaire complet et faible/modéré.	Cas douteux	Faire FISH avant décision thérapeutique
3+	≥ 30% cellules +, marquage membranaire complet et intense.	Positif	Oui

III- BASES GENETIQUES

Comme dans les autres organes, il est devenu évident que le cancer du sein survient à la suite de lésions cumulatives d'un ou plusieurs gènes, incluant l'activation d'oncogènes (exemple par amplification génique), et par inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs (exemple par mutations et délétions géniques).

1- Altérations génétiques somatiques dans le cancer du sein

1-1 Méthode d'étude des altérations somatiques

1-1-1 Mesure du contenu en ADN

La cytométrie en flux permet, après coloration des noyaux par un colorant spécifique de l'ADN, de mesurer la quantité d'ADN, proportionnelle à la quantité de fluorescence émise par les cellules. Une forte proportion des tumeurs du sein (environ 70 %) est aneuploïde.

1-1-2 Analyse cytogénétique

Au premier regard, l'observation d'un caryotype de tumeur de sein ne montre qu'un ensemble complexe d'anomalies chromosomiques que l'on aurait tendance à prendre pour le reflet de perturbations non spécifiques. Pourtant, certaines de ces anomalies semblent récurrentes apportant ainsi de précieux renseignements sur la localisation de gènes potentiellement impliqués dans ce cancer [48]. Par exemple, le chromosome 1, le plus fréquemment altéré dans les tumeurs du sein, est affecté par des monosomies 1p, des polysomies 1q, des isochromosomes 1q ainsi que des délétions télomériques du bras court. D'autres pertes (3p24,p26 ; 6q22,q27 ; 11q22,q25 ; et 17p13,1) et gains (8q) sont aussi fréquemment observés.

1-1-3 Hybridation in situ

Elle permet de mettre en évidence des régions amplifiées ou perdus du génome. Cette technique a ainsi permis de caractériser une vingtaine de régions chromosomiques amplifiées et délétées dans les tumeurs du sein [49]. Certaines de ces régions, précédemment détectées par des techniques cytogénétiques et moléculaires, semblent associées à des oncogènes – 8p11 (EGFR1), 8q24 (MYC), 11q13 (CCND1) et 17q12 (ERBB2) –ou à des gènes suppresseurs de tumeurs connus– 13q14 (RB1), 17p13 (TP53) [48].

1-1-4 Analyse moléculaire

Les anomalies génétiques les plus fréquemment observées dans les tumeurs du sein sont des amplifications d'ADN, principalement au niveau de proto-oncogènes, de facteurs de croissance et de leurs récepteurs, mais aussi des mutations, des hyperméthylations et des pertes d'allèle (LOH pour loss of heterogosity) qui pourraient inactiver des gènes suppresseurs de tumeurs [50].

1-2- Gènes altérés dans le cancer du sein

1-2-1 Amplification et surexpression de proto-oncogènes

Trois proto-oncogènes ont été trouvés amplifiés dans plus de 15 % des tumeurs mammaires :

- Proto-oncogène MYC :

Ce gène, localisé en 8q24, code pour un facteur de transcription impliqué dans la croissance et la différenciation cellulaire et dans l'apoptose [51]. Cependant, il ne possède pas encore d'application thérapeutiques

- Proto-oncogène ERB-B2

Ce gène appartient à la famille des gènes ERB-B dont le premier découvert (ERB-B1 ou EGFR) est le récepteur de l'EGF (epidermal growth factor). Plus

récemment, deux autres gènes de cette famille, ERB-B3 et ERB-B4, ont été identifiés. Cette famille multigénique code pour des récepteurs trans-membranaires à activité tyrosine kinase. A ce jour, il n'est pas connu de ligand spécifique ou du récepteur Erb-B2. En fait, Erb-B2 ne serait pas un récepteur à part entière, mais un modulateur de signaux transmis par l'intermédiaire des récepteurs Erb-B1 (EGFR), Erb-B3 et Erb-B4 en formant des hétérodimères avec ces dernières [52]. Bien que les quatre gènes de la famille Erb-B semblent tous intervenir dans l'oncogénèse mammaire, seul le gène Erb-B2 est significativement amplifié dans les tumeurs du sein. Il est surexprimé dans environ 20 % des cancers du sein invasifs et dans 60 % des comédocarcinomes [50].

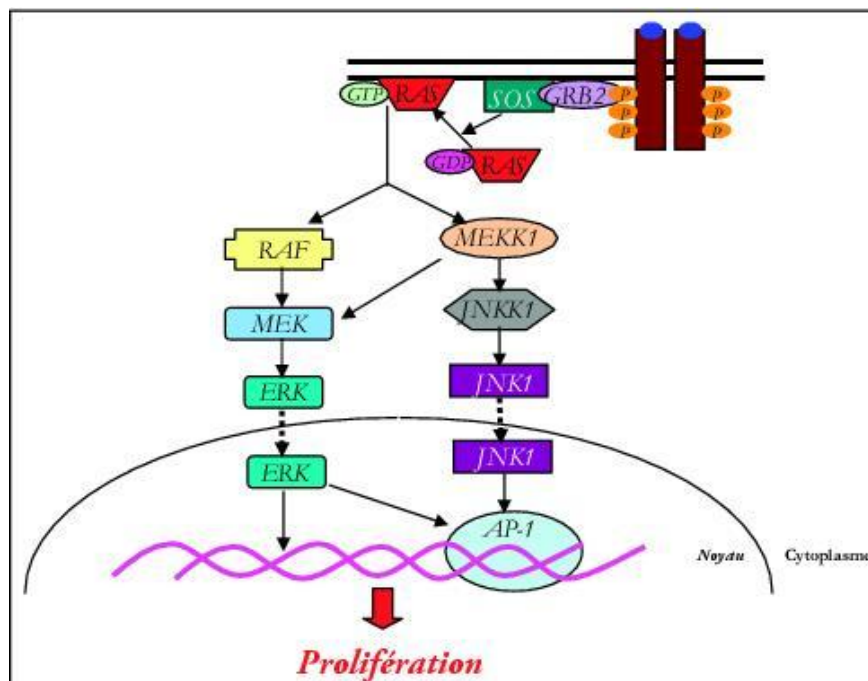


Figure 30 : voie de signalisation de l'Her-2

- Proto-oncogène CCND1

Ce gène code pour la cycline D1. La surexpression de ce gène a été identifiée dans des adénocarcinomes mammaires des souris transgéniques [53].

D'autres gènes ont été trouvés amplifiés à moindre taux (10 % et moins) dans des tumeurs mammaires. C'est le cas des gènes FGFR1 (8p11) et FGFR2 (10q26), qui codent pour deux récepteurs membranaires de facteurs de croissance de la famille

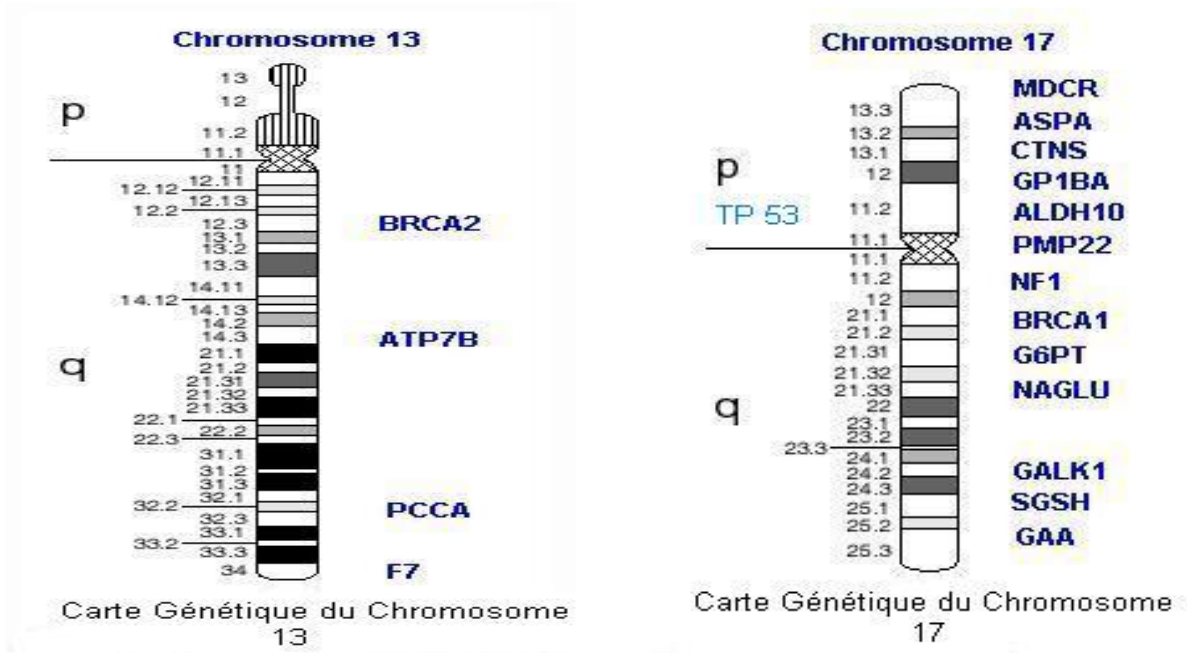
FGF (fibroblast growth factor), et du gène IGF1R (15q26) codant pour le récepteur de l'IGF1 (insulin-like growth factor1) [50].

1-2-2 Inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs

- Le groupe des gènes BRCA

Il y a deux gènes connus dans le groupe de ces gènes : BRCA1 et BRCA2. Ils ont été découverts en 1994 et 1995 et ils sont localisés sur les chromosomes 17 et 13 respectivement [54].

Les études épidémiologiques indiquent qu'une femme porteuse d'une mutation de BRCA1 présente un risque de cancer du sein au cours de sa vie (risque cumulatif) de 80 %, ce chiffre est à comparer avec celui d'une population féminine sans anomalie génétique qui est de 8 %. Pour le gène BRCA2 le risque de cancer du sein est de 50 à 85 %. La survenue du cancer est dans ce cas plus tardive qu'avec une mutation de BRCA1 [50-55].



Carte des deux chromosomes porteurs des mutations connus pour le gène BCRA 1 sur le chromosome 13 et le gène BCRA2 sur le chromosome 17.

Les gènes BRCA1 et BRCA2 codent pour des protéines impliquées physiologiquement dans la réparation des lésions de l'ADN. BRCA1 est une protéine clé dans la détection de lésions de différentes natures, cassures simple et double-brin, anomalies nucléotidiques, dans l'adaptation du cycle cellulaire à la phase de réparation ainsi que dans la mobilisation des protéines de réparation proprement dites. BRCA2 apparaît avoir un rôle plus spécifique dans la recombinaison homologue [55]. Bien que BRCA1 et BRCA2 aient une expression ubiquitaire, le risque tumoral, secondaire à l'inactivation complète de l'une ou l'autre de ces protéines, est principalement mammaire, et dans une moindre mesure ovarien. L'hypothèse la plus communément admise pour expliquer ce paradoxe repose sur le rôle des oestrogènes qui, par leur effet mutagène direct et leur effet prolifératif indirect, favoriseraient l'émergence du processus tumoral [56].

Un grand nombre de mutations peuvent affecter BRCA1: environ 500, et elles sont réparties tout le long du gène; de même pour BRCA2: environ 300 mutations qui sont, elles aussi, réparties sur toute la longueur du gène. En effet il faut rechercher chacune de toutes les mutations possibles pour chacun des deux gènes, pour pouvoir affirmer l'origine génétique des cas de cancers de la famille. Après la première identification, les dépistages au sein de la famille sont plus simples car la modification génique précédemment identifiée est la seule à être recherchée [57].

- Le gène TP53

Le gène TP53 est localisé sur le chromosome 17p (voir carte chromosomique ci-dessus). Les mutations germinales du gène TP53 sont dominantes. Ce gène code pour une phosphoprotéine nucléaire de 53kd. Elle a deux rôles principaux : régulateur négatif de la croissance et de la prolifération cellulaire ; réparation des altérations de l'ADN. En cas de modification de la molécule d'ADN, la protéine p53 arrête le cycle cellulaire en phase G1, permettant aux mécanismes de réparations de l'ADN de se mettre en oeuvre avant la duplication de ce dernier. La protéine p53 est

aussi un acteur de la mort cellulaire programmée. Une inactivation du gène TP53 permettrait le maintien des modifications de l'ADN et de ce fait un développement à terme, de cellules malignes [58-59].

Le gène TP53 serait impliqué dans environ 25 à 30 % des cas de cancers du sein. Bien que les mutations germinales du gène TP53 soient présentes dans toutes les cellules somatiques, les tumeurs malignes, dont les mutations sont la cause, ne sont présentes que dans les cellules de certains organes, les cellules cibles [18-59-60]. Les mutations de la lignée TP53 augmente de façon générale le risque de cancer et plus fortement le risque de cancer du sein. L'ensemble des problèmes causés par ces mutations a été appelé le syndrome de Li-Fraumeni [18].

- Le gène ATM

En 1999, une équipe américaine a mis en évidence une interaction entre deux gènes de l'organisme dont les mutations simultanées pourraient être à l'origine de 10 % de tous les cancers du sein. Ces deux gènes sont BRCA1 et ATM. Le gène ATM est localisé sur le chromosome 11q22-23, il a été caractérisé en 1995. Ses rôles sont divers : il participe aussi bien au contrôle du cycle cellulaire (G1 et G2), à la réparation des cassures double-brins, à la recombinaison au cours de la méiose, qu'à la maturation des gènes d'immunoglobulines. La portion codante est grande : 12 000 paires de bases. C'est au niveau de la réparation des cassures double brin de l'ADN qu'il y a interaction entre les deux gènes : un des produits du gène ATM est responsable de la phosphorylation de la protéine BRCA1, nécessaire à la réparation des cassures dans les doubles brins d'ADN après action de radiations ionisantes [61].

Très peu d'autres gènes suppresseurs de tumeur montrent la présence d'un taux non négligeable de mutations somatiques dans les tumeurs. On peut cependant noter le gène CDH1 codant pour la cadhérine E qui semble muté spécifiquement dans les carcinomes lobulaires invasifs [50].

2- profils d'expression génique en cancérologie mammaire

Les récentes avancées dans la connaissance de la génétique moléculaire, associées aux nouvelles techniques à haut débit, offrent l'opportunité d'identifier de nouveaux marqueurs diagnostiques, pronostiques, ainsi que de nouvelles cibles thérapeutiques. La technique récemment développée des « tissue microarrays » (TMA) autorise la fabrication d'un profil d'expression moléculaire sur des échantillons cliniques. Le pathologiste est maintenant capable d'établir ce profil sur une très large échelle de l'immunohistochimie (IHC), de l'hybridation in situ en fluorescence (FISH) ou de l'hybridation in situ sur ARN (CISH).

Cette méthode offre de nombreux avantages : très grand nombre de cas analysés simultanément pour de très nombreux marqueurs, techniqués dans des conditions identiques, sur des quantités faibles de matériel d'archive, donnant une excellente corrélation avec les méthodes standards, tout en permettant une économie de temps, d'anticorps ou de sondes.

La puce à ADN (DNA microarray ou DNA chip en anglais) définit un ensemble de procédés caractérisés par un même schéma expérimental : un acide nucléique (ADN/ARN) à caractériser, la cible, est extrait d'un groupe homogène de cellules ou d'un tissu d'intérêt, puis « marqué » (coloré avec un composé fluorochrome ou marqué radioactivement) et co-hybridé avec un acide nucléique provenant d'un groupe cellulaire témoin, sur un support solide (lame de verre, membrane de nylon...) présentant à sa surface entre 100 et 100 000 spots d'acides nucléiques immobilisés, à séquences et emplacements connus, les sondes [62-63-64-65].

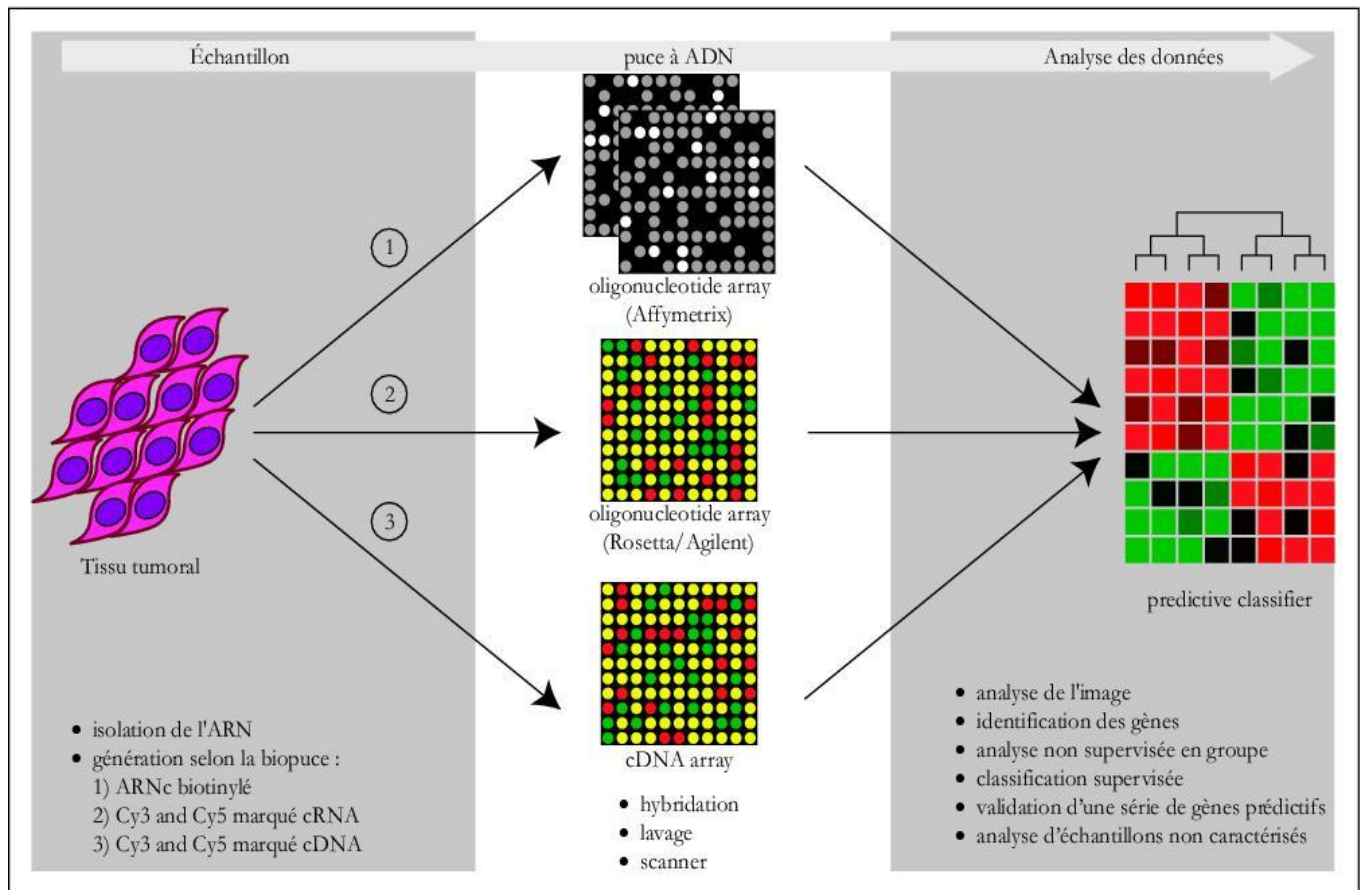


Figure 31 : vue schématique des différentes étapes d'analyse des cellules tumorales par les biopuces d'expression. Le marquage de la cible diffère selon le type de biopuce utilisé tandis que l'analyse des résultats d'hybridation n'est pas spécifique d'une méthode donnée.

Selon le type de biopuces à ADN utilisé, il sera possible d'étudier le génome ou le transcriptome d'un groupe homogène de cellules (ou un tissu). L'ADN génomique d'intérêt est extrait de deux groupes de cellules, un échantillon témoin et un échantillon de cellules d'intérêt. L'ADN d'intérêt, marqué en rouge par exemple, est co-hybridé sur la lame avec l'ADN génomique témoin coloré en vert. L'intensité et la couleur du signal émis en fin d'hybridation par chacun des spots d'ADN génomique permettent de déterminer le type d'altération génomique pour ce fragment d'ADN. Ainsi un spot rouge démontrera une sur-représentation de cette région d'ADN génomique dans les cellules étudiées (amplification, duplication),

tandis qu'un spot vert démontrera une perte de matériel génétique pour cette région d'ADN génomique (délétion, perte d'allèle).

Si la première publication rapportant le dépôt d'acide nucléique sur une lame de verre traitée date de 1991, la première application du dépôt d'ADN sur des lames de verre traitées, afin d'étudier en une seule expérimentation les échantillons complexes d'ADN, a été réalisée par le laboratoire de Patrick Brown à l'université de Stanford aux États-Unis, dès 1995 [66]. Cette même équipe a appliqué la technique des biopuces à ADN à l'étude des états d'expression d'un groupe cellulaire tumoral, à un moment donné [67]. Ces travaux constituent la base technique d'un grand nombre d'études utilisant les microarrays [68].

C'est en cancérologie que l'utilisation des biopuces est désormais la plus courante. Ainsi, il est possible de déterminer l'état d'expression de groupes tumoraux définis et homogènes (profiling) avec pour finalité une classification des tumeurs fondée sur ces profils d'expression (clustering) [69]. La plupart de ces classifications réalisées à partir des profils d'expression génique de tumeurs recourent les classifications anatomopathologiques et/ou immunohistochimiques, mais font également apparaître de nouveaux sous-groupes tumoraux de définition ou d'évolution différentes des précédents [70]. Cela permet de confirmer en partie la réalité phénotypique des résultats des biopuces et d'appréhender la diversité biologique pour une même tumeur.

Pour des raisons essentiellement techniques (homogénéité tissulaire et facilité d'obtention des cellules tumorales), les leucémies et lymphomes ont été parmi les premières tumeurs étudiées, classées puis prédites [71]. Pour le cancer du sein, les premières études ont été effectuées sur des lignées cellulaires tumorales. Elles ont permis d'affiner les méthodologies expérimentales puis de montrer qu'il était possible de séparer deux lignées cellulaires sur la base de leurs différences d'expression génique. Elles ont permis aussi de caractériser certaines régions

géniques cibles altérées dans les tumeurs du sein (régions chromosomiques 17q12 et 17q23) [72]. Les travaux ont été poursuivis sur des échantillons tumoraux et se classent en deux catégories : utilisation de profil d'expression génique pour différencier des états tumoraux ou détermination de séries de gènes utilisables comme marqueurs prédictifs d'évolution tumorale.

Initialement, les auteurs ont choisi de décrire des différences d'expression génique entre tissu tumoral mammaire invasif sans distinction claire de sous-groupes histologiques et tissus mammaires sains [73]. Ces premières données montrent la corrélation de la surexpression du gène ERBB2 dans les tumeurs mammaires de mauvais pronostic (N+) et la distinction sur le profil d'expression génique entre tumeurs mammaires exprimant le récepteur aux œstrogènes (RE+) et celles ne le présentant pas (RE-). Puis cinq équipes ont publié des données de biopuces utilisées pour classer, corréler puis prédire l'évolution de cancers du sein.

Tout d'abord, l'équipe de Brown et Botstein (Stanford, États-Unis), en lien avec celle d'Anne-Lise Borresen-Dale (Oslo, Norvège), a choisi comme stratégie d'étude des tumeurs du sein la définition de sous-groupes de tumeurs fondée sur les profils d'expression génique de plusieurs centaines de gènes. Utilisant entre 496 et 534 gènes, ils ont documenté la possibilité de séparer des tumeurs RE+ et RE- et définissent, parmi ces catégories, quatre groupes de tumeurs du sein : basal-like, ERBB2 surexprimé, normal-like et luminal/epithelial RE+ [74]. Utilisant de nouvelles méthodes statistiques, ils ont précisé leurs groupes en divisant en deux sous-groupes A et B le groupe luminal/epithelial, puis en corrélant les groupes basal-like et luminal B à un mauvais pronostic [75]. Ces corrélations ont été précisées sur des groupes indépendants de tumeurs du sein déjà étudiés et publiés par les équipes de Bernards (Amsterdam, Pays-Bas) et Nevins (Durham, États-Unis), confirmant ainsi en partie la robustesse de leur approche statistique et la pertinence biologique de leurs groupes de tumeurs [76].

IV. LES SOUS TYPES DES CANCERS DU SEIN

Comme l'on a déjà cité, Les études du développement canalaire du sein normal suggère l'existence d'une cellule progénitrice (souches ou basale) qui, par deux lignées séparées, donne naissance à deux types de cellules matures : la cellule épithéliale luminale interne (glandulaire) et la cellule myoépithéliale externe [77-78]. Les protéines de filaments intermédiaires nommées cytokératines sont exprimées en des combinaisons différentes dans ces deux distincts types cellulaires épithéliales. Par exemple, les cytokératines basales CK5, CK6, et CK14 sont exprimées dans la majorité des cellules myoépithéliales mammaires, tandis que les cytokératines CK8, CK18 et CK19 sont caractéristiques des cellules lumineales. Les études immunohistochimiques ont suggéré de plus loin que l'expression des cytokératines est conservée pendant la cancérogenèse, ce qui permet la discrimination des sous types immunophénotypiques des cancers du sein : basal/myoépithélial et luminal.

Selon les études basées sur la génétique, plusieurs équipes ont proposé d'identifier les sous-types moléculaires en utilisant les outils diagnostiques conventionnels. Des sous-classes moléculaires ont été d'abord définies selon les récepteurs aux oestrogènes (ER), les récepteurs aux progestatifs (PR) et l'expression Her2 par l'immunohistochimie (IHC). Dans cet arrangement, le sous-type Her2 a été définie comme tumeurs de Her2+/ER-, les tumeurs basal-like sont désignées comme des cancers « triple-négatifs », c.-à-d. cancers d'ER-/PR-/Her2- ; les tumeurs luminal-like étaient toutes des tumeurs ER+.

Ces sous-types moléculaires et leurs corrélations histo-cliniques ont été confirmés ensuite par la même équipe sur plus de tumeurs. Ils ont également été démontrés ou validés sur des cancers in situ, des cancers invasifs localisés et le cancer du sein inflammatoire [79]. Ces sous-types moléculaires présentent une sensibilité différente à la chimiothérapie avec une sensibilité plus importante pour les tumeurs basales et ERBB2+ que pour les tumeurs lumineales, avec par ailleurs des

signatures moléculaires de réponse histologique différentes entre tumeurs basales et tumeurs ERBB2+.

De plus, ces signatures peuvent être facilement reproduites par immunohistochimie suggérant la robustesse de cette classification [80-75].

En pratique	
Statut des récepteurs aux oestrogènes	Sous-types
Positif	Luminal A Luminal B
Négatif	Basal-like Erb-B2 positif Normal ou « breast-like »

D'après Carey et al. [80], la prévalence des sous types basal et luminal A était de 27 et 47% respectivement, versus 13,8 et 42,3% dans la présente étude. On remarque que la prévalence du sous type basal était 2 fois inférieure que la littérature.

Le statut HER2+/ER- était plus fréquent chez nos patientes (13,8 % versus 9%).

1. Type luminal

Les tumeurs ER+ sont rassemblées dans le sous type « luminal », caractérisé notamment par l'expression des gènes codant pour des protéines spécifiques des cellules épithéliales luminales (KRT18, MUC1), mais aussi par l'expression d'ESR1, et de gènes oestrogéno-régulés tels que HNF3, LIV1, GATA3, Ps2 ou XBP1 [81-82]. Ce sous-type a été ultérieurement subdivisé en deux voir trois sous-groupes appelés «luminal A», et «luminal B» qui inclue le sous groupe «luminal C» qui été décrit

initialement [83]. Alors que les tumeurs «luminal A» sont caractérisées par la sur-expression des gènes oestrogéno-régulés, les tumeurs «luminal B» expriment par exemple les gènes CCNE1 et PRDX4 et les «luminal C» le gène MYBL2.

Le sous-type "luminal-like" est divisé aussi selon un grade histologique basé sur le profil d'expression génique en rapport avec les données de Loi et al : le sous-type luminal A (ER positif & grade 1 et 2) et le sous type luminal B (ER positif & grade 3). Les tumeurs de grade histologique 1 et 2 sont groupées ensemble pour identifier clairement les tumeurs ER+ ayant un risque élevé (luminal B).

Actuellement, l'étude de Carolina a pu définir le sous type luminal B comme des tumeurs ER positives et Her-2 positive [80].

1-1 type luminal A:

1-1-1 Caractères morphologiques:

Les cancers du sein ER+ tendent à être morphologiquement bien différenciés et, en général les tumeurs exprimant des récepteurs aux estrogènes sont majoritairement des tumeurs bas grade SBR et peu proliférants. Dans notre étude, on a trouvé une association significative entre ce sous type et l'association avec un carcinome in situ. On a réalisé également que le grade I de SBR était retrouvé dans 22 % des tumeurs luminal A contre seulement 5,6% pour tumeur de phénotype basal.

1-1-2 Caractères immunohistochimiques:

Le sous-type luminal A montre une forte expression des récepteurs aux oestrogènes, et aux progestatifs, alors que l'hercept test est négatif.

Il montre également une positivité des cytokératines lumineales 8/18 et 19 [84] et le gène GATA3. Ce gène est impliqué dans le contrôle de la croissance et le maintien de la différenciation de ces tumeurs.

Dans la présente étude, le sous type luminal A était défini comme des tumeurs positives pour les récepteurs oestrogénique, négatives pour l'Her-2 et positive pour les cytokératines 8/18.

1-1-3 Corrélation histo-pronostique:

Le sous-groupe luminal A présente la meilleure évolution clinique, ils sont caractérisés par un meilleur pronostic (30 % de risque de récurrence et 25 % de décès à 15 ans) [85].

En ce qui concerne le risque de décès, alors qu'il est assez faible après 5 ans, de l'ordre de 10 %, il augmente considérablement jusqu'à atteindre 50 % à 15 ans.

Dans notre contexte, l'envahissement ganglionnaire était retrouvé dans 52,4 % des cas, contre 86,7 % des cas pour le phénotype Her-2.

Les métastases à distance n'étaient associées qu'à 8,2 % de ces tumeurs.

1-1-4 Implications thérapeutiques:

Les tumeurs luminal A sont des tumeurs hormonosensibles pures et bénéficient de monothérapie anti-hormonale [86].

Néanmoins, malgré que le type luminal A garde un bon pronostique, ils sont moins chimiosensibles dans une étude incluant 82 patientes avec une chimiothérapie néoadjuvante à base de paclitaxel/5-fluorouracil-doxorubicin-cyclophosphamide (FAC) [87].

1-2 type luminal B:

1-2-1 Caractères morphologiques:

Le sous-type luminal B regrouperait des cas luminaux moins différenciés que les luminaux A et plus prolifératifs.

Ceci a été confirmé par notre étude en réalisant que le grade III de SBR était retrouvé dans 25 % des tumeurs de phénotype luminal B, contre seulement 20 % pour les tumeurs de phénotype luminal A. la taille tumoral était également plus élevée (une moyenne de 4,3cm contre 2,9cm pour le phénotype luminal A).

1-2-2 Caractères immunohistochimiques:

Ce groupe possède le même profil immunohistochimique que le type précédant, cependant les récepteurs aux oestrogènes alpha sont moins exprimés dans la classe luminal A [89], en plus de l'expression de l'Her-2 [80].

1-2-3 Corrélation histo-pronostique:

Une forte prolifération dans ce phénotype entraîne un risque relatif de rechute de 19 (IC 95 %), par rapport aux tumeurs lumineales de faible prolifération [85].

Le pronostic de ce groupe ressemble à celui du groupe « Erb-B2 » : le risque de récidence est très important dès 5 ans avec une probabilité de 45 % de récidence puis évolue jusqu'à 65 % à 15 ans [88].

Dans cette série, l'envahissement ganglionnaire était retrouvé dans 68,8 % des tumeurs de phénotype luminal B, alors qu'il est estimé à 52,4 % pour les tumeurs de phénotype luminal A.

Les métastases à distance sont présentes dans 31,8 % des cas, versus 8,2 % pour les tumeurs luminal A.

1-2-4 Implications thérapeutiques:

Les tumeurs luminal B sont également des tumeurs hormonosensibles, mais devraient bénéficier en plus de l'introduction de la chimiothérapie [90]. Ils représentent aussi une indication au traitement par le trastuzumab (Herceptine™) [90].

2. Type normal

Il s'agit d'un sous-groupe intitulé « semblable au sein normal », qui exprime les gènes des adipocytes et des autres cellules mammaires d'origine non épithéliale. Ces tumeurs montrent également une forte expression des gènes des cellules basales et une faible expression des gènes des cellules luminales [76].

Ces cancers sont de meilleur pronostic, mais leur description morphologique reste encore floue.

3. Type HER-2

Le gène HER-2/neu, membre de la famille des récepteurs tyrosine kinase est impliqués dans la voie de transduction du signal qui règle la croissance cellulaire, la différenciation, l'apoptose, et les métastases. Il a été découvert indépendamment dans quatre laboratoires différents, par conséquent il possède des noms alternatifs comme neu, HER-2 ou c-erbB-2.

La surexpression de la protéine HER-2 est trouvée dans près de 25 à 30 % des carcinomes mammaires. Chez l'être humain, la surexpression de l'HER-2 n'a pas été observée dans le tissu mammaire normal, ni dans les lésions bénignes y compris les hyperplasies, mais elle est habituellement observée dans la carcinomes canalaire in situ, pratiquement le double de ce qui est observé dans les carcinomes invasifs [91].

Pour le type HER-2 des carcinomes mammaires, il est caractérisé par l'expression d'un groupe de gènes incluant ERBB2, GRB7, et FLOT2 [92]. Il est distingué par les caractéristiques suivantes :

3-1 Caractères morphologiques:

Pour les carcinomes canauxaires infiltrants, la surexpression de HER2 est associée à un phénotype particulier : haut grade, nombreuses mitoses, nécrose avec un infiltrat lymphoïde [92].

Ce travail a montré que ce sous groupe est significativement associé à une taille tumorale élevée.

Pour le grade SBR, il est proche de celui des tumeurs de phénotype luminal B (27,8 % des tumeurs sont de grade III de SBR versus 25 % pour les tumeurs de phénotype luminal B).

3-2 Caractères immunohistochimiques:

Le sous-type her-2 est défini comme des tumeurs positives en immunohistochimie pour l'her-2 et négatives pour les récepteurs oestrogéniques [93].

3-3 Corrélation histo-pronostique:

Plusieurs études ont établi la relation entre l'expression de l'HER-2 et le mauvais pronostic des cancers du sein, la survie à 5 ans est estimée à 62.1% [85]. En plus, l'expression de cet oncogène est associée avec une résistance à l'hormonothérapie et notamment le tamoxifène.

Notre étude a montré que ces tumeurs sont également associées au taux le plus élevé d'envahissement ganglionnaire (86,7 % des cas).

Le taux des métastases à distance était en deuxième position (43,8%) après celui des tumeurs de phénotype basal (87,5 %).

3-4 Implications thérapeutiques:

L'HER-2 représente une thérapie ciblée idéale pour le cancer du sein du fait de son rôle fonctionnel dans la croissance tumorale, de son accessibilité comme un récepteur situé en surface de la cellule et de son niveau d'expression élevé dans le cancer du sein, contrairement à ce qu'il est dans le tissu mammaire normal.

Ce sous-type peut être traité par un anticorps qui inhibe la voie ERBB2 comme le trastuzumab (HerceptineTM) ou un inhibiteur de tyrosine kinase comme le lapatinib [94].

4. Type basal

Ces dernières années ont permis de mieux caractériser les cancers de type basal (basal like breast cancer, BLBC) et triples négatifs (TN) et d'en illustrer l'hétérogénéité morphologique et pronostique.

4-1 Caractères morphologiques:

Ces cancers sont généralement de haut grade avec un haut index mitotique. Ils sont souvent associés à une nécrose centrale et un infiltrat lymphocytaire [95].

Notre étude montre que le sous type basal est associé à un haut grade SBR et aux types histologiques de mauvais pronostic comme le carcinome métaplasique, le carcinome papillaire infiltrant et le carcinome peu différencié. Ces associations ont été confirmées par d'autres études [80-6].

4-2 Caractères immunohistochimiques:

Les carcinomes de type basal-like sont définis comme des tumeurs triple négatives, c'est-à-dire RO-RP-HER2 (0 % des cellules positives) et exprimant de plus soit des cytokératines de haut poids moléculaire (cytokératines 5/6/14/17), soit l'EGFR, soit KIT [96-97-98].

Si tous les cancers de type basal-like sont triples négatifs, une certaine proportion de carcinomes triple négatifs n'exprime pas de marqueurs basal-like. Cette caractérisation a permis de remettre en perspective cette catégorie des cancers du sein « triple négatifs » qui représente 10 à 25 % des cancers du sein. Ces tumeurs sont généralement mutées pour le gène TP53 [99].

4-3 Corrélation histo-pronostique:

C'est un sous type important où le pronostic est le plus défavorable [85].

Sur le plan clinique, les cancers TN affectent le plus souvent les femmes jeunes (moins de 40 ans). Ils présentent un pic de rechute avant la deuxième année et entraînent majoritairement le décès avant 5 ans. À 10 ans cependant, le pronostic global des cancers TN rejoint celui des autres formes du cancer du sein.

Le profil métastatique des TN est différent des autres catégories tumorales avec, en particulier, des métastases cérébrales et pulmonaires plus fréquentes [99]. Dans cette étude, on a confirmé la forte association entre ce phénotype et la présence de métastases à distance avec un ORa= 64,5 ($p < 0,00001$).

4-4 Implications thérapeutiques:

La réponse à la chimiothérapie néoadjuvante des cancers du sein TN est plus importante, en particulier car les TN ont une prolifération plus élevée [83]. En revanche, ils ne répondent pas aux deux principales thérapeutiques ciblées actuellement disponibles (les traitements hormonaux et le traitement par trastuzumab). Ils constituent des indications privilégiées pour des essais thérapeutiques étudiant de nouvelles approches (agents anti-EGFR, agents anti-angiogéniques, taxanes, etc.) [100].

V. Limites de cette classification :

Il reste cependant des tumeurs ne correspondant à aucune de ces catégories, en particulier les tumeurs triples négatives non basales, pour lesquelles les ressources thérapeutiques sont limitées. Ces tumeurs représentaient 14,6 % dans notre série.

Par ailleurs, parmi les tumeurs de phénotype basal, il en existe de bon pronostic reconnu comme les carcinomes médullaires. La classification en luminal A et B ne tient pas compte des récepteurs progestéroniques dont l'importance clinique et probablement thérapeutique est incontestable.

CONCLUSION
ET
PERSPECTIVES

Dans un futur proche, la classification moléculaire du cancer du sein va permettre d'entrevoir une nouvelle ère dans la prise en charge des cancers du sein, avec une approche plus individualisée, patiente par patiente. Des études multicentriques sont en cours pour valider le profil génomique comme facteur prédictif d'évolution et de réponse thérapeutique avec l'avènement du test diagnostique MammaPrint qui a été approuvé pour une utilisation clinique en 2007 (Agendia™) [101].

Les cancers du sein peuvent ainsi être classés en différentes classes, luminal, basal, et HER2, avec des différences dans les aspects cliniques, morphologiques. Ceci nous aidera à choisir des traitements "à la carte", potentiellement plus efficaces et moins toxiques.

Les résultats obtenus par notre étude sont encourageants. Les tumeurs de phénotype basal et Her-2 étaient associées à des caractéristiques cliniques et histopathologiques plus agressives que les tumeurs de phénotype luminal.

Nos patientes sont en cours de surveillance, ceci nous permettra de faire des études de survie à 5 ans. On a également entamé une étude de validation sur un plus grand échantillon, nous projetons également à travers des travaux de coopération internationale d'étudier le profil génomique de ces patientes à travers les puces à ADN ce qui va nous permettre de mieux caractériser les différents sous types.

Le succès de ces études dépendra de collaborations étroites entre chercheurs de différentes disciplines (gynécologues, anatomo-pathologistes, oncologues et épidémiologistes...) et de la qualité du suivi des patientes sans lequel toutes ces études seraient peu contributives à la compréhension de cette pathologie et à la prise en charge des malades dans notre contexte.

RESUME

RESUME

Le cancer du sein est le cancer le plus fréquent et représente la deuxième cause de décès dans le monde. Une classification moléculaire de ce cancer a été établie récemment par Sorlie et Perou pour mieux caractériser cette néoplasie. Ils ont défini 5 sous types de pronostic et de réponse thérapeutique différents: luminal A, luminal B, normal, Her-2, et basal.

Le but de notre travail prospectif 2008 – 2009 (130 cas), est d'évaluer le profil d'expression de différents marqueurs immunohistochimiques des cellules tumorales et de les corrélés avec les données cliniques et ultérieurement évolutives.

Les protéines étudiées sont : les récepteurs aux oestrogènes et aux progestatifs, l'herceptine, les cytokératines de haut poids moléculaires (CK5/6), et la cytokératine 8/18.

Parmi les 130 tumeurs analysées, 55 (42,3 %) étaient classées de type luminal A, 20 (15,4%) de type luminal B, 18 (13,8%) de type Her-2, et 18 (13,8%) de type basal. Le sous type luminal A était corrélé à un bas grade histologique avec une forte association avec une composante in situ et une prédominance des carcinomes lobulaires infiltrants. Le sous type luminal B est caractérisé par un grade histologique plus élevé avec une taille tumorale significativement plus élevée que le type précédent. Le sous type Her-2 avait la taille tumorale la plus élevée avec un taux élevé d'envahissement ganglionnaire. Enfin, parmi les tumeurs basales, on a noté une haute prévalence des types histologiques de mauvais pronostic (carcinome métaplasique, papillaire et indifférencié), avec un haut grade SBR et une forte association avec la présence de métastases à distance.

Une étude de régression logistique multivariée a confirmé la corrélation entre les sous types luminal B, Her-2 et basal et la présence de métastases à distance, avec un ORa= 64,5 pour le phénotype basal ($p < 0,00001$).

En conclusion, cette étude a confirmé le caractère agressif des tumeurs basales et Her-2 en comparaison avec les tumeurs lumineales, qui se distinguent par des caractères morphologiques et cliniques de mauvais pronostic.

ABSTRACT

The breast cancer is the most frequent and represent the second cause of death in the world. A molecular classification of this cancer was recently established by Sorlie and Perou to characterize better this neoplasia. They defined 5 subtypes under different forecast and therapeutic answer: luminal A, luminal B, normal, Her-2, and basal.

The purpose of our prospective study 2008 - 2009 (130 cases), is to estimate the profile of expression of various Immunohistochemical markers of the tumoral cells and to correlate them to the clinical and later evolutionary data.

Proteins studied are: estrogen receptor, progesterone receptor, Her-2, cytokeratins of high molecular weights (CK5/6), and the cytokeratin 8/18.

Of 130 analyzed tumors, 55 (42,3 %) were classified as luminal A, 20 (15,4 %) as luminal B, 18 (13,8 %) as Her-2 type, and 18 (13,8 %) as type basal. The subtype luminal A was correlated on one hand with a low histological grade, on the other hand with a strong association with carcinoma in situ and an ascendancy of Lobular invasive carcinoma. The subtype luminal B is characterized by a higher histological grade with significantly higher tumoral size than the previous type. The subtype Her-2 had highest the tumoral size most with a hight rate of ganglionic invasion. Finally, among basal tumors, we noted high prevalence of the histological types of bad prognosis (metaplastic carcinoma, papillary carcinoma and undifferentiated carcinoma), with high SBR and a strong association with the presence of visceral metastasis.

A study of logistic regression confirmed the correlation between the luminal B, Her-2 and basal subtypes and the presence of visceral metastasis, with an ORa = 64,5 for the basal phenotype ($p < 0,00001$).

In conclusion, this study confirmed the aggressive character of basal and Her-2 tumors in comparison with luminal tumors, which distinguish themselves by morphological and clinical characters of bad prognosis.

ملخص

إن سرطان الثدي هو السرطان الأكثر شيوعا و ويمثل السبب الثاني للوفاة في العالم. سورلى و بيرو أنشئوا مؤخرا تصنيف جزيئي لهذا السرطان لوصف هذا الورم بشكل أفضل. وقد حددوا 5 أنواع مختلفة من

حيث الرد العلاجي و المصير : luminal ألف ، luminal باء ، normal ، her- 2 و basal.

والغرض من عملنا التطلعي 2008-2009 (130 حالة), هو دراسة مختلف أنواع التصنيف

الجزيئي و ربطها بالمعطيات السريرية و الشكلية، و مستقبلا التطورية.

من 130 حالة، 55 (42,3%) صنفت من النوع luminal ألف ، 20 (42,3%) من النوع

luminal باء، 18 (13,8%) من النوع her- 2 و 18 (13,8%) من النوع basal.

النوع luminal ألف كان مرتبطا بدرجة نسيجية منخفضة مع اقترانه بوجود السرطان الموقعي. النوع

luminal باء يتسم بدرجة نسيجية وحجم ورمي أكثر ارتفاعا من النوع السابق. النوع her-2 كان ذا الحجم

الورمي الأكبر مع وجود نسبة عالية من الاجتياح الغدي. أخيرا ، من بين الأورام من النوع basal، كان

هناك ارتفاع معدل انتشار أنواع نسيجية ذات مستقبل سيئ (سرطان metaplastic ، الحلمية و الغير

متميزة) ، مع ارتفاع الدرجة SBR و وجود ارتباط قوي مع وجود نقائل بعيدة.

في الختام ، أكدت هذه الدراسة على الطبيعة العدوانية للأورام من النوع basal و her-2 مقارنة مع

الأورام من النوع luminal ، والتي تتميز بخصائص شكلية و سريرية ذات مستقبل سيء.

REFERENCES

- [1] Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) Program (www.seer.cancer.gov). SEER*Stat Database: Incidence-SEER 9 Regs Public Use, Nov 2004 Sub (1973-2002), National Cancer Institute, DCCPS, Surveillance Research Program, Cancer Statistics Branch. April 2005, based on the November 2004 submission.
- [2] Boyle P. Breast cancer control: signs of progress, but more work required. *Breast* 2005;14:429-38.
- [3] Wiencke JK. Opinion: Impact of race/ethnicity on molecular pathways in human cancer. *Nat Rev Cancer* 2004;4:79.
- [4] Bertucci F. Profils d'expression génique et Puces à ADN dans le cancer du sein : choix du patient, choix du protocole. Springer Paris 2006. p 267-276
- [5] P. Fumoleau, M. Campone, N. Isambert, E. Bourbouloux, F.Mayer et B. Coudert. Les nouvelles cibles thérapeutiques. Les nouvelles thérapeutiques ciblées. Springer Paris 2006.
- [6] Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, Hastie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Thorsen T, Quist H, Matese JC, Brown PO, Botstein D, Eystein Lonning P and Borresen-Dale AL. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:10869-10874.

[7] Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen LA, Fluge O, Pergamenschikov A, Williams C, Zhu SX, Lonning PE, Borresen-Dale AL, Brown PO and Botstein D. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2000;406:747-752.

[8] BELLOCQ J-P, CHENARD M-P. *Traité d'histologie*. 2006

[9] Pawlina MHRW. Female reproductive system. *Histology. A text and atlas*, 5th edn. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, 2006:804-6.

[10] Cardiff, R. D. and S. R. Wellings. (1999). "The comparative pathology of human and mouse mammary glands." *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 4: 105-22.

[11] Rosemary A. Use and assessment of diagnostic and predictive markers in breast pathology. *Current Diagnostic Pathology* (2007) 13, 126-134

[12] Clarke, R.B., Howell, A., Potten, C.S., Anderson, E., 1997. Dissociation between steroid receptor expression and cell proliferation in the human breast. *Cancer Res.* 57, 4987- 4991.

[13] Petersen, O.W., Hoyer, P.E., van Deurs, B., 1987. Frequency and distribution of estrogen receptor-positive cells in normal, nonlactating human breast tissue. *Cancer Res.* 47, 5748- 5751.

[14] Moll R, Franke WW, Schiller DL, et al. The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell* 1982;31:11-24.

- [15] Hamperl H. The myoepithelia (myoepithelial cells). Normal state; regressive changes; hyperplasia; tumors. *Curr Top Pathol* 1970;53:161–220.
- [16] Barbareschi M, Pecciarini L, Cangi MG et al. P63, a p53 homologue, is a selective nuclear marker of myoepithelial cells of the human breast. *Am J Surg Pathol* 2001;25(8):1054–60.
- [17] Dairkee SH, Blayney C, Smith HS, et al. Monoclonal antibody that defines human myoepithelium. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985;82:7409–13.
- [18] Tavassoli F.A, Devilee P. WHO. Pathology and genetics. Tumors of the breast and female genital organs. 2003
- [19] EPU sein. 2007
- [20] Singletary SE, Allred C, Ashley P, Bassett LW, Berry D, Bland KI et al. Revision of the American Joint Committee on Cancer staging system for breast cancer. *J Clin Oncol* 2003 ; 20 : 3628–36.
- [21] Bertucci F, Nasser V, Houlgatte R, Birnbaum D. Profils d'expression génique et puces à ADN dans le cancer du sein : intérêt pronostique. *Bulletin du Cancer*. Volume 89. N° 6. 571–4. 2002
- [22] Bertucci F, Houlgatte R, Nguyen C et al. Gene expression profiling of cancer by use of DNA arrays : how far from the clinic? 2001 *Lancet Oncol* 2: 674–82

[23] Bièche I, Tozlu S, Girault I, Lidereau R. Identification of a three-gene expression signature of poor-prognosis breast carcinoma. *Molecular Cancer* 2004, 3:37

[24] BELLOCQ JP. Les pratiques ACP en cancérologie mammaire : quels moyens pour quels besoins ? *Ann Pathol* 2007 ; 27 : 1S64-1S68

[25] JENSEN V, LAKEDARL M. Immunohistochemical quantitation of oestrogen receptors and proliferative activity in oestrogen receptor positive breast cancer. *J Clin Pathol* 1995 ; 48 : 429-32.

[26] LAYFIELD LJ, SARIA E, MOONEY EE, LIU K, DODGE RR. Tissue heterogeneity of immunohistochemically detected estrogen receptor. Implications for image analysis quantification. *Am J Clin Pathol* 1998 ; 110 : 758-64.

[27] VON WASIELEWSKI R, MENGEL M, NOLTE M, WERNER M. Influence of fixation, antibody clones, and signal amplification on steroid receptor analysis. *Breast J* 1998; 4 : 33-40.

[28] GRABAU DA, NIELSEN O, HANSEN S, NIELSEN MN, LAENKHOLM AV, KNOOP A, PFEIFFER P. Influence of storage temperature and high-temperature antigen retrieval buffers on results of immunohistochemical staining in sections stored for long periods. *Appl Immunohistochem* 1998; 6 : 209-13.

[29] F. PENAULT-LLORCA, J. JACQUEMIER. Le défi de la qualité en immunohistochimie : exemple du statut ERBB-2 dans le cancer du sein. *Ann. Pathol.*, 1999, 19, n° 4, p. 280-282

- [30] WILLIAMS JH, MEPHAM BL, WRIGHT DH. Tissue preparation for immunocytochemistry. *J Clin Pathol* 1997 ; 50 : 422-8.
- [31] MOTE PA, LEARY JA, CLARKE CL. Immunohistochemical detection of progesterone receptors in archival breast cancer. *Biotech Histochem* 1998; 73 : 117-27.
- [32] AL SAATI T, CLAMENS S, COHEN-KNAFO E, FAYE JC, PRATS H, COINDRE JM, WAFFLART J, CAVERIVIERE P, BAYARD F, DELSOL G. Production of monoclonal antibodies to human oestrogen receptor protein (ER) using recombinant ER (RER). *Int J Cancer* 1993 ; 55 : 651-4.
- [33] BEVITT DJ, MILTON ID, PIGGOT N, HENRY L, CARTER MJ, TOMS GL, LENNARD TWJ, WESTLEY B, ANGUS B, HORNE CHW. New monoclonal antibodies to oestrogen and progesterone receptors effective for paraffin sections immunohistochemistry. *J Pathol* 1997 ; 183 : 228-32.
- [34] GOWN AM, DEWEVER N, BATTIFORA H. Microwave-based antigen unmasking : a revolutionary new technique for routine immunohistochemistry. *Appl Immunohistochem* 1993 ; 1 : 256-66.
- [35] SHI S-R, COTE R, YOUNG LL, TAYLOR CR. Antigen retrieval immunohistochemistry practice and development. *J Histotechnol* 1997; 20 : 145-54.
- [36] BIER B, BANKFALVI A, GROTE L, BLASIUS S, OFNER D, BOCKER W, JASANI B, SCHMID KW. Wet autoclave pretreatment for immunohistochemical demonstration of oestrogen receptors in routinely processed breast carcinoma tissue. *Histochem J* 1995 ; 27 : 148-154.

[37] BALATON AJ, MATHIEU MC, LE DOUSSAL V. Optimization of heat-induced epitope retrieval for estrogen receptor determination by immunohistochemistry on paraffin-sections : results of a multicentric study. *Appl Immunohistochem* 1996 ; 4 : 259-63.

[38] KOOPAL SA, IGLESIAS COMA M, TIEBOSCH ATMG, SURMEIJER AJH. Low-temperature heating overnight in Tris-HC1 buffer pH 9 is a good alternative for antigen retrieval in formalin-fixed paraffin-embedded tissue. *Appl Immunohistochem* 1998 ; 6 : 228-33.

[39] HENDRICKS JB, WILKINSON EJ. Comparison of two antibodies for evaluation of estrogen receptors in paraffin-embedded tumors. *Mod Pathol* 1993 ; 6 : 765-70.

[40] CRAIG ALLRED D, HARVEY JM, BERARDO M, CLARK GM. Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis. *Mod Pathol* 1998 ; 11 : 155-68.

[41] COHEN C, LAWSON D. Progesterone-receptor expression : comparison of two antibodies with three detection kits. *Appl Immunohistochem* 1998 ; 6 : 158-63.

[42] LOPEZ-PRESAS E, BAUNOCH DA. A comparison of ER Clones 1D5, CC4-5 and 6F11 Using manual and automated methods in paraffin-embedded tissue. *Mod Pathol* 1998 ; 11 : 186A.

[43] BERTHEAU P, CAZALS-HATEM D, MEIGNIN V, DE ROQUANCOURT A, VEROLA O, LESOURD A, SENE C, BROCHERIOU C, JANIN A. Variability of immunohistochemical reactivity on stored paraffin slides. *J Clin Pathol* 1998 ; 51 : 370-4.

[44] MAC GROGAN G, SOUBEYRAN I, DE MASCAREL I, WAFFLART J, BONICHON F, DURAND M, AVRIL A, MAURIAC L, TROJANI M, COINDRE JM. The immunohistochemical detection of progesterone receptors in breast invasive ductal carcinomas. A correlative study on 942 cases. *Appl Immunohistochem* 1996 ; 4 : 219-27.

[45] PERTSCHUK LP, FELDMAN JG, KIM Y-D, BRAITWAITE L, SCHNEIDER F, BRAVERMAN AS, AXIOTIS C. Estrogen receptor immunocytochemistry in paraffin embedded tissues with ER1D5 predicts breast cancer endocrine response more accurately than H222Spg in frozen sections or cytosol-based ligandbinding assays. *Cancer* 1996 ; 77 : 2514-9.

[46] Fitzgibbons PL, Page DL, Weaver D, Thor AD, Allred DC, Clark GM et al. Prognostic factors in breast cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Arch Pathol Lab Med* 2000 ; 124 : 966-78.

[47] Penault-Llorca F, Balaton A, Sabourin J.C, Le Doussal V, et le Groupe d'évaluation des facteurs pronostiques par immunohistochimie dans les cancers du sein (GEFPICS). Évaluation immunohistochimique du statut HER2 dans les carcinomes mammaires infiltrants : mise au point du protocole technique et de la lecture des résultats-recommandations. Masson, Paris, 2002. 150 – 157

[48] Bièche I. Biologie moléculaire des cancers. *Immuno-analyse & Biologie spécialisée* 19 (2004) 13-22

- [49] Tirkkonen M, Tanner M, Karhu R, Kallioniemi A, Isola J, Kallioniemi OP. Molecular cytogenetics of primary breast cancer by CGH. *Genes Chromosomes Cancer* 1998;2:177-84.
- [50] Lacave R, Larsen C-J, Robert J. *Cancerologie Fondamentale*. John Libbey Eurotext, 2005 p197
- [51] Kim C, Bryant J, Horne Z et al. Trastuzumab sensitivity of breast cancer with co-amplification of HER2 and cMYC suggests pro apoptotic function of dysregulated cMYC in vivo. C-myc amplification and response to trastuzumab in NSABP 31 trial. *Breast Cancer Res Treat* 2005; 94(Suppl. 1):abstr. 46.
- [52] Hung MC, Lau YK (1999) Basic science of HER2/ neu: a review. *Seminars Oncology*, 26: 51-9
- [53] Reis-Filho JS, Savage K, Lambros MB, et al. Cyclin D1 protein overexpression and CCND1 amplification in breast carcinomas: an immunohistochemical and chromogenic in situ hybridisation analysis. *Mod Pathol* 2006;19:999-1009.
- [54] Wooster R, Neuhausen SL, Mangion J, Quirk Y, Ford D, Collins N et al. Localization of a breast cancer susceptibility gene, BRCA2, to chromosome 13q12-13. *Science*. 1994; 5181: 2088-90.
- [55] Agnès Chompret¹, Catherine Noguès², Dominique Stoppa-Lyonnet³. Consultation d'oncogénétique pour le cancer du sein. *Presse Med*. 2007; 36: 357-63
- [56] Monteiro AN. BRCA1: the enigma of tissue specific tumor development. *Trends Genet*. 2003; 6: 312-5.

- [57] Lakhani SR, Jacquemier J, Sloane JP, et al. Multifactorial analysis of differences between sporadic breast cancers and cancers involving BRCA1 and BRCA2 mutations. *J Natl Cancer Inst* 1998;90:1138-45
- [58] Prives C, Hall PA. The p53 pathway. *J Pathol* 1999 ; 187 : 112-26.
- [59] Hurlimann J, Chaubert P, Benhattar J. p53 gene alterations and P53 protein accumulation in infiltrating ductal breast carcinomas : correlation between immunohistochemical and molecular biology techniques. *Mod Path* 1994 ; 7 : 423-8
- [60] Soussi T, Dehouche K, Béroud C. L'analyse des mutations du gène p53 dans les cancers humains : le lien entre l'épidémiologie et la carcinogénèse. *Médecine/sciences* 2000 ; 16 : 1387-96
- [61] Tommiska J, Jansen L, Kilpivaara O, Edvardsen H, Kristensen V, Tamminen A, Aittomäki K, Blomqvist C, Børresen-Dale AL, Nevanlinna H. ATM variants and cancer risk in breast cancer patients from Southern Finland. *BMC Cancer* 2006;6:209.
- [62] Wildsmith SE, Elcock FJ. Microarrays under the microscope. *Mol Pathol* 2001;54:8-16.
- [63] Bertucci F, et al. DNA arrays: technological aspects and applications. *Bull Cancer* 2001 ; 88 : 243-52.
- [64] SÉVENET N, COTTU P-N. Génomique et cancer du sein : apport des puces à ADN. *Bull Cancer* 2004 ; 91 (special) : S226-31

- [65] Shalon D, Smith SJ, Brown PO. A DNA microarray system for analyzing complex DNA samples using two- color fluorescent probe hybridization. *Genome Res* 1996 ; 6 : 639-45.
- [66] Tirkkonen M, Tanner M, Karhu R, Kallioniemi A, Isola J, Kallioniemi OP. Molecular cytogenetics of primary breast cancer by CGH. *Genes Chromosomes Cancer* 1998;2:177-84.
- [67] DeRisi J, et al. Use of a cDNA microarray to analyse gene expression patterns in human cancer. *Nat Genet* 1996 ; 14 : 457-60.
- [68] Sherlock G, et al. The Stanford Microarray Database. *Nucleic Acids Res* 2001 ; 29 : 152-5.
- [69] Golub TR, et al. Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science* 1999 ; 286 : 531-7.
- [70] SÉVENET N, COTTU P-N. Génomique et cancer du sein : apport des puces à ADN. *Bull Cancer* 2004 ; 91 (special) : S226-31
- [71] Wright G, et al. A gene expression-based method to diagnose clinically distinct subgroups of diffuse large B cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003 ; 100 : 9991-6.
- [72] Monni O, et al. Comprehensive copy number and gene expression profiling of the 17q23 amplicon in human breast cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001 ; 98 : 5711-6.

- [73] Bertucci F, et al. Gene expression profiling of primary breast carcinomas using arrays of candidate genes. *Hum Mol Genet* 2000 ; 9 : 2981-91.
- [74] Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen LA, Fluge O, Pergamenschikov A, Williams C, Zhu SX, Lonning PE, Borresen-Dale AL, Brown PO and Botstein D. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2000;406:747-752.
- [75] Y. Belkacémi, F. Penault-Llorca, J. Gligorov, D. Azria. Intérêt des classifications moléculaires pour prédire la rechute locale et la diffusion métastatique des cancers du sein. Elsevier Masson SAS 2008. 1278-3218.
- [76] Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, Hastie T, Marron JS, Nobel A, Deng S, Johnsen H, Pesich R, Geisler S, Demeter J, Perou CM, Lonning PE, Brown PO, Borresen-Dale AL and Botstein D. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100: 8418-8423.
- [77] Ponti D, Zaffaroni N, Capelli C, Daidone MG. Breast cancer stem cells: an overview. *Eur J Cancer* 2006;42(9):1219-24.
- [78] Paguirigan A, Beebe DJ, Liu B, Alexander C. Mammary stem and progenitor cells: tumour precursors? *Eur J Cancer* 2006;42(9):1225-36.
- [79] Ma XJ, Salunga R, Tuggle JT, Gaudet J, Enright E, McQuary P, et al. Gene expression profiles of human breast cancer progression. *Proc Natl Acad Sci* 2003;100:5974-9.

- [80] Carey LA, Perou CM, Livasy CA, Dressler LG, Cowan D, Conway K, Karaca G, Troester MA, Tse CK, Edmiston S, Deming SL, Geradts J, Cheang MC, Nielsen TO, Moorman PG, Earp HS and Millikan RC. Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study. *JAMA* 2006;295:2492-2502.
- [81] Sorlie T, Wang Y, Xiao C et al. Distinct molecular mechanisms underlying clinically relevant subtypes of breast cancer: gene expression analyses across three different platforms. *BMC Genomics* 2006;7:127.
- [82] Usary J, Llaca V, Karaca G et al. Mutation of GATA3 in human breast tumors. *Oncogene* 2004;23(46):7669-78.
- [83] Rohit Bhargava, Joan Striebe, Sushil Beriwal, John C. Flickinger, Agnieszka Onisko, Gretchen Ahrendt and David J. Dabbs. Prevalence, Morphologic Features and Proliferation Indices of Breast Carcinoma Molecular Classes Using Immunohistochemical Surrogate Markers. *Int J Clin Exp Pathol* (2009) 2, 444-455
- [84] Abd El-Rehim DM, Pinder SE, Paish CE et al. Expression of luminal and basal cytokeratins in human breast carcinoma. *J Pathol* 2004;203(2):661-71.
- [85] Jacquemier J, Ginestier C, Rougemont J et al. Protein expression profiling identifies subclasses of breast cancer and predicts prognosis. *Cancer Res* 2005;65(3):767-79.
- [86] Goldhirsch A, Wood WC, Gelber RD, et al. Meeting highlights: updated international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer. *J Clin Oncol* 2003;21:3357-65.

[87] Ayers M, Symmans WF, Stec J, Damokosh AI, Clark E, Hess K, et al. Gene Expression Profiles Predict Complete Pathologic Response to Neoadjuvant Paclitaxel and Fluorouracil, Doxorubicin, and Cyclophosphamide Chemotherapy in Breast Cancer. *J Clin Oncol* 2004;22:2284-93.

[88] Durbecq V. Ameye L. Veysc I. Paesmans M. Desmedt C. Sirtaine N. Sotiriou C. Bernard-Marty C. Nogaret J.M. Piccart M. Larsimont D. A significant proportion of elderly patients develop hormone-dependant "luminal-B" tumours associated with aggressive characteristics. *ONCH-1150*; 2007; p13

[89] Kaklamani VG, Gradishar WJ. Gene expression in breast cancer. *Curr Treat Options Oncol* 2006;7(2):123-8.

[90] Penault-Llorca F. Personnalisation des traitements : y a-t-il de nouveaux facteurs prédictifs ? 28es journées de la SFSPM, Lille, novembre 2006

[91] YardenY, Sliwkowski MX. Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001;2:127-37.

[92] Hui Liu MD. PhDa. Qinhe Fan MD. PhDb. Zhihong Zhang MD. PhDb. Xiao Lib. Huiping Yu MSc. Fanqing Meng MDd. Basal-HER2 phenotype shows poorer survival than basal-like phenotype in hormone receptor-negative invasive breast cancers. *Human Pathology* (2008) 39, 167-174

[93] Brenton JD, Carey LA, Ahmed AA, Caldas C. Molecular classification and molecular forecasting of breast cancer: ready for clinical application? *J Clin Oncol* 2005;23(29):7350-60.

- [94] Marty M, Cignetti F, Maraninchi D, et al. Efficacy and safety of trastuzumab combined with docetaxel in patients with human epidermal growth factor receptor 2-positive metastatic breast cancer administered as first-line treatment: results of a randomized phase II trial by the M77001 study group. *J Clin Oncol* 2005.
- [95] Silva L Da, Clarke C, Lakhani S R. Demystifying basal-like breast carcinomas. *J. Clin. Pathol.* 2007;60;1328-1332
- [96] Livasy CA, Karaca G, Nanda R et al. Phenotypic evaluation of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Mod Pathol* 2006;19(2):264-71.
- [97] Gusterson BA, Ross DT, Heath VJ et al. Basal cytokeratins and their relationship to the cellular origin and functional classification of breast cancer. *Breast Cancer Res* 2005;7(4):143-8.
- [98] Matos I, Dufloth R, Alvarenga M et al. P63, cytokeratin 5, and P-cadherin: three molecular markers to distinguish basal phenotype in breast carcinomas. *Virchows Arch* 2005;447(4):688-94.
- [99] Haffty BG, Yang Q, Reiss M, Kearney T, Higgins SA, Weidhaas J, et al. Locoregional relapse and distant metastasis in conservatively managed triple negative early-stage breast cancer. *J Clin Oncol* 2006;24:5652-7.
- [100] Rouzier R, Perou CM, Symmans WF et al. Breast cancer molecular subtypes respond differently to preoperative chemotherapy. *Clin Cancer Res* 2005;11(16):5678-85.

[101] Jadwiga R. Gul S. Franak B. Normand A. Ronenn R. Peter K. John P. Convergent random forest predictor: Methodology for predicting drug response from genome-scale data applied to anti-TNF response. *Genomics* 94 (2009) 423–432