

UNIVERSITE SIDI MOHAMMED BEN ABDELLAH  
FACULTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE

FES



Année 2009

Thèse N° 136/09

# ÉVALUATION DE L'IMMUNO-MARQUAGE PAR LES RECEPTEURS HORMONAUX ET L'HERCEPTEST DANS LE CANCER DU SEIN

THESE

PRESENTEE ET SOUTENUE PUBLIQUEMENT LE 14/12/2009

PAR

Mme. HAMMAS NAWAL

Née le 16 Février 1982 à TAOURIRT

POUR L'OBTENTION DU DOCTORAT EN MEDECINE

MOTS-CLES :

Cancer du sein - Récepteur à l'oestrogène - Récepteur à la progestérone  
HER-2 - Immunohistochimie - Facteur pronostic

JURY

Mme. AMARTI RIFFI AFAF.....	PRESIDENT ET RAPPORTEUR
Professeur d'Anatomie pathologique	
M. BANANI ABDELAZIZ.....	} JUGES
Professeur de Gynécologie Obstétrique	
M. MELHOUF MY ABDELILAH.....	
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 .....	5
PARTIE THEORIQUE .....	8
I- RECEPTEURS HORMONAUX ET CANCER DU SEIN: .....	9
1-récepteur à l'œstrogène (RE).....	9
1-1-Isoformes et structure du RE :.....	9
1-2- voies fonctionnelles .....	11
1-3-physiopathologie: .....	12
2- récepteur à la progestérone.....	12
2-1-Structure et isoformes :.....	13
2-2-Mode d'action et fonctions.....	14
2-3-Physiopathologie .....	14
II-HER2 ET CANCER DU SEIN .....	15
1- Étude structurale du récepteur d'ERBB2.....	15
2- Mécanismes d'activation du proto-oncogène neu, de la protéine HER2 et signalisation intracellulaire .....	16
3-Récepteur Her2 et cancer du sein.....	17
III-METHODES D'ÉVALUATION .....	18
1-évaluation des récepteurs hormonaux : .....	18
1-1- la méthode biochimique.....	18
1-2- l'immunohistochimie .....	19
1-3-corrélation entre l'immunohistochimie et la méthode biochimique .....	23
1-4- la cytométrie en flux .....	23
2-détermination du statut Her2 :.....	24
2-1 immunohistochimie : .....	24
2-2- FISH .....	26
2-3- CISH .....	27
2-4- corrélation entre la méthode immunohistochimique d'une part, la FISH et la CISH d'autre part.....	28
2-5-Dosage sérique de l'HER2 .....	28
IV- classifications d'usage dans le cancer du sein.....	29
1-classification de l'OMS 2004 .....	29
2-classification p TNM .....	30
3-classifications de Chevalier et Sataloff.....	32

4-grade de SBR .....	33
ETUDE PRATIQUE .....	35
I- MATERIEL ET METHODES .....	36
1-matériel .....	36
1-1-population étudiée.....	36
1-2-étude histologique et immunohistochimique .....	36
2-méthodes statistiques: .....	42
2-1- recueil des données .....	42
2-2- analyse statistique .....	42
II-RESULTATS.....	43
1-Etude descriptive.....	43
2-étude analytique:.....	68
2-1- corrélation entre l'intensité et le pourcentage du marquage des récepteurs hormonaux .....	68
2-2-étude des corrélations entre les RE et les PR.....	68
2-3-étude des corrélations des récepteurs hormonaux avec les autres facteurs pronostiques .....	70
2-4- Etude des corrélations de l'Her2 avec les autres facteurs pronostiques ...	80
2-5-Corrélation entre les RE et l'HER2.....	86
DISCUSSION .....	87
I- évaluation des récepteurs hormonaux en pratique anatomo-pathologique:.....	88
1-avantages et inconvénients de l'immunohistochimie .....	88
2-règles d'interprétation.....	89
3-assurance de qualité.....	92
II- intérêt des récepteurs hormonaux en clinique .....	93
1-intérêt thérapeutique des récepteurs hormonaux :.....	93
2- intérêt pronostique des récepteurs hormonaux.....	94
III-détermination du statut Her2 en pratique anatomo-pathologique: .....	101
1-avantages et inconvénients de l'immunohistochimie .....	101
2-règles d'interprétation.....	102
3-assurance de qualité .....	106
4- intérêt du statut Her2 en clinique .....	107
4-1-Valeur thérapeutique de l'Her2.....	107

4-2-Valeur pronostique .....	108
4-3- Expression de l'Her2 et les corrélations avec les autres facteurs pronostiques .....	109
4-4-corrélation entre les RE et le statut Her2.....	112
CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....	113
RESUME .....	115
BIBLIOGRAPHIE .....	120

## Liste des abbreviations

ADN :	Acide désoxyribonucléique
AF :	Activation function domain,
AFAQAP :	Assurance Française d'Assurance de Qualité en Anatomie et Cytologie Pathologique
ARNm :	Acide Ribo-Nucléique messenger
C. :	Carcinome
CCI :	Carcinome canalaire infiltrant
CISH :	Chromogenic in situ hybridisation
CLI :	Carcinome lobulaire infiltrant
DAB :	Di-Amino-Benzidine
DBD:	DNA binding domain.
EDC :	Extracellular domain ou domaine extracellulaire
EGFR :	Epidermal growth factor receptor
EIA :	Enzyme Immuno-Assay
ELISA :	Enzyme-linked immunosorbent assays
ER :	Estrogen receptor.
EREs :	Eléments de réponse à l'œstrogène
FDA :	Food and Drug Administration
FISH :	Fluorescence in situ hybridisation
GEFPICS :	Groupe d'étude français pour l'immunohistochimie dans le cancer du sein
HER 2:	Hormonal Epidermal growth factor Receptor 2
HES :	Hématoxyline-éosine-safran
HSP90 :	Heat Shock Proteins ou protéines de choc thermique
IHC :	Immun histochimie
LBD :	Ligand binding domain
MAP	Kinase: mitogen-activated protein kinase
NRG:	Neuréguline.
OMS :	Organisation mondiale de la santé
PBS :	Phosphate Buffered Saline
PCR :	Polymerase Chain Reaction
RE :	Récepteur à l'œstrogène
RH :	Récepteurs hormonaux
RT-PCR :	Reverse Transcriptase- Polymerase Chain Reaction
UK-NEQAS:	United Kingdom National External Quality Assessment Service

## INTRODUCTION

Le cancer du sein constitue une pathologie hétérogène du fait de la grande variété histologique mais également du fait de l'évolution clinique et de l'efficacité variable des traitements. Il représente le cancer le plus fréquent de la femme dans le monde. Dans les pays développés, il atteint une femme sur 11 et il représente la première cause de décès par cancer chez la femme. [1] En France, on enregistre plus de 37000 nouveaux cas par an (35% de tous les cancers). [2]

Son incidence est plus élevée dans les pays développés que dans les pays en voie de développement avec une tendance à la hausse aussi bien dans les pays développés que dans les pays en voie de développement. [3]

Au Maroc, il représente le premier cancer de la femme devant celui du col utérin, il représente également la cause de mortalité la plus fréquente de la femme entre 35 et 55ans [4] et constitue aujourd'hui l'un des enjeux majeurs de la santé publique.

Les facteurs cliniques et pathologiques comme la taille tumorale, le type histologique, le grade histologique, les métastases ganglionnaires, les embols vasculaires, la prolifération, la présence d'une composante in situ et l'âge peuvent servir comme facteurs pronostiques et prédictifs de la réponse à une thérapie adjuvante. [5] Cependant, les nouveaux facteurs pronostiques et prédictifs sont nécessaires pour distinguer des sous groupes de carcinomes qui paraissent homogènes selon les critères cliniques et pathologiques classiques, mais qui ont des aspects biologiques différents.

Parmi ces facteurs les récepteurs à l'œstrogène et à la progestérone et l'HER-2 dont l'expression est extrêmement importante dans la biologie du cancer du sein vu qu'elle apporte au clinicien une information d'ordre pronostique et thérapeutique. [6]

En effet, la présence de l'un des deux récepteurs stéroïdiens, dont la recherche fait partie du bilan initial des cancers du sein, est le témoin d'un bon pronostic [7] et elle est un facteur prédictif d'une réponse favorable au traitement hormonal. [8]

Ces récepteurs étaient traditionnellement dosés par les biochimistes. [9] Actuellement, les anatomopathologistes peuvent fournir rapidement et à moindre coût une évaluation chiffrée.

Quant à la détection de la c-erbB-2, qui est un récepteur transmembranaire à activité tyrosine kinase, elle est devenue de plus en plus essentielle depuis l'approbation, en 1998, de l'anticorps monoclonal Trastuzumab (Herceptine) par la FDA (Food and Drug Administration, USA), pour le traitement du cancer du sein métastatique surexprimant la protéine c-erbB-2. Plusieurs études dans les 15 dernières années ont montré que la surexpression de l'HER-2 est un facteur prédictif d'une agressivité clinique indépendant des autres facteurs pronostiques connus. [10] Il est aussi un facteur prédictif d'une mauvaise réponse à l'hormonothérapie et aux régimes standards de la chimiothérapie. [11]

La détermination du statut HER-2 se fait essentiellement par l'immunohistochimie (IHC). La FISH (Fluorescence in situ hybridisation) est également utilisée dans les cas équivoques en immunohistochimie. [12]

Le but de ce travail prospectif est de :

- évaluer, par étude immunohistochimique, l'expression des récepteurs hormonaux et de la protéine Her-2 dans les cancers du sein diagnostiqués au sein du laboratoire d'anatomie pathologique du CHU HASSAN II de Fès (janvier2008 à Septembre2009).
- Faire des corrélations des récepteurs hormonaux et de l'HER2 entre eux et avec les autres facteurs pronostiques afin de définir leur intérêt pronostique.
- Comparer nos résultats avec ceux de la littérature afin d'évaluer notre technique et de préciser les particularités immunohistochimiques du cancer du sein dans notre série.

# PARTIE THEORIQUE

# I- RECEPTEURS HORMONAUX ET CANCER DU SEIN:

## 1-récepteur à l'œstrogène (RE)

Le récepteur à l'œstrogène fait partie de la superfamille des récepteurs nucléaires [13]. Il agit comme un régulateur de la transcription nucléaire [14]. La première identification de ce récepteur est attribuable à l'équipe de D. Toft en 1966. Il a été cloné et séquencé à partir de cellules épithéliales mammaires cancéreuses de la lignée MCF-7. [13]

### 1-1-Isoformes et structure du RE :

#### 1-1-1- isoformes :

Les REs existent sous deux formes :  $\alpha$  et  $\beta$  [15]

- RE  $\alpha$  (RE classique) est une protéine de 67 kDa codée par un gène situé en 6q25 [14]. Il a un rôle principal dans le cancer du sein et il est analysé dans la pratique clinique. Il a plusieurs isoformes qui ont des fonctions variables. [15]
- RE $\beta$  est une protéine de 485 acides aminés et de poids moléculaire de 54.2 [13], codée par un gène situé en 14q22-24[14]. Il a été découvert et cloné en 1996 [16]. Sa fonction, en particulier son rôle dans le cancer du sein, est mal comprise. ER $\beta$  n'est pas étudié dans la pratique clinique courante du cancer du sein. [15]

#### 1-1-2- structure :

Le récepteur aux œstrogènes se décompose en six domaines fonctionnels (A à F) (figure 1).

- Le domaine A/B :

Le domaine A/B contient AF1 (activation function domain) [13], site de liaison coactivateur/inhibiteur. [17]

- Le domaine C

Le domaine C contient le DBD (DNA binding domain). Il est responsable de la liaison à l'ADN au niveau des EREs (éléments de réponse à l'œstrogène) [18].

C'est aussi le domaine qui contribue à la dimérisation et la transactivation du récepteur.

- Le domaine D

Le domaine D est le domaine intermédiaire (« hinge region ») entre le DBD et le LBD. Il permettrait des changements conformationnels du récepteur pendant l'activation.

C'est dans ce domaine que sont localisées les régions qui vont déterminer la localisation sub-cellulaire du récepteur [19].

- Le domaine E

Le domaine E contient le LBD (ligand binding domain) qui permet la liaison de l'hormone [13] . Il comporte également un domaine de modulation AF2. [17]

- Le domaine F

Le domaine F aurait un rôle dans la spécificité de reconnaissance de la liaison du récepteur à un ligand agoniste ou antagoniste [20] mais c'est un domaine mal connu.

RE $\alpha$  et RE $\beta$  ont un haut degré d'homologie dans le DBD mais ils diffèrent dans le domaine AF1 et LBD ce qui peut expliquer leurs fonctions biologiques différentes. [21]

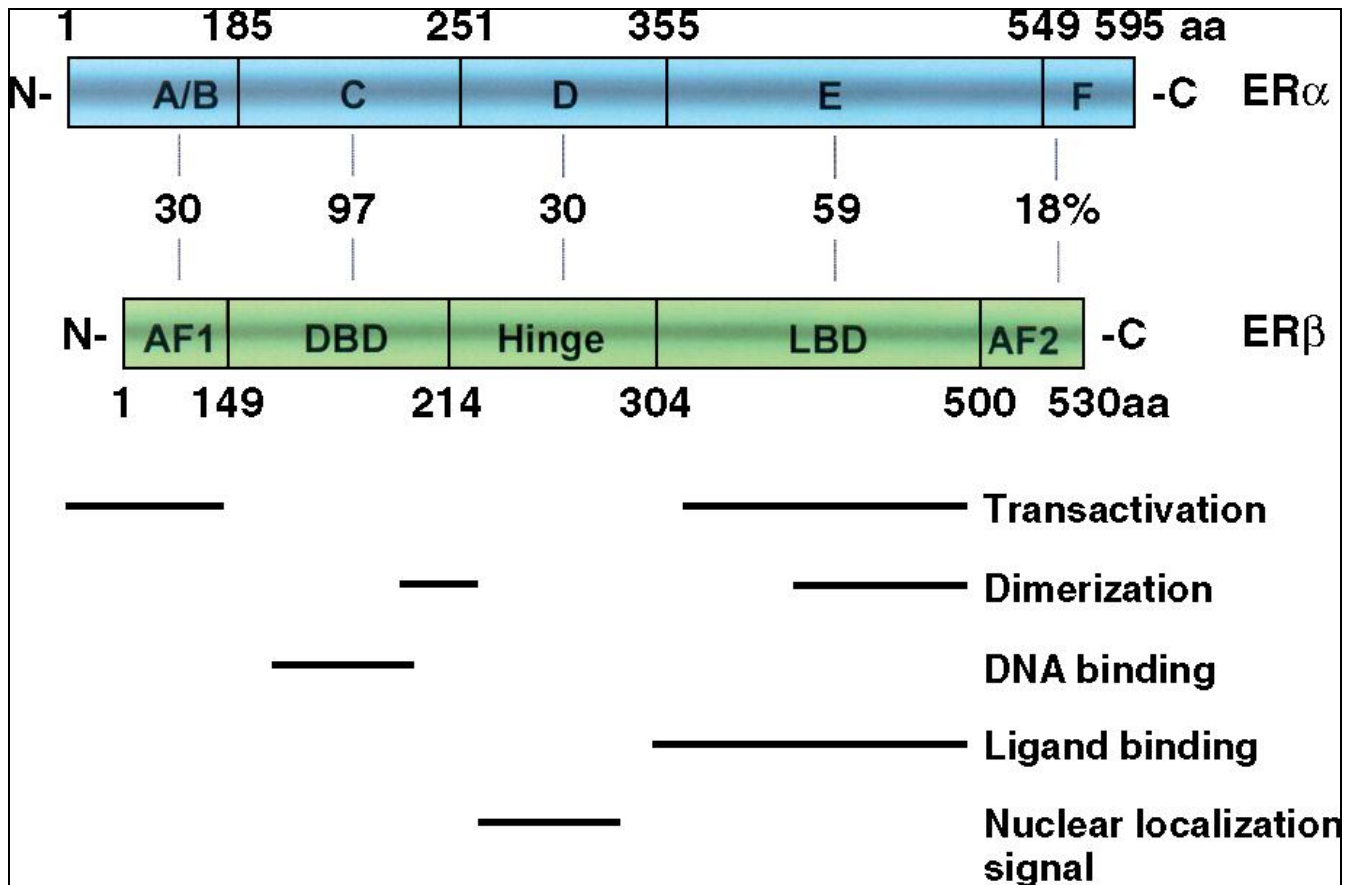


Figure 1: Les domaines structuraux et les domaines fonctionnels des protéines RE $\alpha$  et RE $\beta$ . Les deux REs contiennent huit exons. Les domaines structuraux et les domaines fonctionnels sont représentés, respectivement, sur la structure du RE $\alpha$  et du RE $\beta$ . Le pourcentage d'homologie des deux RE ainsi que la localisation des régions spécifiques d'activation sont aussi montrés sur la figure. [14]

### 1-2- voies fonctionnelles

Les actions des REs sont classées en action génomique et non-génomique. L'action génomique peut être classifiée en classique et non-classique. [15]

#### 1-2-1- La voie génomique :

Les REs synthétisés mais inactifs liés à des protéines chaperonnes HSP90 (Heat Shock Proteins ou protéines de choc thermique) sont séquestrés en équilibre dans le cytoplasme et dans le noyau [17]. La liaison au ligand entraîne une phosphorylation du RE, sa dissociation des chaperonnes, des changements

conformationnels de la protéine et une dimérisation [21]. Les dimères (homodimères  $\alpha/\alpha$  et  $\beta/\beta$  ou hétérodimères  $\alpha/\beta$ ) agissent l'un sur l'autre et interagissent avec des séquences d'ADN appelées EREs (estrogen response elements ou éléments de réponse aux oestrogènes) [14], situées dans les régions régulatrices des gènes cibles, contrôlant leur niveau de transcription. [15]

En plus de la voie classique, le RE peut affecter la transcription d'un certain nombre de gènes qui ne contiennent pas les EREs. [15]

Il est à noter que les voies de transmission associées aux récepteurs membranaires des facteurs de croissance peuvent directement phosphoryler (activer) les REs indépendamment de toute liaison avec un ligand. [17]

#### 1-2-2- la voie non génomique :

Cette voie a été décrite pour la première fois dans les années soixante-dix. Elle intervient dans l'activation ou la répression de molécules préexistantes dans la cellule. [17]

#### 1-3-physiopathologie:

L'importance des œstrogènes dans la progression du cancer du sein est connue depuis plus de 20 ans. En effet, il a été démontré que l'œstrogène est un puissant facteur de croissance des cellules cancéreuses mammaires. De plus, les inhibiteurs spécifiques de sa synthèse ou de son action sur son récepteur se sont avérés efficaces et sont largement utilisés au premier rang de la thérapie ciblée. [17] Cependant, il y a divers aspects de son rôle dans ce cancer qui ont été mal compris. [14]

## 2- récepteur à la progestérone

Le récepteur de la progestérone ou PR est une protéine de la superfamille des récepteurs nucléaires qui sont des facteurs de transcription dont l'activité

transcriptionnelle dépend le plus souvent de leur liaison à un ligand. Il lie naturellement et spécifiquement la progestérone, une hormone stéroïde importante pour le fonctionnement de l'organisme.

### 2-1-Structure et isoformes : (figure 2)

Le récepteur de la progestérone est composé de 933 acides aminés et agit sous forme d'un dimère [23]. Il se présente sous forme de deux isoformes, RPA et RPB, [15] qui diffèrent en taille et en poids moléculaire. Ces deux isoformes sont transcrites à partir de deux promoteurs alternatifs situés sur un même gène situé en 11q22.

Le RPA a deux fonctions d'activation de la transcription appelées AF1 et AF2, alors que le PRB possède en plus dans son extension N-terminale une troisième fonction d'activation spécifique appelée AF3 ou domaine BUS. Les deux isoformes ont aussi une zone IF qui inhibe la transcription. Dans le cas de PRB, cette inhibition est levée par AF3. Cela dit, PRA est un dominant négatif de PRB et il peut aussi réprimer la transcription de la plupart des autres récepteurs d'hormones stéroïdes y compris le récepteur des œstrogènes. [24]

Les RP sont synthétisés dans les tissus ayant des récepteurs aux œstrogènes fonctionnels et qui sont stimulés par l'œstrogène. [23]



Figure 2: structure du PR : PR existe en deux isoformes (PRA et PRB) qui sont transcrits à partir d'un seul gène. DBD : DNA binding domain ; LBD : ligand binding domain [23]

## 2-2-Mode d'action et fonctions

Le mode d'action de la progestérone met en jeu des mécanismes moléculaires identiques aux oestrogènes [17]. Lorsqu'il n'est pas lié à la progestérone, le récepteur de la progestérone se situe dans le cytoplasme de la cellule et est associé à des protéines HSP. Après la liaison de la progestérone au LBD, il y a une dissociation des protéines HSP du récepteur et translocation dans le noyau de la cellule où il se dimérise et peut agir sur la transcription des gènes en se fixant sur des segments spécifiques de l'ADN, appelés PREs (Progesterone Responsive Elements ou éléments de réponse à la progestérone). [25] [26]

## 2-3-Physiopathologie

L'action physiologique de la progestérone est controversée. A-t-elle, sur l'épithélium mammaire, une action anti-proliférative? proliférative? antagoniste ou agoniste des oestrogènes. [17]

Dans une cellule dite normale, PRA et PRB coexistent selon un ratio de 1 afin de permettre le contrôle physiologique de l'action de la progestérone[27]. Des études récentes montrent un lien entre le récepteur de la progestérone et la cancérogenèse mammaire. En effet, les chercheurs ont montré que la production accrue du PRB est associée à un risque accru du cancer du sein [23] et ils pensent que l'augmentation de l'expression de PRA/PRB augmente la résistance au tamoxifène. [28]

## II-HER2 ET CANCER DU SEIN

Le récepteur HER2 est aussi appelé erbB2 en raison de sa similarité de séquence avec l'oncogène viral v-erbB (virus de l'érythroblastose aviaire) [29]. C'est un récepteur de 185kDa, codé par le proto-oncogène neu (autre dénomination possible du récepteur : HER2/neu) situé sur le chromosome 17q21[29][30][31]. Il fait partie des quatre récepteurs homologues qui composent ensemble la famille HER (ou erbB) des récepteurs transmembranaires à activité tyrosine kinase (EGFR/ERBB1, ERBB2, ERBB3 et ERBB4). [32][33]

L'Her2 a été identifié la première fois en 1981[30] et c'est en 1987 que Slamon et autres ont décrit la première fois son importance biologique dans le cancer du sein. Beaucoup de publications suivantes ont confirmé la signification pronostique de l'amplification de l'HER-2 et de sa surexpression dans le cancer du sein. [32]

### 1 - Étude structurale du récepteur d'ERBB2

Les membres de la famille des récepteurs transmembranaires à activité tyrosine kinase sont composés d'une région extracellulaire liant le ligand, une région transmembranaire simple et une région intra-cytoplasmique possédant une activité tyrosine-kinase. [29]

La région extracellulaire de chaque récepteur d'ERBB se compose de quatre domaines (I-IV) [34 ; 35]. (figure 3)

La région extracellulaire de l'ERBB2 est différente des autres. L'ERBB2 a une conformation fixe qui ressemble à l'état activé par le ligand. En outre, cette structure rend la liaison au ligand impossible parce que l'emplacement n'est pas accessible pour l'interaction. [33]

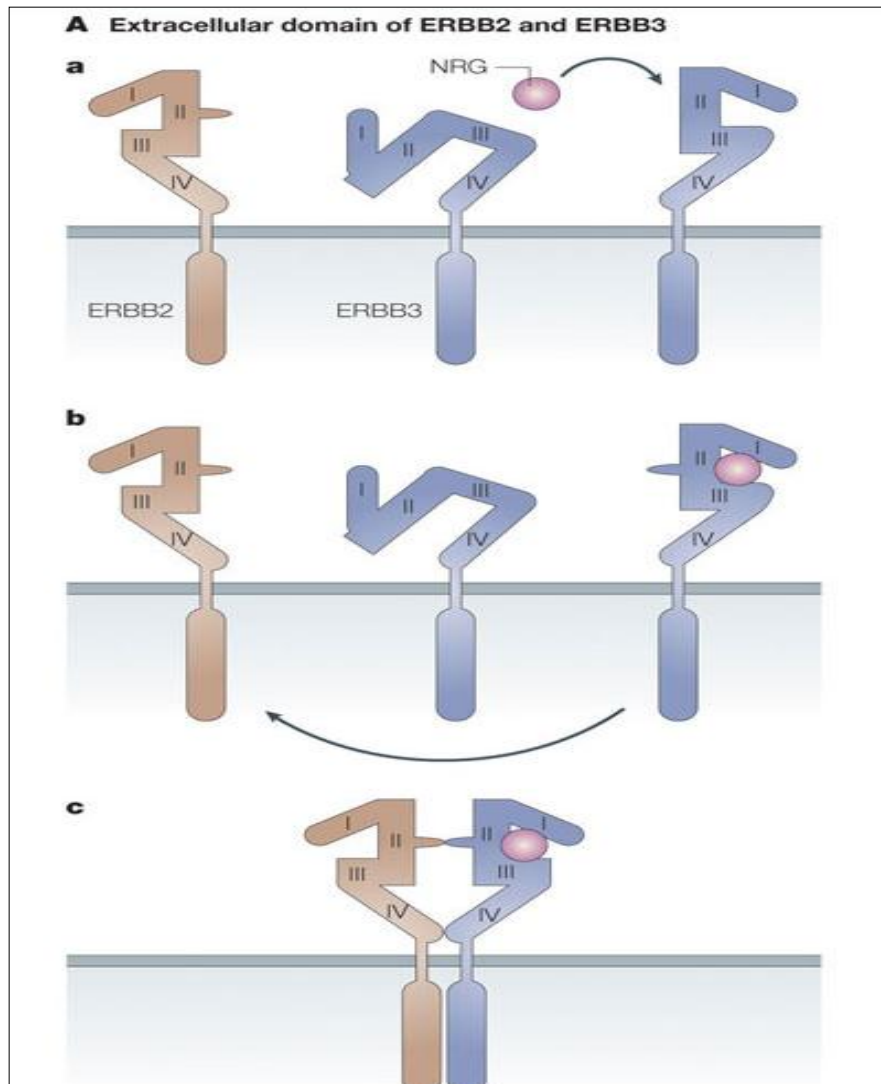


Figure 3 [33] : Structure du récepteur ERBB. La région extracellulaire de chaque ERBB est composée de 4 domaines (I-IV). En absence de ligand, l'ERBB3 a une structure particulière (a). Quand les domaines I et III lient la neureguline (NRG), le bras de dimérisation du domaine II est exposé (b) ce qui entraîne une réaction récepteur-récepteur (c). L'ERBB2 a une conformation fixe qui ressemble à l'état du ERBB3 activé par le ligand.

## 2- Mécanismes d'activation du proto-oncogène neu, de la protéine HER2 et signalisation intracellulaire

La surexpression de la protéine erbB2 peut être la conséquence d'une amplification génique dans 95% des cas ou plus [30], et/ou d'altérations au niveau

transcriptionnel, ou d'une succession de dérégulations aboutissant à la levée des contrôles auxquels est normalement soumise l'expression de ce gène.

La mutation du gène ou troncation de la protéine ont été aussi décrites comme responsables de l'activation du proto-oncogène Neu en oncogène [36]

L'HER2 sous sa forme monomérique est inactif. Son activation se fait suite à la liaison à un ligand qui n'est pas encore identifié, ceci entraîne une hétérodimérisation de ce récepteur avec un autre membre de la famille erbB et une autophosphorylation des résidus tyrosine kinase. Le récepteur est alors internalisé puis dégradé [11][33] [29].

Deux grandes voies de transduction du signal sont activées : la voie de MAP kinase et la voie MAPK-indépendante p70/p85S6K qui est couplée au PI3K. [11]

Ces voies de signalisation conduisent à l'activation de protéines impliquées dans la prolifération cellulaire, l'angiogenèse, la migration cellulaire, la différenciation cellulaire ou bien encore dans la survie cellulaire [29]

### 3-Récepteur Her2 et cancer du sein

La surexpression de l'HER2 joue un rôle dans la carcinogenèse et la progression du cancer du sein. Elle apparaît tôt et reste stable durant l'histoire naturelle de la maladie.[37]

Dans les tissus mammaires sains, on compte environ 20000 récepteurs Her2 par cellule. Dans les cancers de sein présentant une amplification du gène Her2, on dénombre jusqu'à 100 fois plus de récepteurs par cellule. [29]

La surexpression de l'Her2, est rapportée dans approximativement 30% des cancers mammaires invasifs [30], mais aussi dans 60 à 70% des carcinomes canaux in situ, principalement peu différenciés, de haut grade histologique, de type comédocarcinome. [38]

Des Études de la famille des EGFR dans des modèles du cancer du sein ont montré que l'HER2 est le récepteur de la famille des EGFR le plus largement exprimé dans la cellule mammaire et que dans le cancer du sein, l'hétérodimère le plus représenté est HER2/HER3. [11]

### III-METHODES D'EVALUATION

#### 1-évaluation des récepteurs hormonaux :

Les premiers dosages des récepteurs hormonaux ont été développés dans les années 1970-1972 pour sélectionner les patientes susceptibles de répondre à une endocrinothérapie de castration qui était alors la seule thérapeutique accessible avec l'hormonothérapie à dose pharmacologique dans le cadre d'un traitement palliatif. [17]

Ces récepteurs sont le plus souvent recherchés, à l'heure actuelle, par technique immunohistochimique sur des coupes histologiques de tumeur fixée et plus rarement par méthode biochimique sur des fragments congelés de tumeur.

#### 1-1- la méthode biochimique

Le dosage des RO et des RP par méthode biochimique est délicat et toutes les étapes sont critiques. Malgré que c'est une méthode bien établie, quantitative et objective, elle a plusieurs inconvénients incluant un minimum de 200mg de tissu tumoral pour une détermination adéquate des REs. [39]

Le dosage biochimique peut être effectué selon deux techniques :

#### Ø dosage par radioligand :

C'est la mesure du nombre et de l'affinité des récepteurs sur homogénat de tissu par la méthode du charbon dextran et la courbe de Scatchard. [40]

Elle fait intervenir la liaison spécifique entre le récepteur et son ligand et détecte le site de liaison hormonale du récepteur dans la mesure où il est accessible et fonctionnel sans donner aucune indication sur le degré d'intégrité structurale de la molécule.

Le dosage doit être envisagé sur un tissu rapidement congelé dans l'azote liquide et dans une température de 4° afin d'éviter toute détérioration des récepteurs par la chaleur. [41]

Le résultat est mentionné en nombre de sites de liaison, exprimé en femtomoles par milligramme (fmol/mg) de protéines (cytosoliques). Le seuil de positivité est de 10 fmol/mg protéines. [40]

#### Ø dosage par immunoenzymétrie :

Le dosage immunoenzymatique (EIA Enzyme Immuno-Assay) sur homogénat tissulaire a permis un dosage quantitatif et plus rapide grâce à des molécules radiomarquées qui se lient avec une très haute affinité aux récepteurs hormonaux en reconnaissant un épitope précis de la protéine qui peut être fonctionnelle ou non.

La fiabilité de cette technique, applicable en clinique, a été largement validée. [41] Elle peut être réalisée sous réserve d'un contrôle de qualité permanent.

Tous les types de prélèvements (pièce opératoire, forage, cytoponction) sont utilisables.

Dans le compte rendu doit figurer la concentration, exprimée en femtomoles par milligramme (fmol/mg) de protéines (cytosoliques). Le seuil de positivité est de 15 fmol/mg protéines pour les deux récepteurs. [40]

### 1-2- l'immunohistochimie

Depuis 1993, l'évaluation immunohistochimique des récepteurs hormonaux sur coupes en paraffine s'est développée grâce à l'utilisation des techniques de démasquage antigénique. [42]

### 1-2-1-prélèvements :

La recherche de récepteurs hormonaux par immunohistochimie est habituellement effectuée sur le premier prélèvement ayant servi à diagnostiquer un carcinome infiltrant. Dans de rares cas, la technique est répétée sur la pièce de tumorectomie ou de mammectomie parce qu'il n'a pas été détecté de récepteurs sur les biopsies préalables et que celles-ci ne comportaient pas de glandes non tumorales positives.

La recherche de récepteurs hormonaux doit concerner chaque localisation en cas de tumeurs multiples.

À la lumière des connaissances actuelles, seule l'évaluation immunohistochimique des récepteurs hormonaux dans des carcinomes invasifs a une valeur clinique reconnue. Néanmoins, l'évaluation est demandée par certains cliniciens chez des patientes porteuses de tumeurs non invasives (carcinome canalaire in situ).

la recherche de récepteurs hormonaux par immunohistochimie est aussi indiquée dans les localisations métastatiques d'un carcinome mammaire, en particulier lorsque le statut hormonal de la tumeur primitive n'est pas connu [42] [43].

### 1-2-2- règles techniques

#### a- Choix de l'échantillon pour la technique immunohistochimique

En règle générale, un seul bloc de paraffine est suffisant pour réaliser la technique immunohistochimique. 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. Sauf impossibilité, la technique immunohistochimique ne doit pas être réalisée sur le fragment congelé pour l'examen extemporané, car les résultats peuvent être aléatoires. [43] [44] [45]

### b- Fixation - Imprégnation en paraffine

Le type du fixateur utilisé, le délai et la durée de fixation sont particulièrement importants pour l'étude immunohistochimique. [46]

La fixation doit se faire dans un volume de fixateur suffisant correspondant à 10 fois le volume de la pièce opératoire.

Le délai avant la fixation doit être le plus court possible. 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. L'utilisation d'une durée de fixation standardisée améliore la reproductibilité. Une fixation prolongée augmente la protéolyse ce qui entraîne une perte de l'immunoréactivité, mais elle est sans conséquence sur la production d'un signal immunohistochimique correct lorsque la restauration antigénique est adaptée, alors qu'une fixation incomplète donne des résultats médiocres et ses effets sur la recherche des REs sont plus délétères que les effets de la surfixation. [43] [45] [46]

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. [43]

### c- 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[47]. La finesse des coupes (2-3 microns) favorise une meilleure adhérence. [43]

#### d- Restauration antigénique par la chaleur

Cette étape est essentielle et indispensable avec la majorité des anticorps. Elle 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. Les tampons les plus utilisés sont le citrate 0,01 M, pH6 ou l'EDTA 1 mM, pH8. Chaque laboratoire doit effectuer un calibrage de son temps de restauration antigénique. L'utilisation d'un temps de restauration antigénique long peut entraîner des phénomènes de décollement. Les protocoles utilisant une restauration antigénique à des températures inférieures à 100 C produisent moins d'artéfacts. Leur contrepartie est un allongement du temps technique. [43] [48]

#### e- 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:

- Ø Pour le récepteur aux œstrogènes : le clone 1D5 et le clone 6F11. [43] la comparaison entre les deux a trouvé un taux élevé de concordance, mais le 6F11 donne un marquage plus fort et plus propre. [46]
- Ø Pour le récepteur à la progestérone : les clones 1A6 et KD68. [43]

Un nouvel anticorps monoclonal anti RE du lapin, SP1, a été introduit et il donne des résultats favorables. [43]

#### f- 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. [49]

### g- 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. [43]

### h- Automatisation

Les automates ne produisent pas forcément des résultats supérieurs à la technique manuelle mais peuvent améliorer la reproductibilité interne. Pour certains anticorps primaires ont été décrits des effets délétères dus à certains additifs rentrant dans la composition des tampons utilisés dans les automates. [50]

### 1-3-corrélation entre l'immunohistochimie et la méthode biochimique

Des études de grands centres ont montré que l'immunohistochimie est plus sensible et plus spécifique que la biochimie pour l'évaluation des RO et des RP. L'utilisation de l'immunohistochimie pour l'évaluation des RO a donné des résultats supérieurs au test biochimique en matière du type et de la durée de la réponse du cancer du sein métastatique au traitement par le tamoxifène. [46]

### 1-4- la cytométrie en flux

Dans la littérature, la pathologie mammaire a fait l'objet de nombreux travaux par cytométrie en flux. On retrouve majoritairement l'étude du cycle cellulaire, l'analyse des cellules apoptiques et l'expression des récepteurs hormonaux. [51] [52] C'est une technique qui permet d'étudier de manière quantitative et qualitative les caractéristiques physiques et chimiques des cellules et des particules. Elle peut être une alternative à la méthode immunohistochimique pour la détermination de l'expression des RH mais sa validation en pratique n'est pas encore terminée. [53]

## 2-détermination du statut Her2 :

Depuis le premier rapport de Slamon et al [54] montrant que la surexpression de l'Her-2 dans le cancer du sein est associée à un mauvais pronostic, la détermination du statut Her2 est devenue de plus en plus importante. En outre, la sélection des patientes pour une thérapie par le Trastuzumab repose sur la surexpression de cette protéine. [55]

Le statut Her-2 peut être évalué à l'échelle de l'ADN (en utilisant la FISH, la CISH, la PCR, ou le Southern Blot), à l'échelle de l'ARNm (en utilisant le Northern Blot ou RT-PCR) ou à l'échelle de la protéine (en utilisant l'IHC ou l'ELISA). Les deux méthodes les plus utilisées sont l'IHC et la FISH. [56]

### 2-1 immunohistochimie :

La technique immunohistochimique mesure la surexpression de la protéine HER2 de façon semi-quantitative en se basant sur l'intensité et le pourcentage de cellules positives. [37] l'Her-2 est présent en faible quantité à la surface de toutes les cellules épithéliales mammaires bénignes et les cellules cancéreuses. Le but de la technique IHC va être de ne détecter que les cellules tumorales qui surexpriment fortement l'Her-2.

Son optimisation passe par la mise au point d'une technique correcte et d'un apprentissage de l'interprétation de l'immunomarquage. [57]

#### Règles techniques :

Il est capital que l'évaluation immunohistochimique du statut HER2 d'un carcinome mammaire soit optimisée et fiable [58] [59]. La sensibilité de la technique immunohistochimique utilisée doit être ajustée de manière à ne pas produire de faux négatifs ni de faux positifs. [57]

### - fixation

La méthode de fixation est une cause majeure de variabilité de l'immunomarquage dans le cancer du sein [32]. Elle peut augmenter le taux de faux positifs. [55] les prélèvements doivent être reçus le plus tôt possible après la chirurgie, et tranchés pour permettre une fixation rapide. Le temps de fixation recommandé au formol tamponné ne doit pas dépasser 48 heures et doit ne doit pas être de moins de 6 heures. [46]

Il n'existe pas de fixateur idéal, il faut savoir que la fixation en liquide de Bouin est délétère pour la plupart des antigènes. Mais l'adjonction d'un prétraitement permet de pallier cet effet dans de nombreux cas. Les fixateurs alcooliques peuvent favoriser un marquage cytoplasmique. [60]

### - coupe

Pour l'HER2, une période qui ne dépasse pas 6 semaines entre la section et la coloration a été recommandée. [46]

### -choix des anticorps

Parmi les anticorps disponibles sur le marché, les deux les plus utilisés sont l'anticorps monoclonal CB11 (Novocastra) et l'anticorps polyclonal DA 485 (Dako). Ils sont tous les deux dirigés contre le domaine interne de la protéine. Par ailleurs, l'anticorps monoclonal Tab250 (Zymed) reconnaît la portion externe de la molécule. Il est important de comprendre que les affinités de ces différents anticorps peuvent différer et donc influencer la détection. [60]

L'herceptest (Dako), qui utilise l'anticorps DA485 prédilué, a été reconnu par la Food and Drug Administration (FDA) comme un test validé aux USA pour la détection du statut ERBB-2 dans le cadre d'un éventuel traitement par le Trastuzumab. Il a donné des résultats meilleurs que ceux obtenus avec l'anticorps monoclonal CB11. [46] [60]

## 2-2- FISH

L'hybridation fluorescente in situ (FISH) est une technique d'étude de l'ADN qui utilise la propriété de reconnaissance et d'appariement spécifiques de brins complémentaires d'acides nucléiques. Elle permet l'identification et la localisation microscopique d'aberrations chromosomiques dans la cellule en métaphase et/ou en interphase. Elle est la technique de référence pour détecter une amplification génique de l'Her2. [61]

La FISH est utilisée pour l'évaluation des cas 2+ (à condition que le prélèvement ne soit pas fixé dans le liquide de Bouin) et pour l'étalonnage de la technique immunohistochimique. [57]

### 2-2-1- principes

La technique FISH va permettre la quantification du nombre de copies du gène d'HER2 par noyau de cellule tumorale, sur une coupe histologique de cancer du sein, grâce à l'emploi d'une sonde fluorescente spécifique. La détection du signal fluorescent se fait, sur coupes tissulaires congelées ou fixées. Les coupes tissulaires doivent être effectuées sur des lames sialinisées afin d'éviter le décollement [61]. Une détermination simultanée du nombre de copies du gène d'HER2 et du centromère du chromosome 17 peut être effectuée. Les nombres moyens de copies d'HER2 et du centromère du chromosome 17 sont établis à partir de 40 noyaux de cellules carcinomateuses invasives dans deux territoires tumoraux distincts. [62]

### 2-2-2- score de positivité [62]

Les recommandations de l'ASCO pour la détermination du statut HER2 par technique FISH publiées en janvier 2007 donnent les critères suivants pour définir la présence ou l'absence d'une amplification :

- amplification de HER2 :  $HER2 > 6 \text{ copies}$  ou  $HER2/CEN17 > 2.2$ .
- résultat ambigu :  $4 < HER2 < 6$  ou  $1.8 < HER2/CEN17 < 2.2$ .
- Absence d'amplification d'HER2:  $HER2 < 4$  ou  $HER2/CEN17 < 1.8$ .

### 2-2-3- avantages et inconvénients

La FISH est quantitativement plus précise avec un scoring simple, mais elle est plus coûteuse, elle demande plus de temps, elle techniquement exigeante, nécessite un microscope à fluorescence, sa fluorescence diminue rapidement, et elle ne permet pas de visualiser les caractéristiques morphologiques. [55] [63]

### 2-3- CISH

L'hybridation in situ colorimétrique (CISH), dans laquelle les copies du gène HER-2 sont détectées au moyen d'une réaction à la peroxydase, a récemment été introduite comme une alternative à la FISH. [63]

La CISH permet de calibrer la technique immunohistochimique ou servir de contrôle de qualité. [64]

#### 2-3-1- principes

Le principe général de la CISH repose sur l'hybridation d'une séquence d'ADN spécifique avec les gènes HER2 des cellules tumorales. Son originalité tient au mode de révélation qui met en jeu, comme en immunohistochimie, un chromogène.

Pour la CISH, la sonde est marquée à la digoxygénine et pourra être révélée par une cascade de réactions antigène anticorps. [65]

#### 2-3-2- avantages et inconvénients

Les avantages de la CISH sont son moindre coût, son évaluation par les microscopes optiques classiques, l'analyse histologique similaire au marquage immunohistochimique, et sa facilité d'interprétation. Toutefois l'utilisation de la CISH seule est controversée à cause de la possibilité de faux positifs secondaires à la présence d'une polysomie pour le chromosome 17. [63] [66]

## 2-4- corrélation entre la méthode immunohistochimique d'une part, la FISH et la CISH d'autre part

Dans la littérature, le taux de concordance entre IHC et FISH va de 79% à 100% pour les cas 3 + [67 et 68] et entre 6% et 36% pour les cas 2 +. [55 et 69]. Une proportion variable selon les séries des cas 2+ à l'IHC n'est pas amplifiée à la FISH. [70]

Plusieurs études ont montré une excellente corrélation entre l'immunohistochimie et la CISH. [63]

## 2-5-Dosage sérique de l'HER2

La partie extracellulaire de l'HER2/neu appelée Her2-neu ECD ou Her2 sérique se trouve sous forme libre dans la circulation et peut être dosée par la technique ELISA (enzyme-linked immunosorbent assays). [71] Deux tests sont approuvés par la FDA pour ce dosage : une technique manuelle et une technique automatisée. Les deux techniques utilisent les mêmes anticorps NB-3 et TA-1 qui sont dirigés contre les différents épitopes du domaine extracellulaire de l'HER2. La limite supérieure de la normale est de 15 ng/mL pour les deux techniques. [72]

Le niveau sérique de l'HER-2/neu est corrélé avec le stade tumoral, le grade et le statut ganglionnaire [72].

La plupart des études ne trouvent pas de corrélation entre l'ELISA d'une part et l'immunohistochimie et la FISH d'autre part. [73][74][75]. D'autres études, par contre, trouvent une corrélation entre ces différentes techniques. [76][77][78]

La technique ELISA a plusieurs avantages, c'est une technique standardisée, non invasive, utilisée en routine et il n'y a pas variations inter observateurs. [71]

Concernant l'intérêt du dosage sérique de l'HER-2 au moment de la décision thérapeutique, les résultats de la littérature sont contradictoires. Certaines études n'ont pas trouvé d'association entre ce dosage et la réponse à la chimiothérapie

néoadjuvante et au Trastuzumab [79][80]. Une autre étude par contre trouve qu'un niveau pré-thérapeutique élevé de l'HER-2 est un facteur prédictif de la réponse au Trastuzumab [81].

## IV- classifications d'usage dans le cancer du sein

### 1-classification de l'OMS 2004 [82]

- Ø Carcinome canalaire infiltrant, sans autre indication :
  - carcinome mixte.
  - carcinome pléomorphe.
  - carcinome avec des cellules géantes ostéoclastiques.
  - carcinome avec des aspects choriocarcinomateux.
  - carcinome avec des aspects mélanocytaires.
- Ø carcinome lobulaire infiltrant
- Ø carcinome tubulaire.
- Ø carcinome cribriforme infiltrant.
- Ø carcinome médullaire.
- Ø Carcinome produisant de la mucine:
  - carcinome mucineux
  - Cystadénocarcinome et carcinome à cellules cylindriques sécrétantes.
  - carcinome à cellules en bague à chaton.
- Ø tumeurs neuro-endocrines :
  - carcinome neuro-endocrine de type solide.
  - tumeur carcinoïde atypique.
  - carcinome à petites cellules.
  - carcinome neuro-endocrine à grandes cellules.
- Ø carcinome papillaire infiltrant.

- Ø carcinome micro-papillaire infiltrant.
- Ø carcinome apocrine.
- Ø carcinome métaplasique.
  - carcinome métaplasique épithélial pur :
    - carcinome épidermoïde.
    - adénocarcinome avec métaplasie à cellules fusiformes.
    - carcinome adéno-squameux.
    - carcinome muco-épidermoïde.
  - Carcinome métaplasique mixte à composante épithéliale et conjonctive.
- Ø carcinome à cellules riches en lipides.
- Ø carcinome sécrétant.
- Ø carcinome oncocytique.
- Ø carcinome adénoïde kystique.
- Ø carcinome à cellules acineuses.
- Ø carcinome à cellules claires (riche en glycogène).
- Ø carcinome sébacé.
- Ø carcinome inflammatoire.

## 2-classification p TNM [82]

L'appréciation histologique de la taille tumorale et de la présence de ganglions axillaires envahis est beaucoup plus fiable que l'appréciation clinique. Elle permet d'avoir une approche pronostique et thérapeutique.

Le stade pTNM repose sur 3 éléments :

- T : extension de la tumeur primitive.
- N : l'absence ou la présence et l'extension des métastases ganglionnaires lymphatiques régionales.
- M : l'absence ou la présence de métastases à distance.

## Classification p TNM 2004

p T : tumeur primitive

p Tx : tumeur primitive ne peut être déterminée

pT0 : pas de tumeur primitive.

pTis : carcinome carcinome in situ.

pT1 : tumeur de 2cm ou moins dans sa plus grande dimension.

pT1mic : microinvasion <0,1cm dans sa plus grande dimension.

pT1a : > 0,1cm et ≤0,5cm.

pT1b : > 0,5cm et ≤ 1cm.

pT1c : >1cm et ≤ 2cm

pT2 : tumeur dont le plus grand diamètre est >2cm et ≤5cm.

pT3 : tumeur de plus de 5cm dans sa plus grande dimension.

pT4 : tumeur de toute taille avec extension directe à la paroi thoracique ou à la peau.

pT4a : extension à la paroi thoracique.

pT4b : œdème, infiltration ou ulcération de la peau du sein, ou nodules cutanés satellites limités au même sein.

pT4c : T4a+T4b.

pT4d : carcinome inflammatoire.

NB : la taille est mesurée au niveau de la composante invasive.

pN : adénopathies régionales

pNx : les ganglions régionaux ne peuvent être examinés (curage ganglionnaire non réalisé ou réalisé préalablement).

pN0 : absence d'adénopathies régionales métastatiques détectées en histologie.

pN1 : atteinte de 1 à 3 ganglions axillaires homolatéraux et/ou de la chaîne mammaire interne non détectés cliniquement, mais en technique sentinelle.

pN2 : 4 à 9 ganglions axillaires métastatiques homolatéraux, ou atteinte clinique des ganglions de la chaîne mammaire interne.

pN3 : atteinte d'au moins 10 ganglions axillaires, ou des ganglions sous claviculaires, ou atteinte clinique de la chaîne mammaire interne associée à une atteinte axillaire d'au moins un ganglion, ou atteinte de la chaîne mammaire atteinte lors de technique sentinelle associée à une atteinte axillaire d'au moins 3 ganglions, ou atteinte des ganglions sus claviculaires.

pM : métastases à distance

pMx : détermination impossible de l'extension métastatique.

pM0 : absence de métastase à distance.

pM1 : présence de métastase à distance.

### 3-classifications de Chevalier et Sataloff

Ce sont des classifications qui permettent l'évaluation histologique de la réponse à la chimiothérapie néo-adjuvante. Elles se basent sur l'analyse des reliquats tumoraux mammaires et axillaires.

#### 3-1-Grade de Chevallier : [83]

- Ø Grade 1 : absence de toute cellule tumorale macroscopiquement et histologiquement.
- Ø Grade 2 : présence de carcinome in situ dans le sein, sans cellule tumorale invasive et pas de métastase axillaire.
- Ø Grade 3 : présence de cellules carcinomateuses résiduelles avec des altérations stromales comme la sclérose et la fibrose.
- Ø Grade 4 : peu ou pas de modifications de l'apparence de la tumeur.

### 3-2- Grade de Sataloff : [84]

#### Ø Tumeur primaire mammaire :

- § TA : effet thérapeutique total ou presque total.
- § TB : effet thérapeutique de plus de 50 % mais pas total.
- § TC : moins de 50 % d'effet thérapeutique.
- § TD : pas d'effet thérapeutique.

#### Ø Ganglions axillaires :

- § NA : présence d'un effet thérapeutique, pas de maladie métastatique résiduelle.
- § NB : pas de métastase ou d'effet thérapeutique.
- § NC : présence d'un effet thérapeutique mais avec métastase axillaire toujours présente.
- § ND : métastase axillaire toujours présente et viable et pas d'effet thérapeutique.

### 4-grade de SBR

Il existe plusieurs modalités d'établissement des grades histopronostiques. Le plus courant en Europe est celui de Scarf-Bloom-Richardson (grade SBR) modifié par Elston et Ellis [85]. Ainsi modifiée, cette classification s'applique à toutes les formes de cancer invasif et prend en compte trois critères histologiques cotés de 1 à 3 : la différenciation tubulo-glandulaire de la tumeur, le pléomorphisme nucléaire et le compte des mitoses. [8] [86]

#### Ø La différenciation tubulo-glandulaire est appréciée sur la proportion de tubules, glandes présentes dans la tumeur :

- § score 1 : bien différencié (plus de 75% de la surface tumorale).
- § score 2 : moyennement différencié (10-75% de la surface tumorale).
- § score 3 : peu différencié (moins de 10% de la surface tumorale).

∅ Le pléomorphisme nucléaire : les atypies nucléaires sont jugées sur la population cellulaire prédominante et non sur une zone plus atypique minoritaire.

§ Score1 : noyaux à la fois réguliers entre eux et dont la taille est inférieure à 2 fois la taille des noyaux des cellules normales.

§ Score3 : noyaux :

- réguliers entre eux mais dont la taille est supérieure à 3 fois celle des noyaux des cellules normales.

- ou irréguliers avec une variation de taille allant de 1 à 3 fois celle des noyaux des cellules normales.

§ Score 2 : tout ce qui n'est ni 1 ni 3.

∅ Les mitoses : le comptage des mitoses doit se faire au grossissement 400x dans la zone la plus mitotique et on doit compter 10 champs consécutifs.

Le diamètre du champ microscopique au grossissement x 400 est variable selon le microscope utilisé. Le compte mitotique sera donc adapté en fonction de ce diamètre. Elston et Ellis ont établi un abaque permettant d'adapter le compte des mitoses en fonction du diamètre utilisé.

Le score total obtenu permet de distinguer :

∅ grade I : scores totaux 3, 4, ou 5.

∅ Grade II : scores totaux 6 ou 7.

∅ Grade III: scores totaux 8 ou 9.

# ETUDE PRATIQUE

# I- MATERIEL ET METHODES

## 1-matériel

### 1-1-population étudiée

Notre étude inclut toutes les patientes présentant un carcinome mammaire infiltrant diagnostiqué au service d'anatomie pathologique et chez qui nous avons réalisé une étude immunohistochimique à la recherche des récepteurs hormonaux et l'herceptest.

### 1-2-étude histologique et immunohistochimique

#### 1-2-1- étape macroscopique

- Ø Pour les biopsies, tous les fragments sont mesurés et inclus en totalité.
- Ø Pour les pièces de tumorectomie (figure 4) : après orientation et mesures de la pièce, elle est ouverte selon son plus grand axe. La tumeur est ensuite décrite, mesurée ainsi que sa distance par rapport aux limites de résection. Après fixation, des prélèvements de la tumeur, des limites de résection et du curage ganglionnaire s'il est fait sont réalisés :

- Pièce de moins de 3cm: prélèvements de la tumeur en totalité.
- pièce de plus de 3 cm :

Une grille complète est faite, intéresse une tranche de section de la pièce de tumorectomie, en regard de la plus grande dimension de la tumeur, et 2 tranches supplémentaires de la tumeur, si la tumeur < 2 cm ; Une tranche supplémentaire par cm au delà.

Des prélèvements perpendiculaires aux 2 autres plans de l'espace sont faits, à l'endroit où la tumeur est la plus proche de la limite d'exérèse.



Figure 4 : pièce de tumorectomie montrant la présence d'une lésion suspecte de malignité (flèche).

Ø Pour les pièces de mastectomie avec curage ganglionnaire (figure 5 et 6) : après orientation et mesures de la pièce et du lambeau cutané, elle est prédécoupée en tranches qui restent reliées entre elles par le lambeau cutané. Les lésions sont ensuite repérées, ouvertes et décrites (taille, situation, distance par rapport aux limites de résection). Après fixation de la pièce, des prélèvements sont réalisés au niveau de la tumeur (au moins trois prélèvements), des limites, du lit de tumorectomie antérieure, des zones cicatricielles, du quadrant initialement atteint en cas de traitement néo-adjuvant, du mamelon, des quadrants et des ganglions (tous les ganglions avec un ganglion par cassette).

Tous les prélèvements adressés sont fixés au formol à 10%.



Figure 5

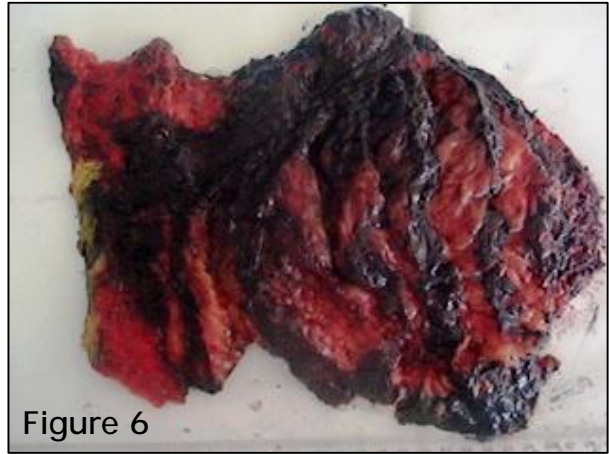


Figure 6

Figure 5 : pièce de mastectomie avec curage axillaire

Figure 6 : pièce de mastectomie après découpage en tranches.

### 1-2-2- techniques pour étude histologique

- Déshydratation
- Inclusion en paraffine
- Coupes et coloration par l'HES (hématoxyline-éosine-safran).

### 1-2-3- techniques manuelle de mise en évidence immunohistochimique des récepteurs hormonaux

Etape 1 : déparaffinage, démasquage antigénique et blocage des peroxydases endogènes :

- Le déparaffinage se réalise en incubant les lames une nuit à l'étuve (37°C) et le reste de la paraffine est éliminé par 2 bains de toluène.
- Le démasquage antigénique est réalisé en les chauffant dans une solution de tampon citrate bouillant (pH=6) dans un autocuiseur.
- On dispose les lames dans une chambre avec compresses imbibées d'eau (chambre humide) et on met 1 à 2 gouttes de la protéine bloquante pendant 15 minutes pour bloquer les sites non spécifiques.

#### Etape 2 : anticorps primaire :

- On applique suffisamment de solution d'anticorps primaire pour couvrir l'échantillon et on incube pendant 1h20min dans une chambre humide pour éviter la déshydratation des tissus.
- On égoutte les lames et on les met dans un panier.
- Rinçage dans 2 bains de PBS pendant 5 minutes chacun.

#### Etape 3 : anticorps secondaire :

- On applique l'anticorps secondaire (anticorps biotinylé) et on incube dans une chambre humide pendant 20 minutes.
- On couvre les lames par un plateau pour qu'elles ne sèchent pas.
- On égoutte les lames et on les met dans un panier pour les rincer dans 2 bains du PBS.
- On applique une solution de peroxydase-streptavidine pendant 20 minutes (la streptavidine se fixe sur la biotine de l'anticorps secondaire).
- On rince dans 2 bains du PBS et on égoutte les lames.

#### Etape 4 : coloration des lames :

- On prépare extemporanément un réactif de coloration à base d'amino-ethyl-carbazole (AEC).
- On couvre l'échantillon par le réactif de la coloration et on incube pendant exactement 20 minutes.
- On rince à l'eau courante, on égoutte les lames et on incube les lames dans un bain d'hématoxyline puis on rince à l'eau du robinet.
- Passage rapide dans du carbonate de lithium saturé puis on rince à l'eau courante.
- Rinçage à l'eau distillée.

#### Etape 5 : montage à l'eau entre lame et lamelle :

#### 1-2-4- technique immunohistochimique manuelle de l'herceptest

Dans cette étude, l'expression de la protéine Her-2/neu est évaluée en utilisant l'herceptest, en respectant tous les détails du protocole accompagnant ce Kit.

##### Ø Déparaffinage et réhydratation :

Des coupes de tissu tumoral sont déposées sur une lame prétraitée, et incubées à 56-58°C puis à 37°C pendant une nuit. Le jour suivant, les lames sont déparaffinées et réhydratées.

##### Ø Démasquage antigénique (restauration de l'épitope):

- Le bain-marie et la solution de restauration de l'épitope (citrate à 10mmol/l) sont réchauffés à 96°C, ensuite les lames sont immergées dans les récipients de coloration contenant la solution de restauration de l'épitope préchauffée et on laisse incuber pendant 40minutes à 95-99°C.
- Après l'incubation, on laisse les lames refroidir sans qu'il y ait un changement brusque de la température.
- Les lames sont ensuite rincées avec de l'eau distillée.
- Suite à la récupération des antigènes, les lames sont décantées et placées dans 2 bains du tampon du lavage dilué (Tris/HCl : fournie avec le Kit d'HercepTest) pendant 5 minutes.

##### Ø Blocage des peroxydases endogènes

- Les lames sont placées à température ambiante dans une chambre humide.
- Les tissus sont par la suite recouverts pendant 5 minutes de réactifs de blocage de la peroxydase pour bloquer l'activité des peroxydases endogènes présentes dans les cellules et ainsi réduire le bruit de fond.
- les lames sont ensuite rincées avec l'eau distillées ou avec le tampon du lavage (Tris/HCl) (5 minutes) et enfin placées dans un bain de tampon de lavage frais (Tris-HCl) (5 minutes).

Ø Anticorps primaire et réactif de contrôle négatif :

- Le surplus du liquide est enlevé et on ajoute l'anticorps primaire.
- Ensuite les lames sont rincées avec le tampon du lavage (Tris/HCl) et placées dans un bain de tampon de lavage frais (Tris/HCl).

Ø Réactif de visualisation:

Le surplus de liquide est enlevé et on applique le réactif de visualisation Dako (Polymère dextrane conjugué avec la peroxydase de raifort et immunoglobulines anti-lapin de chèvre isolées par affinité) pendant 30 minutes. Ensuite on rince les lames.

Ø Solution Substrat Chromogène

- Les lames sont incubées 10 minutes avec la solution substrat chromogène « DAB » (3,3-diaminobenzidine, Dako). Le DAB est le substrat chromogénique pour la peroxydase, qui marque en brun le site d'interaction antigène-anticorps.
- Les lames sont rincées à l'eau distillée ou avec le tampon de lavage (Tris/HCl).

Ø Coloration de contraste par l'hématoxyline:

Les lames sont contre-colorées avec de l'hématoxyline, puis elles sont rincées à l'eau distillée et trempées dans un bain de carbonate de lithium saturé. Finalement, elles sont rincées à l'eau distillée.

Ø Montage entre lame et lamelle

## 1-2-5- technique automatisée de l'évaluation des récepteurs hormonaux et de l'herceptest :

Dans cette étude, une partie des tests a été réalisée par l'automate. Cet appareil réalise presque la totalité des étapes :

- déparaffinage
- démasquage antigénique
- Bloquage des peroxydases endogènes
- Application de l'anticorps primaire
- Révélation
- Contre coloration
- Post contre coloration

## 2-méthodes statistiques:

### 2-1- recueil des données

Les données ont été recueillies d'une façon prospective sur une durée de 22 mois (janvier 2008 à Septembre 2009), à partir des comptes rendus anatomopathologiques, des fiches pré-remplies par les gynécologues du CHU Hassan II de Fès et adressées avec le prélèvement et à partir des bons adressés par les médecins du secteur privé et des autres structures sanitaires publiques. Une fiche d'exploitation a été remplie pour chaque patiente (voir ci-joint).

L'archivage des données en vue de traitement a été réalisé dans un tableau Excel.

### 2-2- analyse statistique

L'analyse des données a été réalisée au laboratoire d'épidémiologie de la faculté de médecine et de pharmacie de Fès, au moyen du logiciel SPSS. L'étude s'est déroulée en deux étapes :

- La première étape a consisté en une description générale des variables de la population étudiée (âge, provenance des pièces opératoires, type du prélèvement, taille tumorale en cm, taille selon TNM, type histologique, grade SBR, composante in situ associée, présence d'embols vasculaires, présence d'une maladie de paget associée, présence de métastases ganglionnaires ou à distance, intensité et pourcentage d'expression des récepteurs hormonaux et score de l'Her-2).
- La deuxième étape a consisté en une analyse univariée avec recherche des corrélations, entre les RE et les RP, entre le pourcentage et l'intensité d'expression de chaque récepteur, entre les RH et l'HER2, entre les RH et l'HER2 d'une part et les autres facteurs pronostiques d'autre part : l'âge, la taille tumorale en cm et la taille T, le type histologique, le grade SBR, les embols vasculaires, l'envahissement ganglionnaire et les métastases à distance. Des tests chi2 ont été utilisés pour évaluer les corrélations et une valeur de  $p < 0.05$  est considérée comme significative.

## II-RESULTATS

### 1-Etude descriptive

Notre étude porte sur 130 cas de carcinomes mammaires infiltrants diagnostiqués au service d'anatomie pathologique du CHU Hassan II de Fès sur une durée de 21 mois allant de janvier 2008 à Septembre 2009.

#### 1-1-incidence

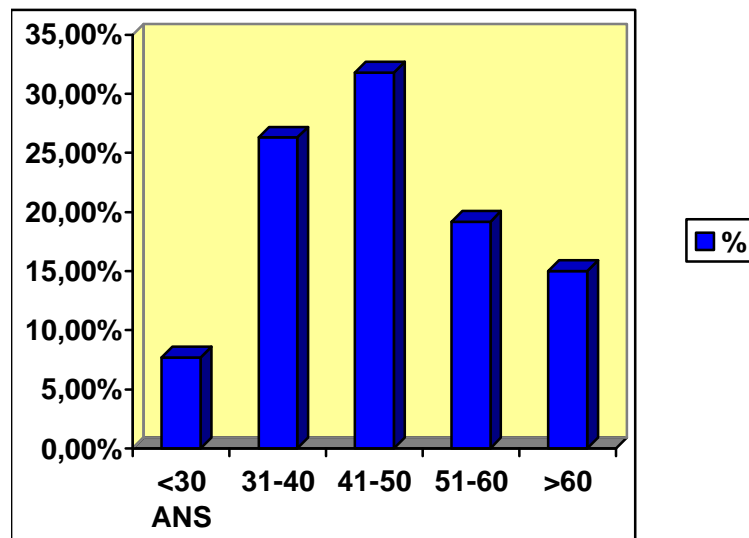
Dans notre service, le cancer du sein représente 9,6 ‰ de tous les prélèvements reçu et 13% de tous les cancers.

## 1-2-âge

L'âge de nos patientes varie entre 22ans et 100 ans avec une moyenne de 48ans et une médiane de 46 ans (graphique1).

18 Patientes avaient 35 ans ou moins, soit 27% de l'ensemble des patientes

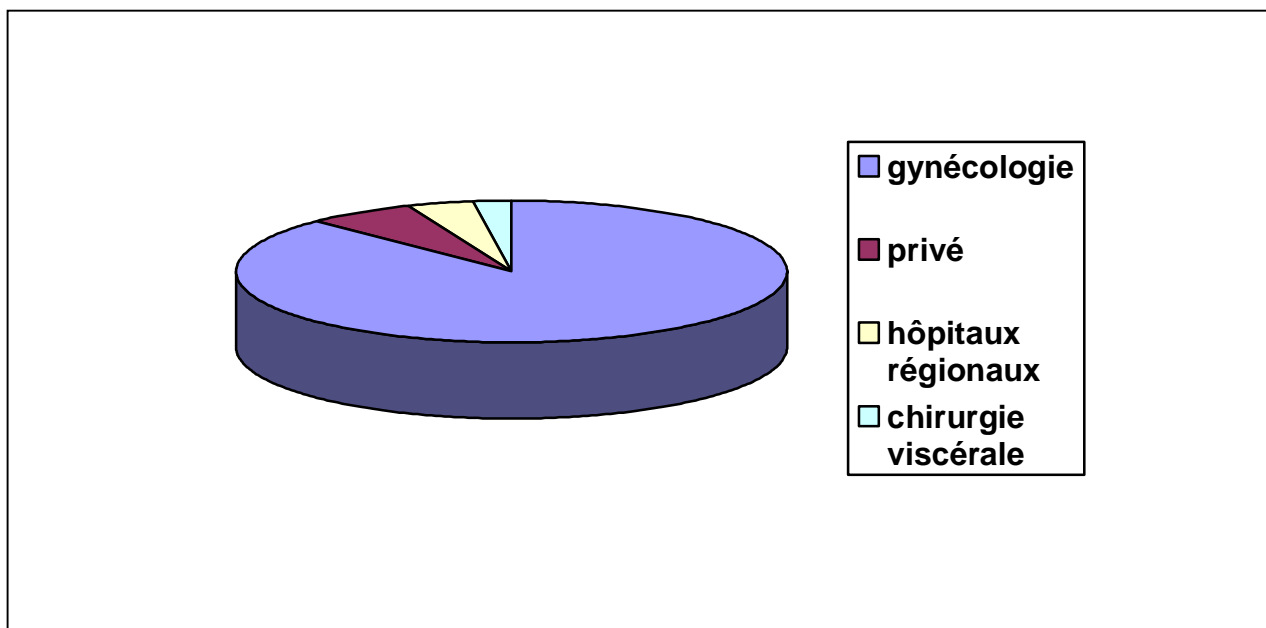
Graphique 1 : répartition des patientes selon l'âge.



## 1-3-provenance

La majorité des cas concernés par notre étude (114cas) ont été adressés par le service de gynécologie-obstétrique du CHU HASSAN II de FES, 8cas sont adressés par des formations privées de la ville, 6 cas sont adressés par des formations sanitaires publiques (Hôpitaux régionaux) et le reste des cas est adressé par le service de chirurgie viscérale du CHU Hassan II de Fès (graphique 2).

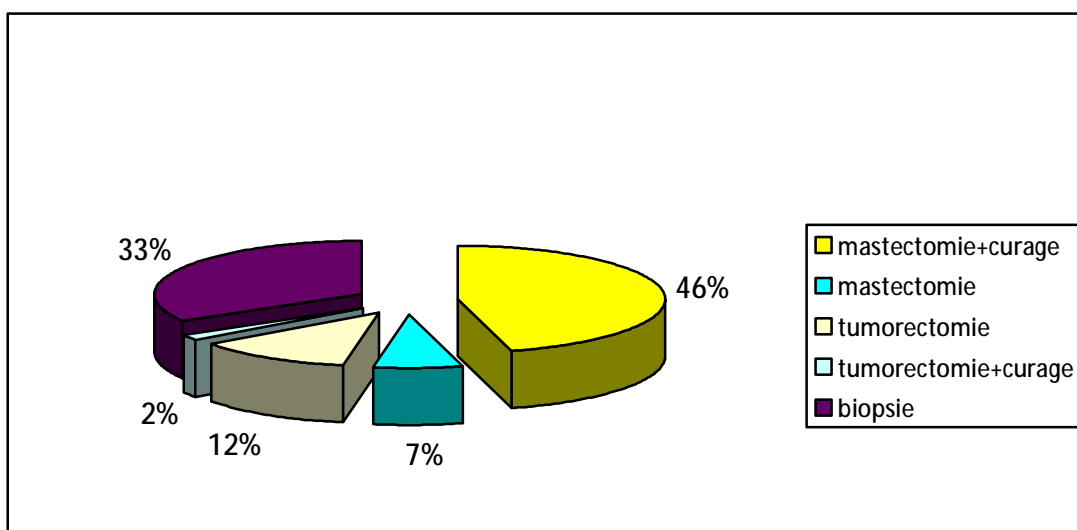
Graphique 2 : répartition selon le service d'origine



#### 1-4-type de prélèvement

Nous avons reçu divers types de prélèvements : mastectomie avec curage axillaire dans 59 cas (45,7%), biopsie dans 44 cas (33,3%). mastectomie de propreté dans 9cas (7%), tumorectomie dans 16cas (12,4%) et tumorectomie avec curage axillaire dans 2cas (1,6%). (Graphique 3).

Graphique 3 : répartition selon le type de prélèvement



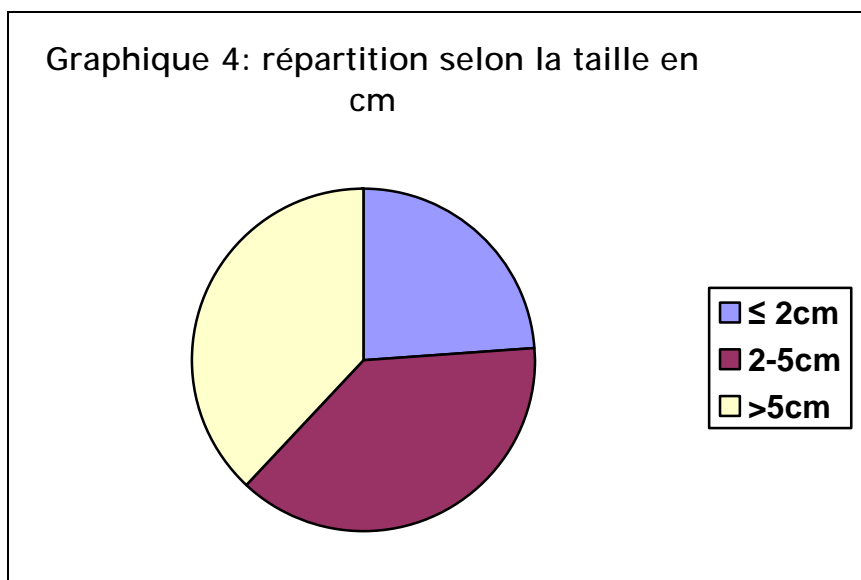
### 1-5-taille tumorale et stade T du TNM

La taille tumorale était évaluable dans 119cas, le reste des cas correspond à des prélèvements envoyés des hôpitaux régionaux ou du secteur privé pour lesquels nous n'avions pas de renseignements cliniques.

La taille tumorale varie entre 0,2 cm et 16cm avec une moyenne de 4,3cm et une médiane de 3cm (tableau 1 et graphique 4).

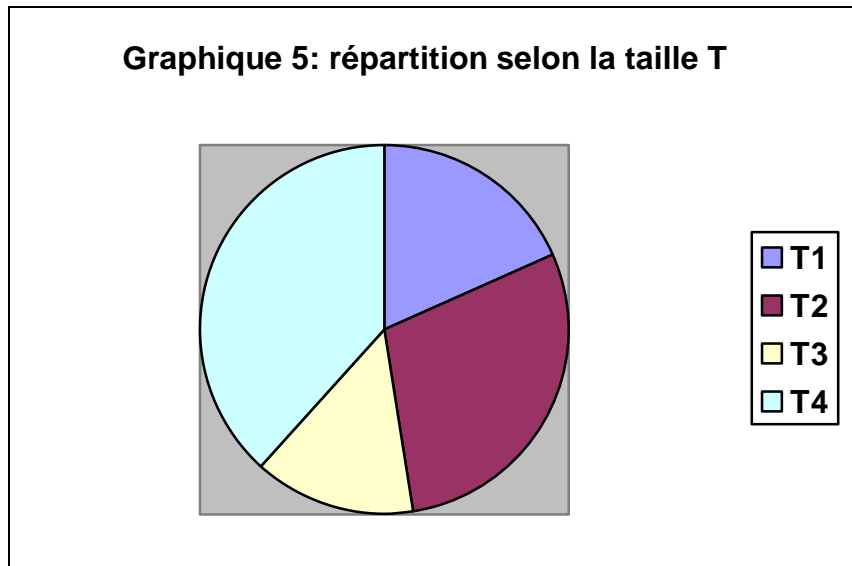
Tableau 1 : répartition selon la taille tumorale

Taille tumorale (cm)	Nombre de cas (n)	Pourcentage (%)
≤ 2cm	28	24%
2-5cm	46	38%
>5cm	45	38%
TOTAL	119	100%



La taille TNM n'a pas été relevée dans 9cas. La tumeur est classée en T1 dans 22 cas (18,3%), T2 dans 35cas (29,2%), T3 dans 18 cas (14,2%) et T4 dans 46 cas (38,3%). (Graphique 5).

**Graphique 5: répartition selon la taille T**



#### 1-6-limites de résection

Les limites de résection chirurgicale étaient le plus souvent saines (64cas soit 75% de l'ensemble des cas de tumorectomie et de mastectomie). Dans 25% des cas, elles étaient tumorales.

#### 1-7-type histologique

Les types histologiques étaient largement dominés par le carcinome canalaire infiltrant retrouvé dans 112 cas soit 86% (figure 7 et 8), suivi par le carcinome lobulaire infiltrant retrouvé dans 7 cas (5,4%) (figure 9). Les autres types histologiques (11 cas) sont représentés par le carcinome métaplasique (6cas), le carcinome papillaire infiltrant (2cas), le carcinome apocrine, le carcinome médullaire et le carcinome peu différencié (1cas pour chaque type) (graphique6 et figures 10, 11, 12 et 13).

graphique 6: répartition selon le type histologique

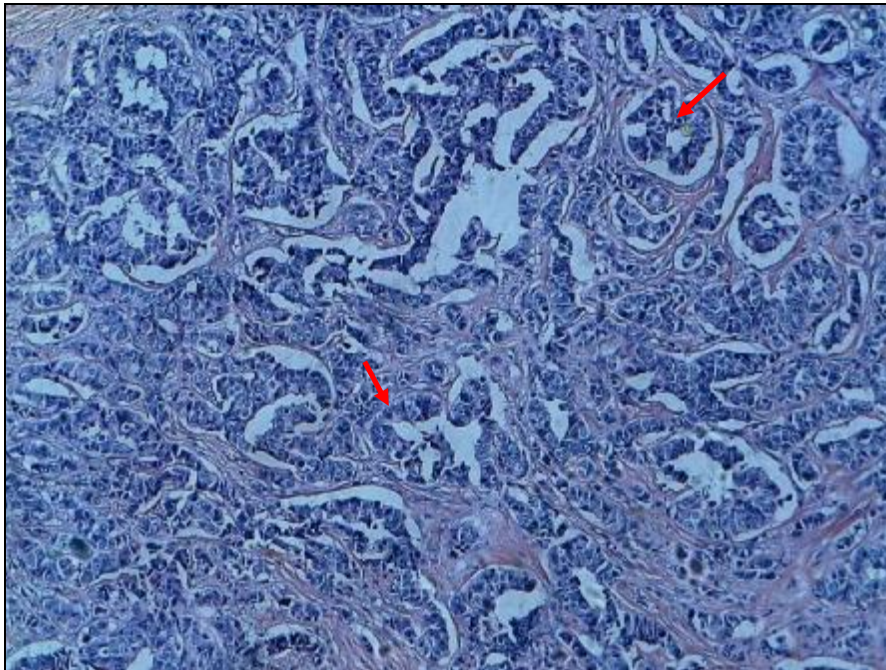
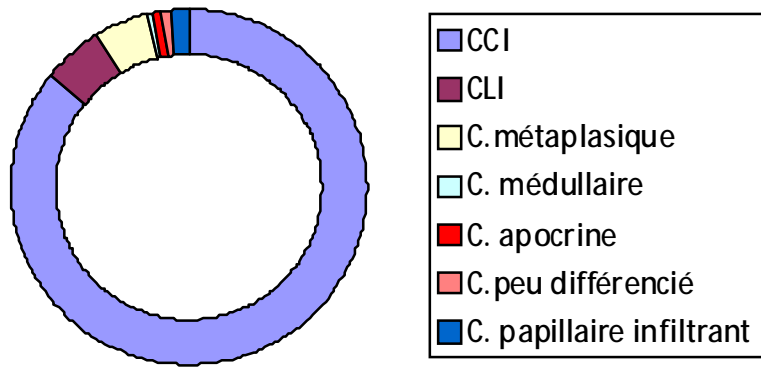


Figure 7 :HES x 100 : CCI : prolifération d'architecture canalaire (flèches)

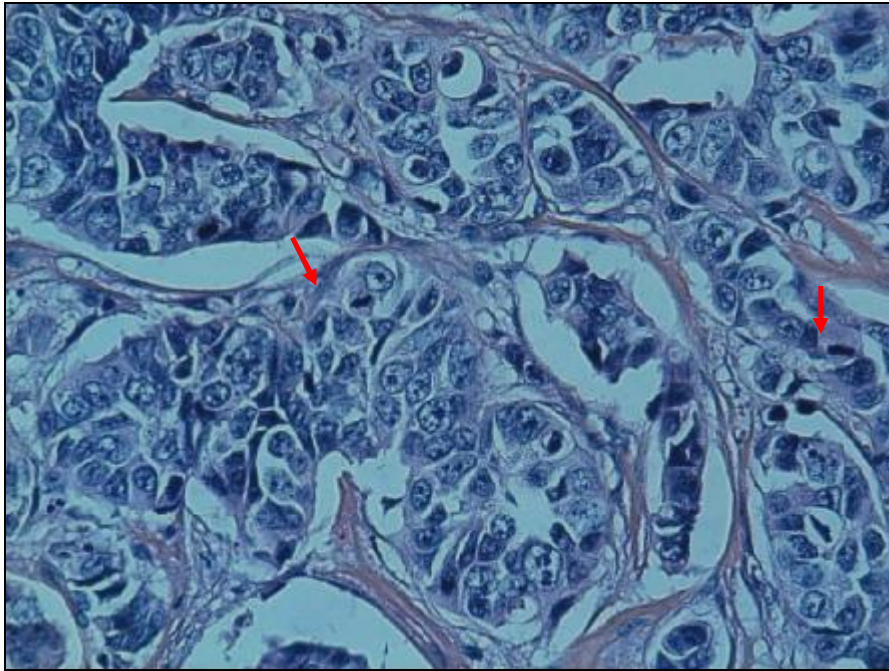


Figure 8 : HES x 400 : CCI : atypies cytonucléaires et mitoses (flèches)

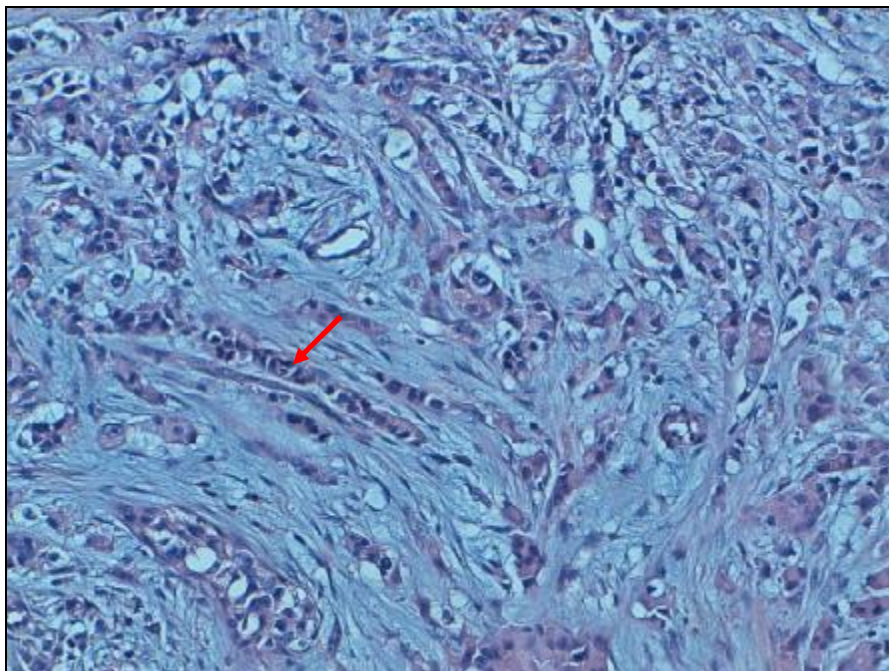


Figure 9 : HESx100 : CLI : aspect en fil indien (flèche).

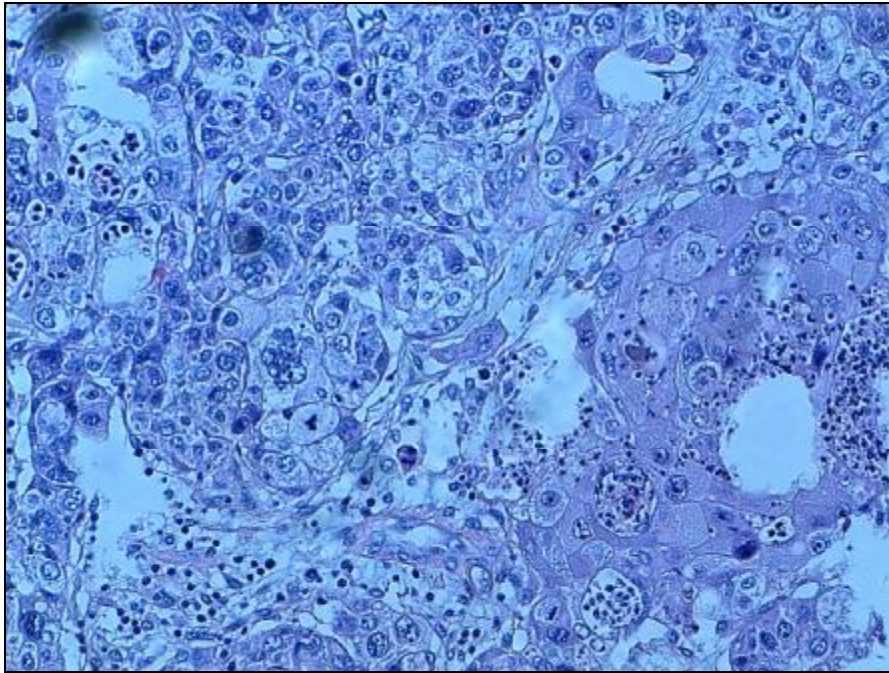


Figure 10 : HES x 200 : carcinome métaplasique de type épidermoïde

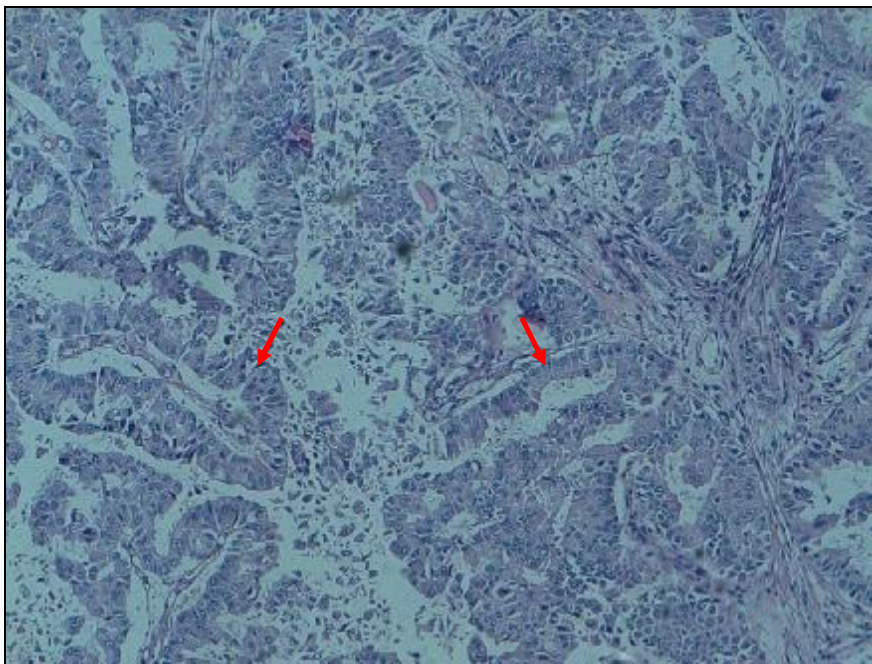


Figure 11 : HES x 100 : carcinome papillaire infiltrant : prolifération carcinomateuse faite de papilles (flèches).

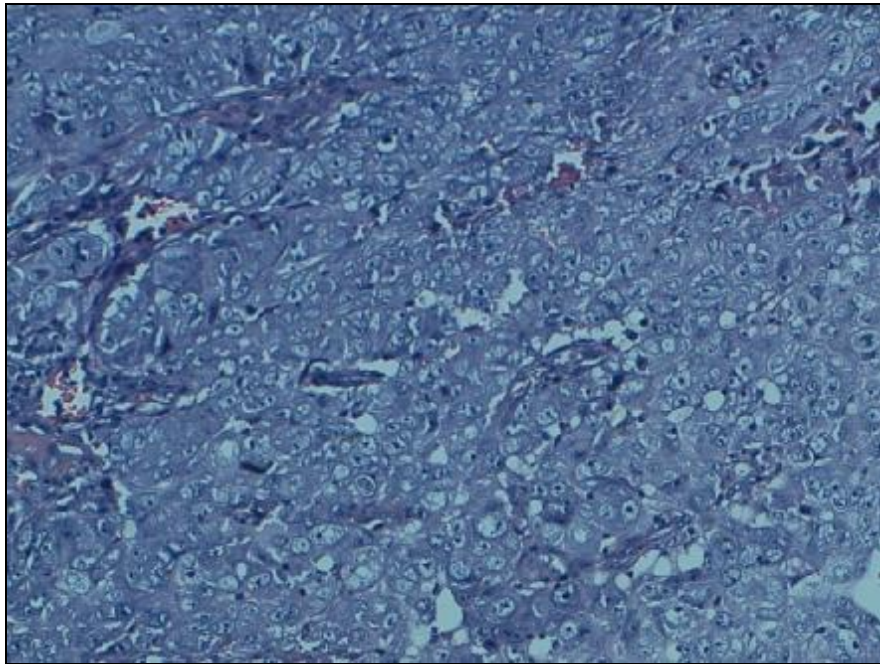


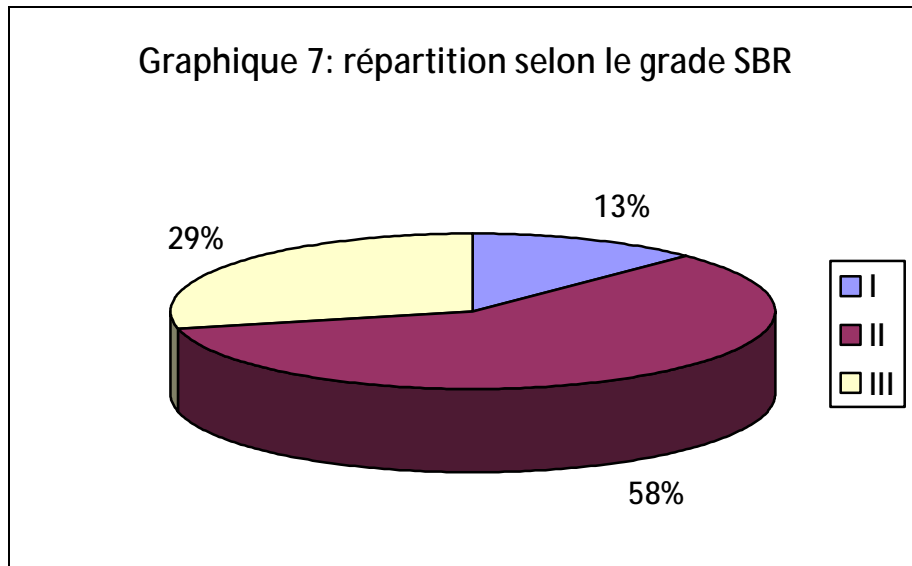
Figure 12 : HES x 200 : carcinome médullaire : prolifération d'aspect syncytial

### 1-8-grade SBR

Le grading n'a pas pu être évalué dans 2 cas vu la très petite taille tumorale. Pour les autres cas, la plupart était de grade II de SBR, suivi du grade III puis du grade I (tableau 2 et graphique 7).

Tableau 2 : répartition selon le grade SBR

Grade SBR	I	II	III	Total
Nombre de cas	16	76	36	128
Pourcentage %	12,5%	59%	28,5%	100%



### 1-9-composante in situ associée

Parmi les 119 cas de carcinome canalaire et de carcinome lobulaires infiltrants, 52 cas avaient une composante in situ associée, soit 44% de l'ensemble de ces deux entités histologiques. La composante in situ était le plus souvent de grade intermédiaire, suivi du haut grade puis du bas grade (tableau 3 et figures 13 et 14) et elle représentait 5% à 70% de l'ensemble de la tumeur.

**Tableau 3 : répartition de la composante in situ selon le grade**

Grade de la composante in situ	Nombre de cas (n)	Pourcentage (%)
Bas	3	5,7%
Intermédiaire	30	57,7%
Haut	19	36,6%
<b>Total</b>	<b>52</b>	<b>100%</b>

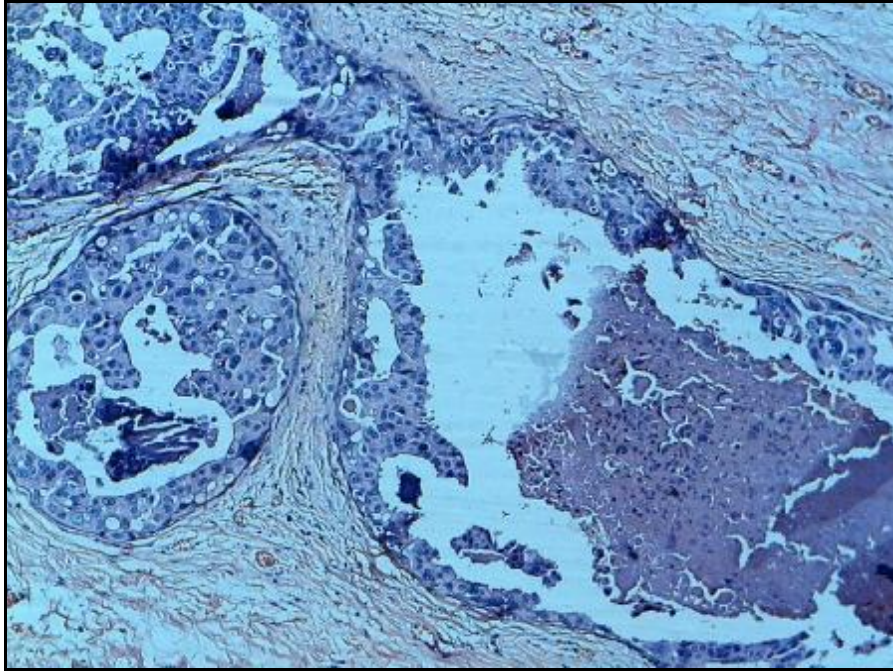


Figure 13 : HES x 200 : carcinome intracanalair de haut grade de type comédocarcinome.

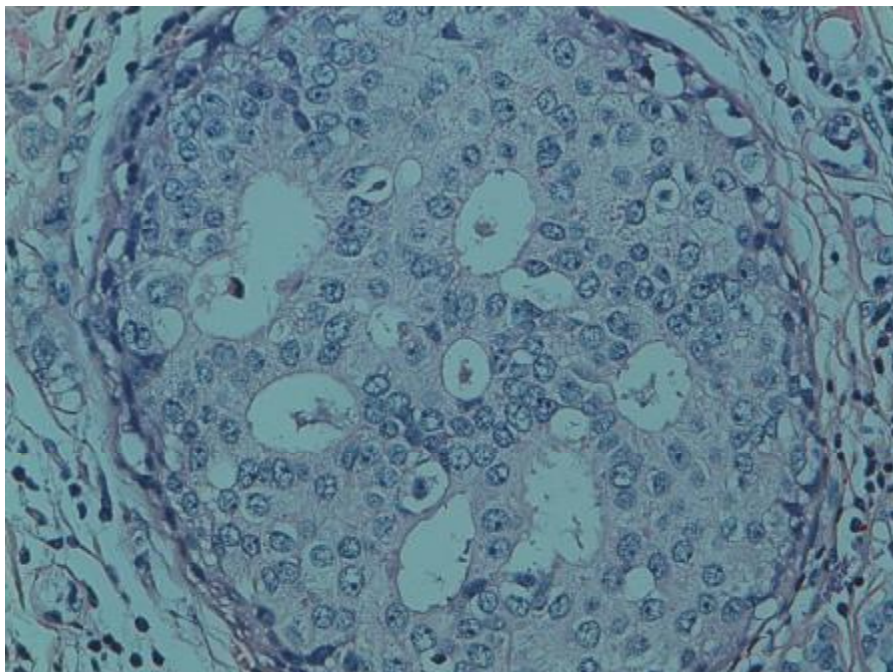


Figure 14 : carcinome intracanalair de grade intermédiaire.

### 1-10-infiltrat inflammatoire

L'infiltrat inflammatoire est retrouvé dans 78 cas, soit 60,5% de l'ensemble des cas.

### 1-11-embols vasculaires

Les embols vasculaires sont présents dans 59 cas, soit 45,7% de l'ensemble des cas.

### 1-12-maladie de Paget

Parmi les 74 cas où on a un prélèvement du mamelon, 8 cas présentent une maladie de Paget, soit 10,8% de l'ensemble de ces cas (figure 15).

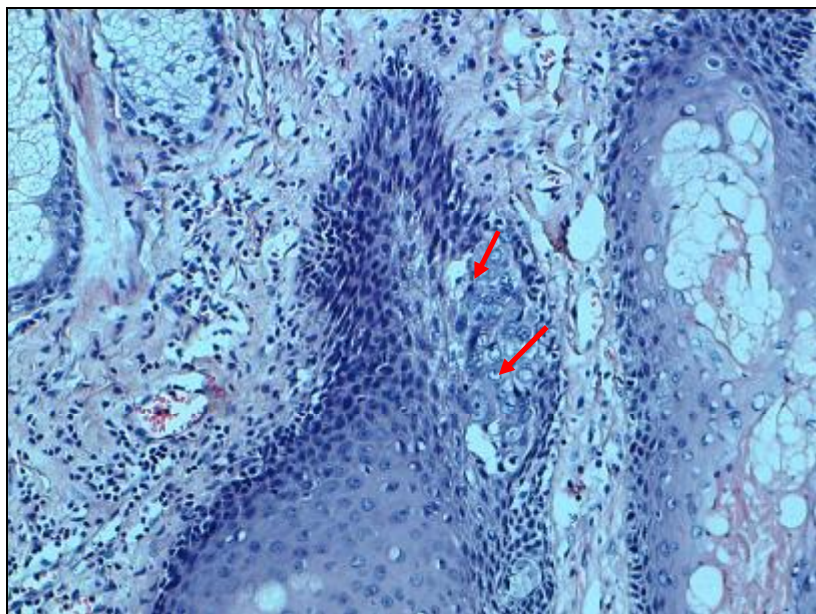


Figure 15 : HES x 200 : maladie de Paget : présence de cellules atypiques au niveau de l'épiderme mamelonnaire (flèches)

### 1-13-curage ganglionnaire

Ø Le curage ganglionnaire a été réalisé chez 63 patientes et il a porté sur 2 à 35 ganglions. Il a montré des métastases ganglionnaires dans 46 cas, soit 73% de l'ensemble des patientes ayant bénéficié d'un curage ganglionnaire (tableau4).

Tableau 4 : répartition selon le nombre de ganglions métastatiques

Nombre de ganglions métastatiques	Nombre de cas (n)	Pourcentage (%)
1-3	22	48%
4-10	22	48%
>10	2	4%
Total	46	100%

Ø Le stade N était connu dans 115 cas, soit à partir du curage ganglionnaire envoyé, soit à partir des résultats de l'échographie ou de l'examen clinique. 39% des tumeurs sont classées comme N0 et 61% comme N+.

Parmi les N+, 54% sont classés en N1, 40% en N2 et 6% en N3. (tableau 5, graphique 8 et figure 16).

Tableau 5 : répartition selon le statut N

Stade N	Nombre de cas (n)	Pourcentage (%)
N0	45	39%
N+	70	61%
- N1	- 38	- 54%
- N2	- 28	- 40%
- N3	- 4	- 6%
Total	115	100%

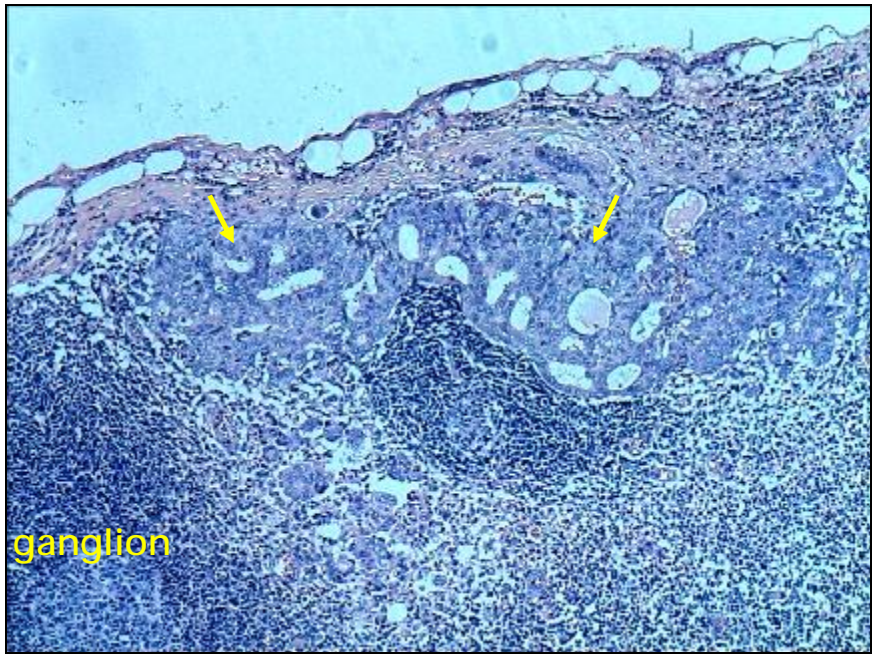
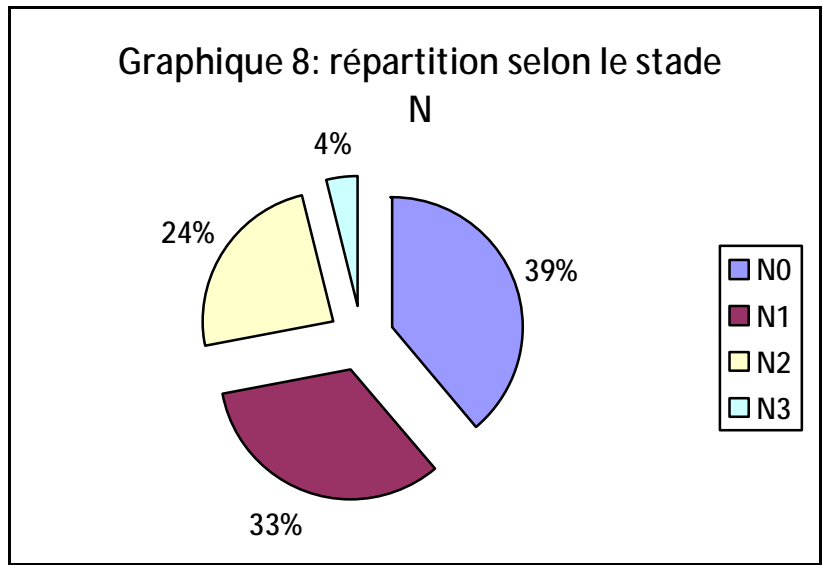


Figure 16 : HES x 100 : métastase ganglionnaire : envahissement du tissu ganglionnaire par un CCI (flèches)

### 1-14-métastases à distance

Le statut métastatique était connu chez 102 patientes dont 13 présentent des métastases à distance soit 13% de l'ensemble de patientes chez qui le statut métastatique est connu (tableau 6). Le reste correspond à des prélèvements envoyés du privé et des hôpitaux régionaux ou le bilan d'extension n'avait pas encore été effectué.

Tableau 6 : répartition selon le statut métastatique

Métastases à distance	Nombre de cas (n)	Pourcentage (%)
MO	89	87,3
M1	13	12,7%
Total	102	100%

### 1-15-stades de Sataloff et Chevalier

Nous avons reçu 9 pièces de résection post chimiothérapie pour lesquelles l'effet thérapeutique a été évalué selon les grades de Sataloff et Chevalier.

Pour la tumeur, le stade de sataloff était TB dans 6 cas et TC dans 3 cas.

Pour les ganglions, stade de Sataloff était réparti en NC dans 4 cas, NB et ND dans un seul cas chacun. Dans les 3 autres cas, il s'agissait de pièces de mastectomie de propreté.

Tous ces cas étaient classés en grade 3 de Chevalier.

### 1-16-récepteurs hormonaux

Les résultats des récepteurs hormonaux sont exprimés en intensité (1+ à 3+) et en pourcentage de cellules tumorales marquées. Seul le marquage nucléaire est pris en considération. Le seuil de positivité est de 10%.

- Récepteur à l'oestrogène :

Les RE sont positifs dans 83 cas (soit 64%), avec une intensité allant de 1+ dans 11cas à 3+ dans 35cas (tableaux 7 et 8, graphique 9 et figures 17, 18, 19 et 20).

Tableau 7 : nombre et pourcentage des cas RE positifs et RE négatifs

RO	Nombre de cas (n)	Pourcentage (%)
Positifs	83	64%
Négatifs	47	36%
Total	130	100%

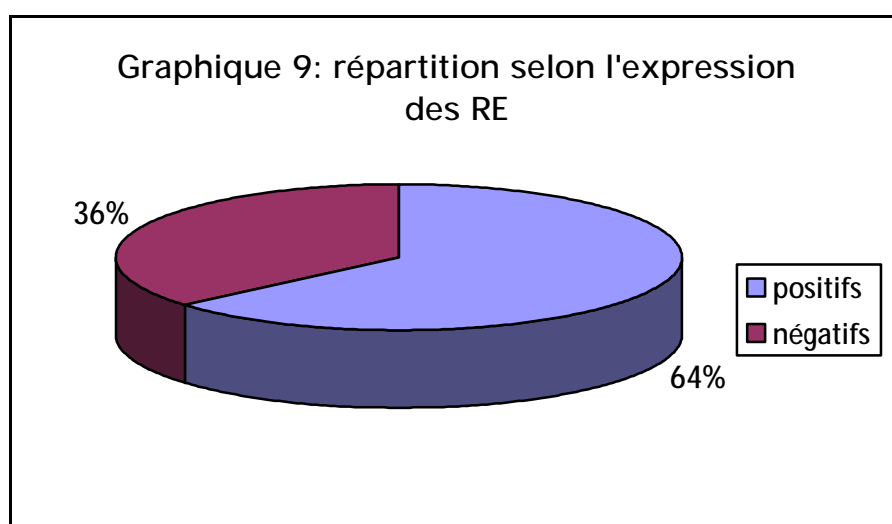


Tableau 8 : répartition des cas RE positifs selon l'intensité du marquage

Intensité du marquage des RE	Nombre de cas (n)	Pourcentage (%)
1+	10	12%
2+	38	45%
3+	35	43%
Total	83	100%

Nous avons aussi comparé l'expression des RE dans les cas réalisés par technique manuelle et par automate. Nous avons constaté que la technique automatisée est plus sensible que la technique manuelle (tableau 9).

Tableau 9 : comparaison de l'expression des RE par la technique manuelle et la technique automatisée

	Manuelle	Automate
RE positifs	62(62,2%)	21 (66,7%)
RE négatifs	37 (37,8%)	10 (33,3%)
Total	99	31

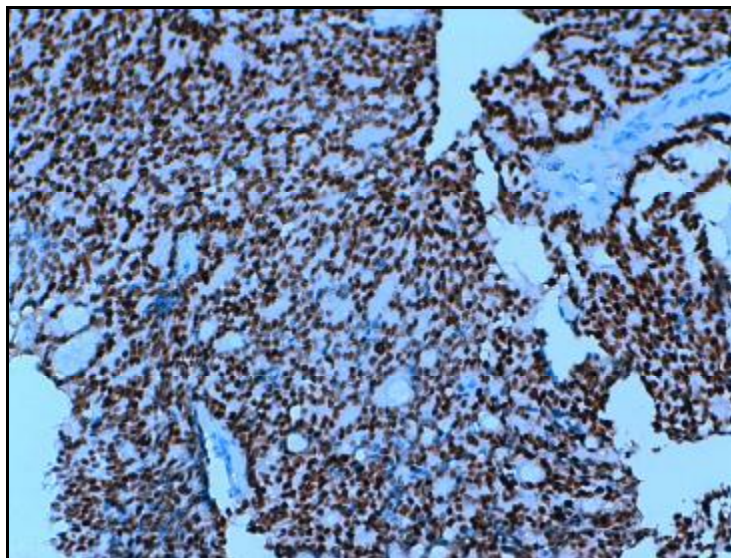


Figure 17 : RE x 200 : RE 3+ : marquage nucléaire fort

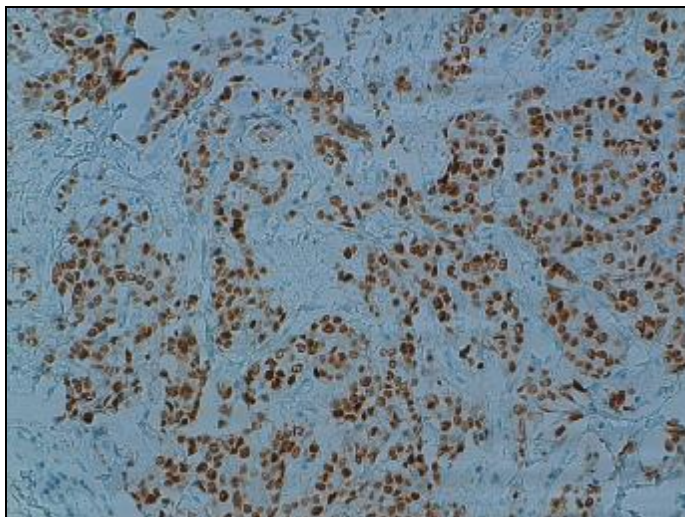


Figure 18 : RE x 200 : RE 2+ : marquage nucléaire modéré

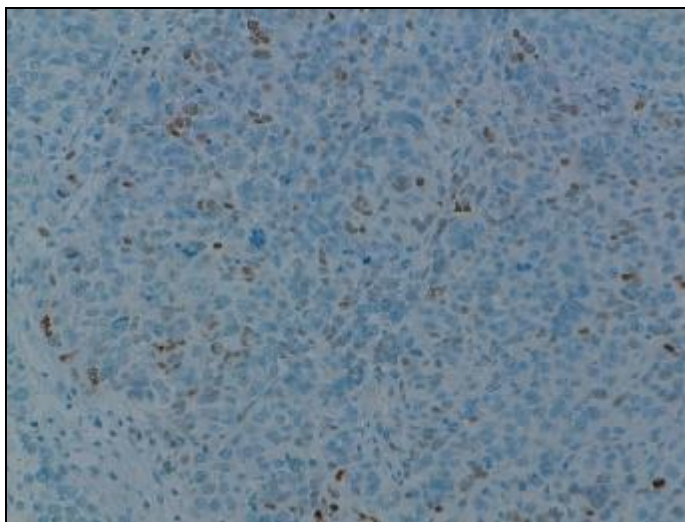


Figure 19 : RE x 200 : RE 1+ : marquage nucléaire faible

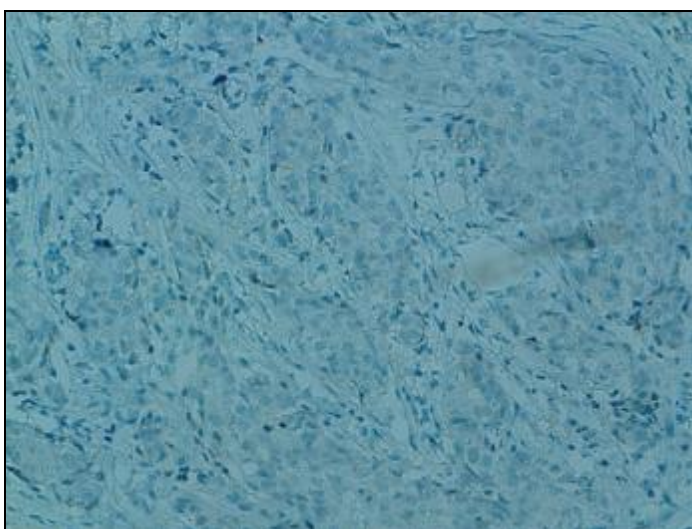


Figure 20 : RE x 200 : RE négatif : absence de marquage

- récepteur à la progestérone:

Les PR sont positifs dans 93 cas (soit 71%), avec une intensité allant de 1+ dans 15cas à 3+ dans 39cas (tableaux 10 et 11, graphique 10 et figures 21, 22, 23, 24).

Tableau 10 : nombre et pourcentage des cas PR positifs et des cas PR négatifs

PR	Nombre de cas (n)	Pourcentage (%)
Positifs	93	71%
Négatifs	37	29%
Total	130	100%

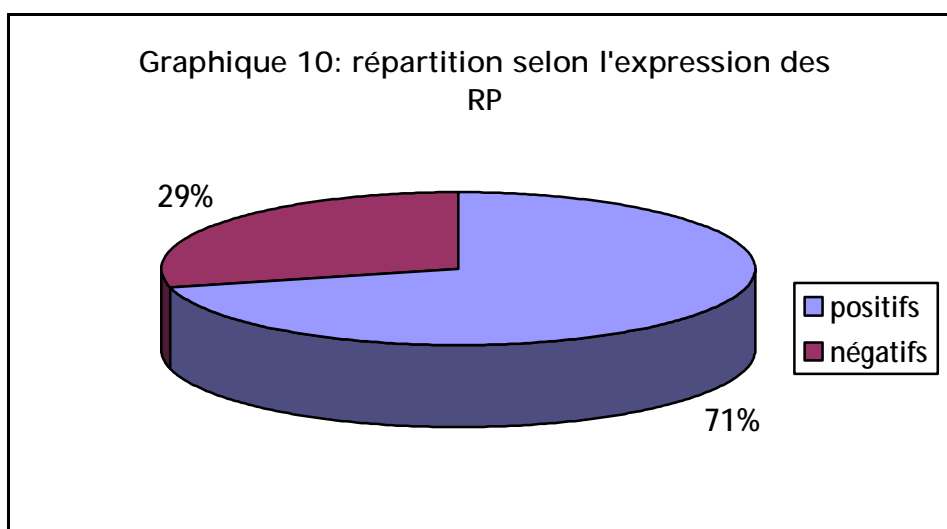


Tableau 11 : répartition des cas PR positifs selon l'intensité du marquage

Intensité du marquage des PR	Nombre de cas (n)	Pourcentage (%)
1+	15	16%
2+	39	41%
3+	39	43%
Total	93	100%

- La comparaison de l'expression des PR dans les cas réalisés par technique manuelle et par automate n'a pas montré de différence notable (tableau 12).

Tableau 12 : comparaison de l'expression des PR par la technique manuelle et la technique automatisée

	Manuelle	Automate
PR positifs	70 (71,4%)	23 (70%)
PR négatifs	29 (28,6%)	8 (30%)
Total	99	31

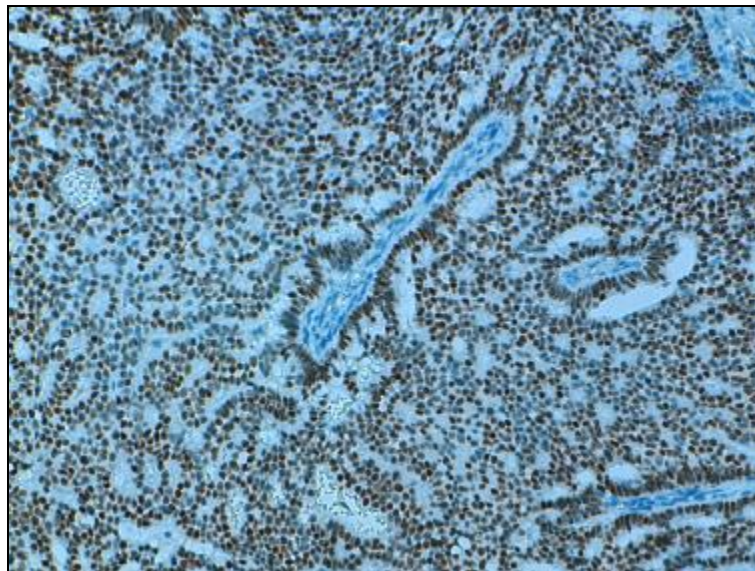


Figure 21 : PR x 200 : PR 3+ : marquage nucléaire fort

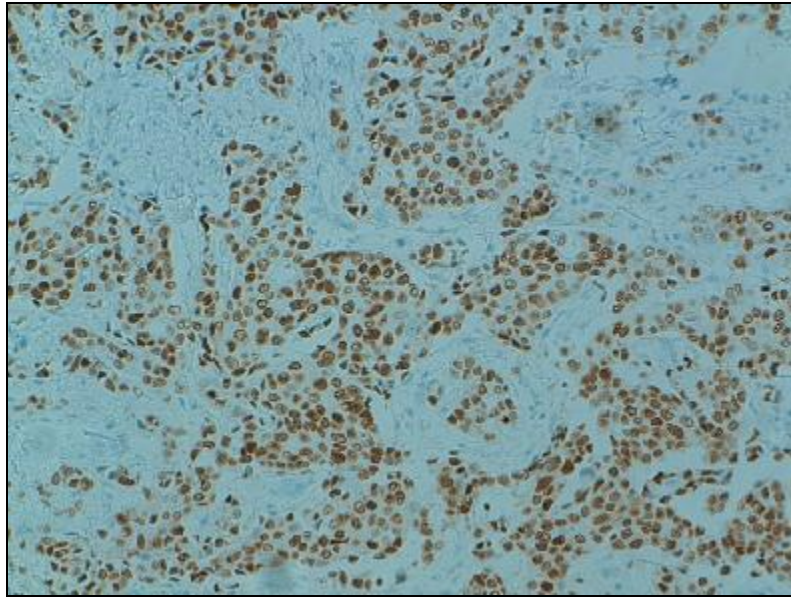


Figure 22 : PR x 200 : PR 2+ : marquage nucléaire modéré

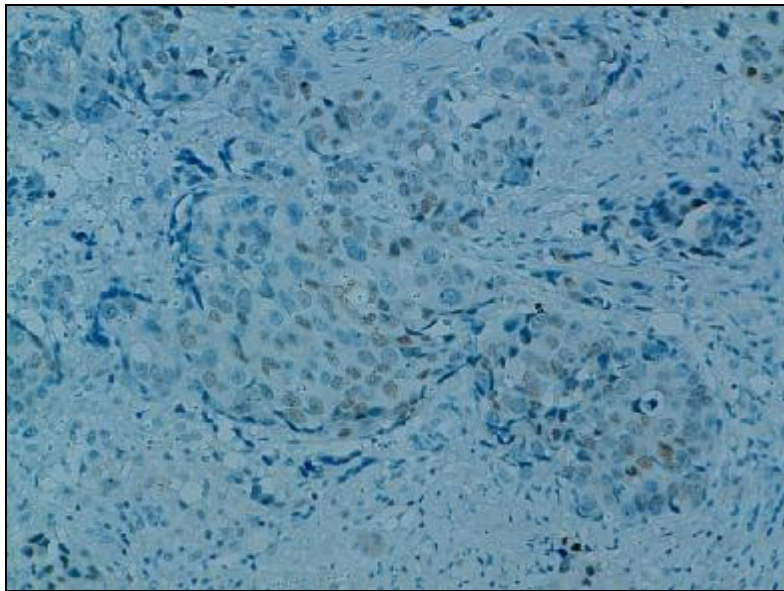


Figure 23 : PR x 200 : PR 1+ : marquage nucléaire faible

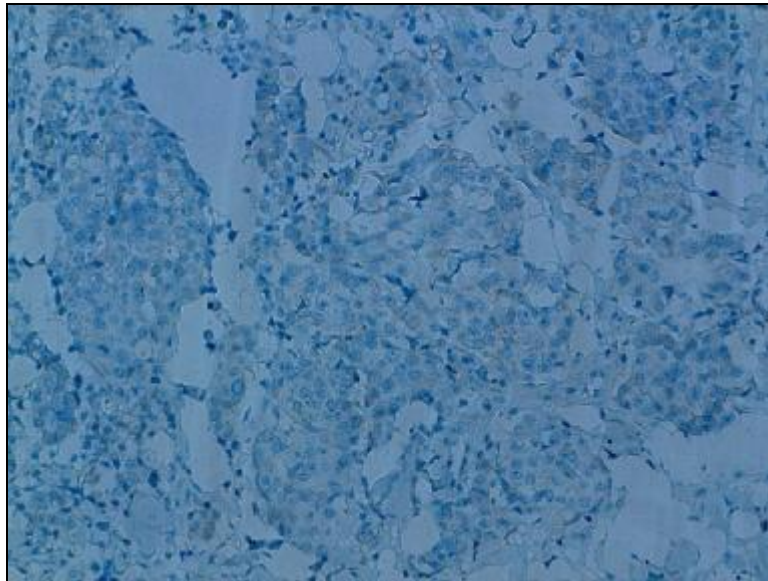


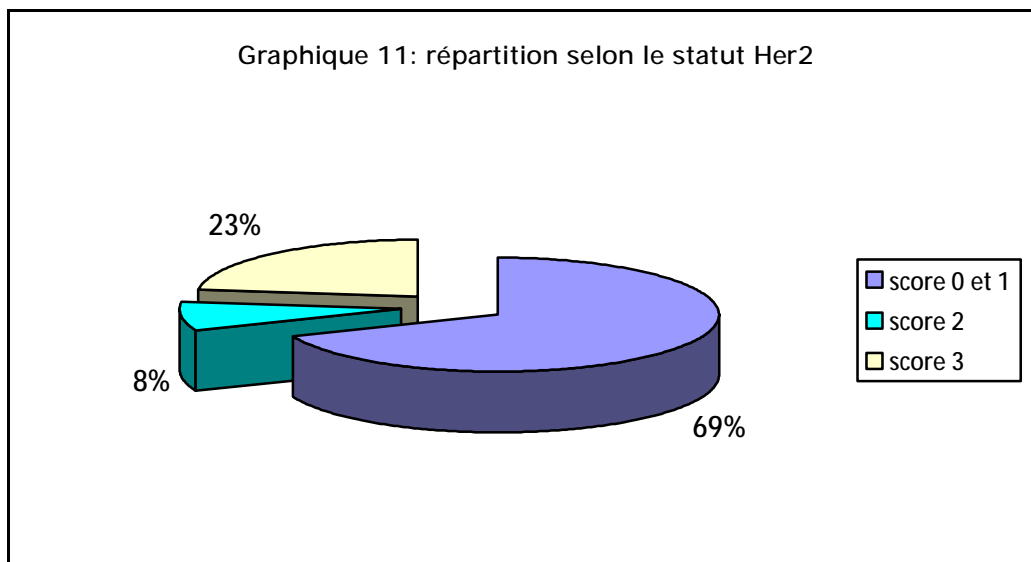
Figure 24: PR x 200 : PR négatif : absence de marquage

### 1-17-HER-2

La protéine Her2 est exprimée dans 40 cas (scores 2 et 3), soit 31% alors que l'absence de son expression (scores 0 et 1) est notée dans 90 cas, soit 69% des cas. (tableau 13, graphique 11 et figures 25, 26, 27, 28)

Tableau 13 : répartition des cas selon le statut Her2

Her2	Nombre de cas	Pourcentage
Score 0	59	45%
Score 1	31	24%
Score 2	10	8%
Score 3	30	23%
Total	130	100%



- en comparant les résultats de l'HER-2 obtenus par les deux techniques manuelle et automatisée, on remarque que l'automate a une sensibilité plus élevée. (tableau 14)

Tableau 14 : comparaison de l'expression de l'HER-2 par technique manuelle et par technique automatisée.

Her2	Manuelle	Automate
Score 0	31(49%)	28 (40,2%)
Score 1	15 (24,5%)	16 (23,8%)
Score 2	4(6,5%)	6 (9%)
Score 3	12 (20%)	18 (27%)
Total	62	68

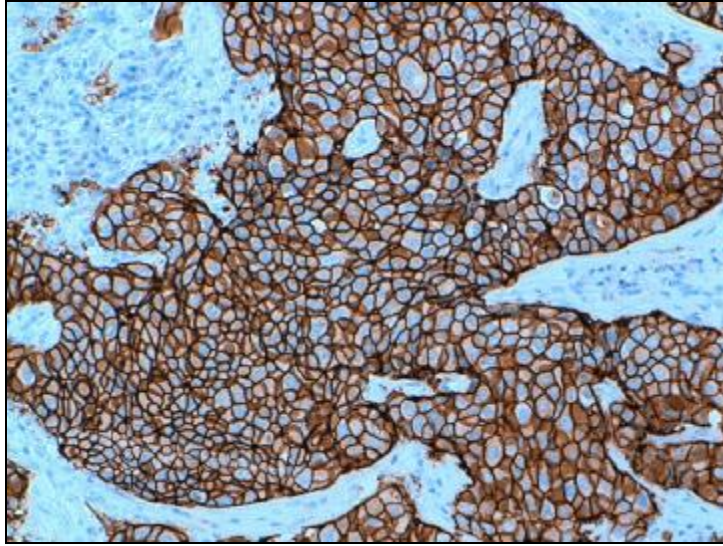


Figure 25: HER-2 x 200 : score3 : marquage membranaire intense et complet

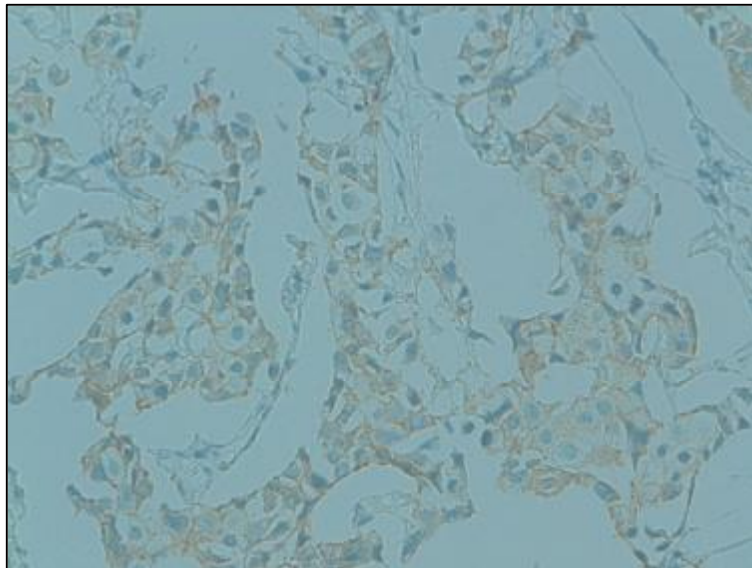


Figure 26 : HER-2 x 400 : marquage membranaire modéré et complet

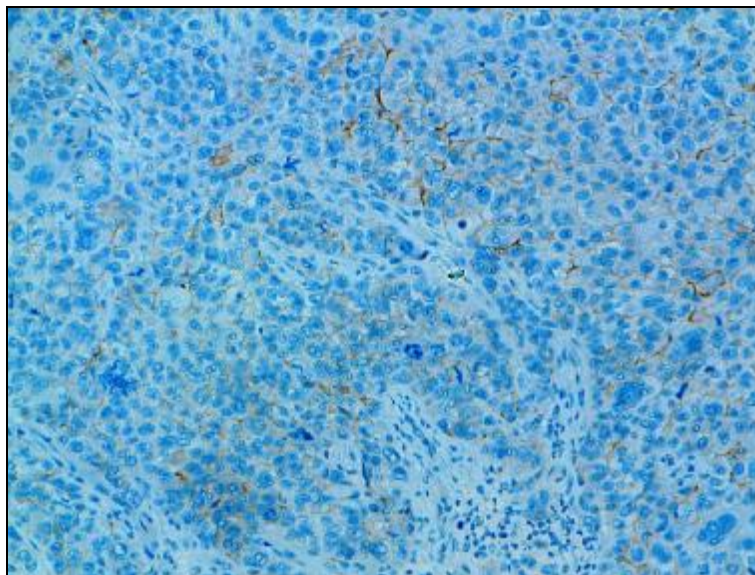


Figure 27: HER-2 x 200 : score 1 : marquage membranaire faible et incomplet de plus de 10% des cellules tumorales

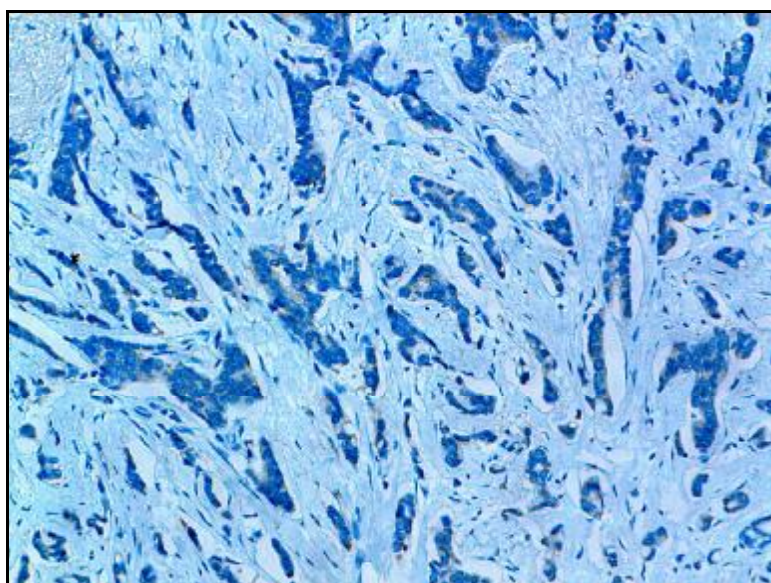


Figure 28: HER-2 x 200 : score 0 : absence de marquage

## 2-étude analytique:

### 2-1- corrélation entre l'intensité et le pourcentage du marquage des récepteurs hormonaux

L'étude de l'association entre le pourcentage et l'intensité de l'expression des RE et des PR montre une forte association avec  $p=0,0000$ .

### 2-2-étude des corrélations entre les RE et les PR

Dans notre étude, nous avons noté une association entre les RE et les PR ( $p=0,0000$ ) (tableau 15 et graphique 12).

Parmi les 83 cas exprimant les RE, 87% expriment les PR alors que seulement 44,7% des cas RE- sont PR+.

Parmi les cas exprimant les PR, 22,5% des cas n'expriment pas les RE.

Tableau 15 : corrélation entre les RE et les PR ( $p=0,0000$ )

	PR positifs n (%)	PR négatifs n (%)	Total
RE positifs	72 (77,5%)	11 (29,7%)	83
RE négatifs	21 (22,5%)	26 (70,3%)	47
Total	93 (100%)	37 (100%)	130

La comparaison de cette association entre les RE et les PR dans les cas réalisés d'une façon manuelle et ceux réalisés par automate montre une diminution du taux des cas PR positifs qui sont RE négatifs par technique automatisée par rapport à la technique manuelle. (tableaux 16 et 17)

Tableau 16 : corrélation entre les RE et les PR réalisés par technique manuelle

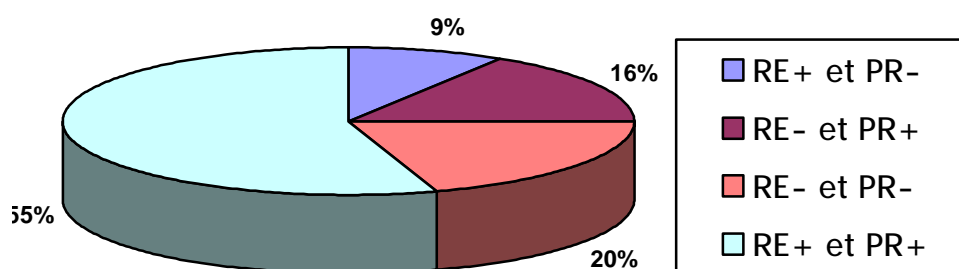
	PR positifs n (%)	PR négatifs n (%)	Total
RE positifs	53 (74,3%)	9 (70,3%)	62
RE négatifs	17 (25,7%)	20 (29,7%)	37
Total	70 (100%)	29 (100%)	99

Tableau 17 : corrélation entre les RE et les PR réalisés par automate

	PR positifs n (%)	PR négatifs n (%)	Total
RE positifs	19 (85,8%)	2 (25%)	21
RE négatifs	4 (14,2%)	6 (75%)	10
Total	23 (100%)	8 (100%)	31

Le graphique 12 montre la proportion des cas RE+/PR+, RE+/PR-, RE-/PR+ et RE-/PR-. La proportion des cas positifs pour les deux récepteurs hormonaux est de 20%.

Graphique 12 : proportion des cas RE+/PR+, RE+/PR-, RE-/PR+ et RE-/PR-.



## 2-3-étude des corrélations des récepteurs hormonaux avec les autres facteurs

### pronostiques

#### 2-3-1- corrélation avec l'âge :

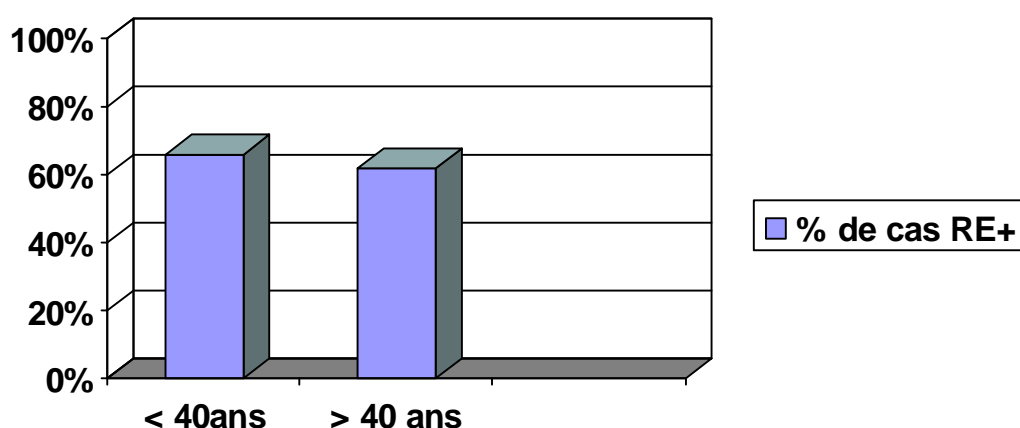
Nous avons noté une association entre les RE et l'âge avec un  $p=0,017$ , et entre les PR et l'âge avec un  $p=0,04$ .

- Le taux d'expression des RE est plus important chez les patientes de moins de 40 ans (66%) que chez celles de plus de 40 ans (62%) (tableau 18 et graphique 13).

Tableau 18 : expression des RE en fonction de l'âge

	RE positifs n (%)	RE négatif n (%)	Total
≤ 40 ans	29 (66%)	15 (44%)	44
>40 ans	54 (62%)	32 (36%)	86
Total	83(100%)	47(100%)	130

graphique 13 : taux d'expression des RE en fonction de l'âge



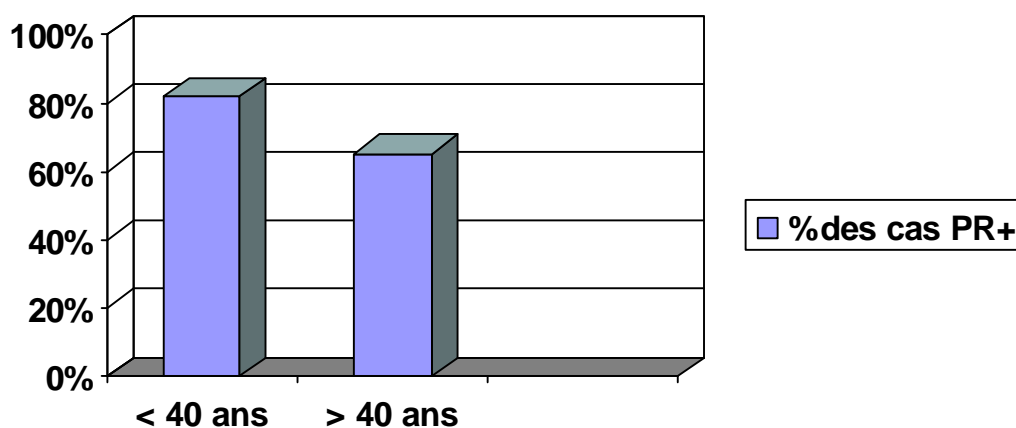
- Le taux d'expression des PR est plus important chez les patientes de moins de 40 ans (81,8%) que chez celles de plus de 40 ans (65%) (tableau 19 et graphique 14).

Tableau 19 : expression des PR en fonction de l'âge

	RP positifs n (%)	RP négatif n (%)	Total
≤ 40 ans	36 (81,8%)	8 (18,2%)	44
>40 ans	56 (65%)	17 (35%)	86
Total	93(100%)	37(100%)	130

Le graphique montre le taux d'expression des PR en fonction DE l'âge

graphique 14: taux d'expression des PR en fonction de l'âge



### 2-3-2-corrélation avec la taille tumorale

#### -corrélation avec la taille en cm :

Nous n'avons pas trouvé de lien statistique entre l'expression des RE et la taille tumorale ( $p=0,3759$ ). La taille moyenne pour les tumeurs RE positifs et les tumeurs RE négatifs est respectivement de 4,6 cm et 4,3 cm. Le taux de positivité des RE est de 42,5% pour les tumeurs de 2 à 5cm alors qu'il est uniquement de 34,5% pour les tumeurs de plus de 5cm (tableau 20).

Tableau 20 : corrélation des RE avec la taille tumorale en cm

	RO positifs	RO négatifs	Total
≤2cm	19 (23%)	7 (18,5%)	26
2-5cm	34 (42,5%)	15 (39,5%)	49
>5cm	28 (34,5%)	16 (42%)	44
Total	81	38	119

Nous n'avons pas trouvé de lien statistique entre l'expression des PR et la taille tumorale (p=0,6235).

La taille moyenne pour les tumeurs PR positifs et les tumeurs PR négatifs est respectivement de 4,4 et 4,9 cm et le pourcentage des tumeurs de plus de 5cm dans les cas PR négatifs est plus important que dans les cas PR positifs. (tableau 21)

Tableau 21 : corrélation entre les PR et la taille tumorale

	RP positifs	RP négatifs	Total
≤2cm	22(24,7%)	5 (16,6%)	26
2-5cm	35(39,3%)	13 (43,4%)	49
>5cm	(36%)	12 (40%)	44
Total	89 (100%)	30 (100%)	119

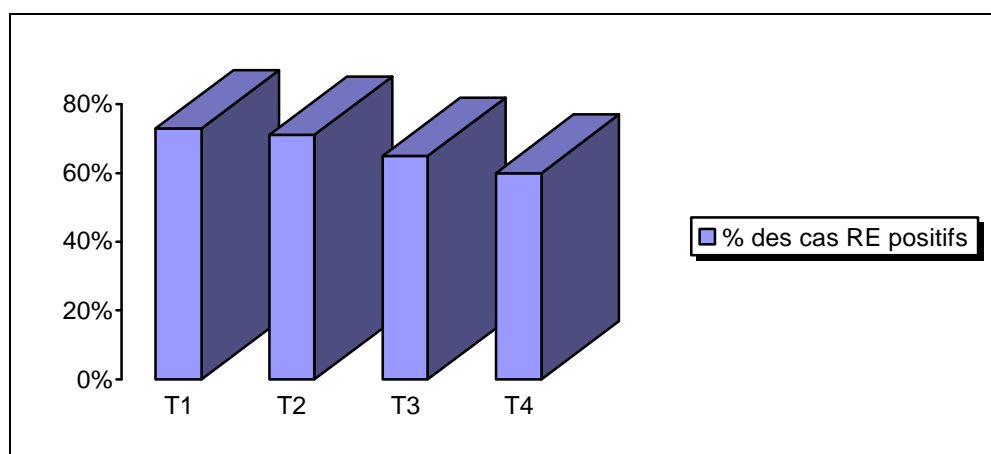
#### - Corrélation avec la taille TNM

Le pourcentage des cas RE positifs est plus important dans les stades T1 et T2 que dans les stades T3 et T4 sans association statistiquement significative (p=0,073). (tableau 22 et graphique 15)

Tableau 22 : expression des RE en fonction du stade T du TNM

	RO positifs n (%)	RO négatifs n (%)	Total
T1	16 (73%)	6 (27%)	22 (100%)
T2	25 (71%)	10 (29%)	35 (100%)
T3	12 (65%)	6 (35%)	18 (100%)
T4	28 (60%)	18 (40%)	46 (100%)
Total	70	40	121

Graphique 15 : taux d'expression des RE en fonction du stade T du TNM

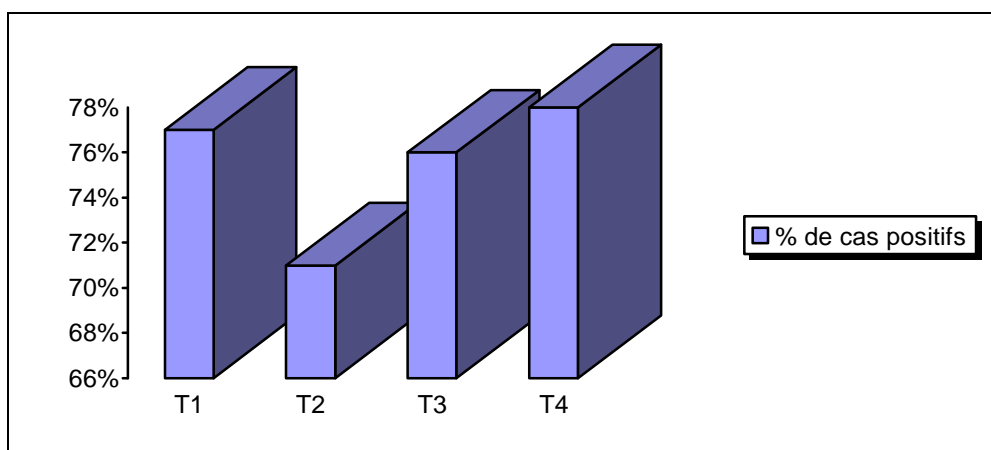


Le PR par contre, est statistiquement associé à la taille TNM avec un p significatif de 0,038. (tableau 23 et graphique16).

Tableau 23 : expression des PR en fonction du stade T du TNM

	RP positifs n (%)	RP négatifs n (%)	Total
T1	17 (18,7%)	5 (17%)	22
T2	25 (27,5%)	10 (34,5%)	35
T3	14 (15,3%)	4 (14%)	18
T4	36 (38,5%)	10 (34,5%)	46
Total	91(100%)	29(100%)	120

Graphique 16 : expression des PR en fonction du stade T du TNM



### 2-3-3-corrélation avec le type histologique

En subdivisant les différents types de tumeurs en CCI et non CCI, nous avons noté une association entre l'expression des RE et des PR d'une part et le type histologique d'autre part avec une valeur de  $p=0,0000$  pour les deux. Le taux d'expression des deux récepteurs est élevé dans le CCI et le CLI. (tableau 24 et 25, graphique 17 et 18).

Tableau 24 : expression des RE par les différents types histologiques

	RO positifs n (%)	RO négatifs n (%)	Total
CCI	75 (67%)	37 (33%)	112
CLI	5 (71,5%)	2 (28,5%)	7
C. métaplasique	1 (17%)	5 (83%)	6
C. papillaire infiltrant	1 (50%)	1 (50%)	2
C. médullaire	0 (0%)	1 (100%)	1
C. apocrine	0 (0%)	1 (100%)	1
C. peu indifférencié	1 (100%)	0 (0%)	1
<b>Total</b>	<b>83</b>	<b>47</b>	<b>130</b>

Graphique 17 : taux d'expression des RE par les différents types histologiques

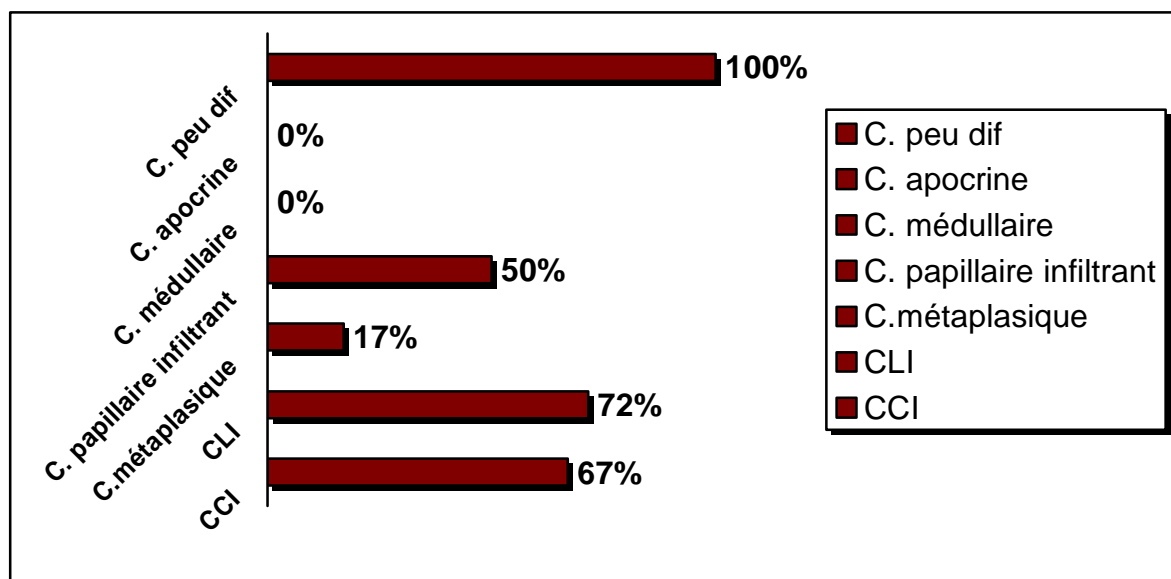
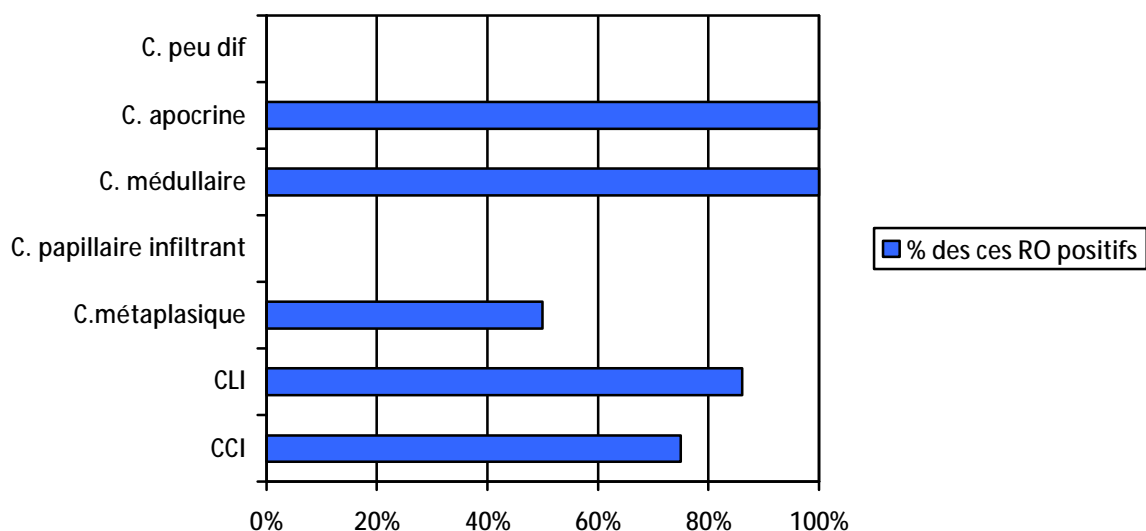


Tableau 25 expression des PR par les différents types histologiques

	RP positifs n (%)	RP négatifs n (%)	Total
CCI	84 (75%)	28 (25%)	112
CLI	6 (86%)	1 (14%)	7
C. métaplasique	3 (50%)	3 (50%)	6
C. papillaire infiltrant	0 (0%)	2(100%)	2
C. médullaire	1 (100%)	0 (0%)	1
C. apocrine	1 (100%)	0 (0%)	1
C. peu indifférencié	0 (0%)	1 (100%)	1
<b>Total</b>	<b>83</b>	<b>47</b>	<b>130</b>

Graphique 18 : taux d'expression des PR par les différents types histologiques



2-3-4-corrélation avec le grade SBR :

Les tumeurs de grade III de SBR expriment les récepteurs oestrogéniques dans 50 % des cas et les récepteurs progestéroniques dans 55% des cas.

Le taux d'expression des RE est plus importante dans le grade I que dans le grade III.

L'expression des PR diminue avec l'augmentation du grade SBR (tableaux 26 et 27 et graphiques 19 et 20).

La valeur de p est significative pour les PR où elle est de 0,005. Elle est, par contre non significative pour les RE où p=0,233.

Tableau 26 : expression des RE et des PR selon le grade SBR.

	RO positif	RO négatif	Total
Grade I	11 (69%)	5(31%)	16 (100%)
Grade II	53 (69,7%)	23 (30,3%)	76 (100%)
Grade III	18 (50%)	18 (50%)	36 (100%)
Total	82	46	128

Graphique 19 : évolution de l'expression des RE selon le grade SBR

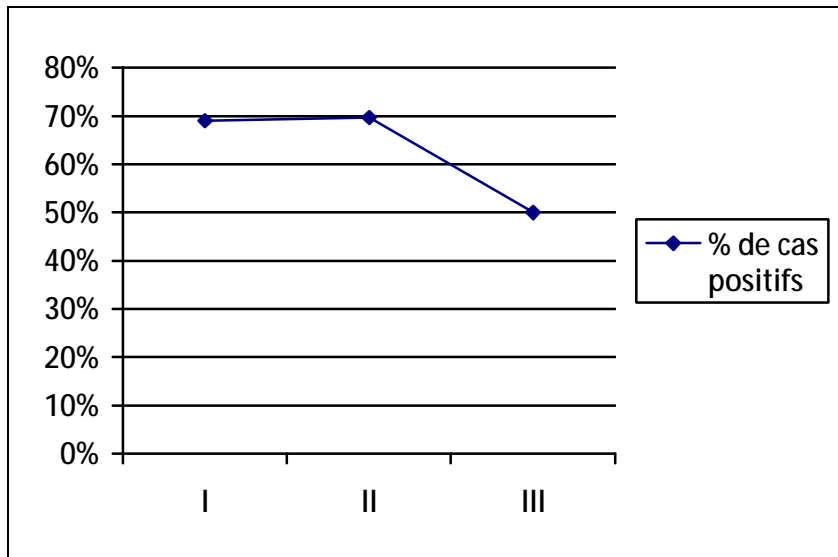
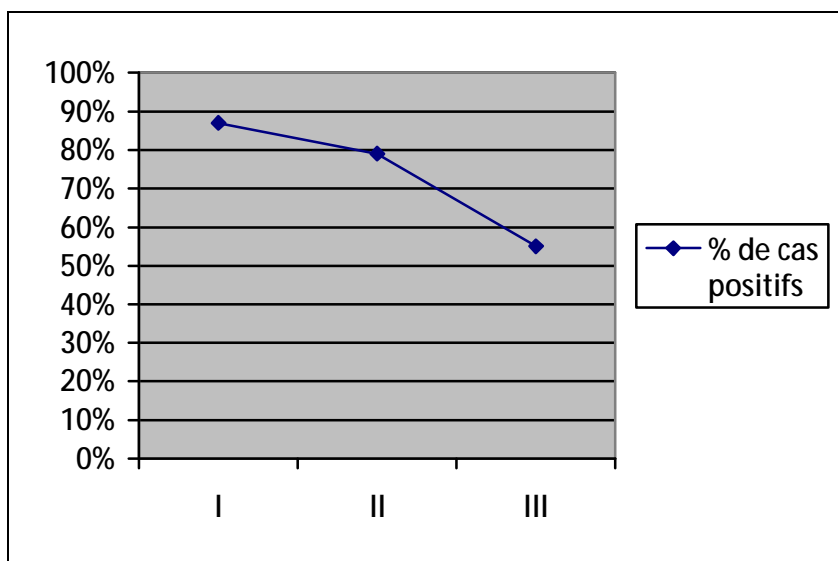


Tableau 27 : expression des PR selon le grade SBR.

	RP positif	RP négatif	Total
Grade I	14 (87%)	2(13%)	16(100%)
Grade II	60 (79%)	16(21%)	76 (100%)
Grade III	20(55%)	16 (45%)	36 (100%)
Total	94	34	128

Graphique 20 : évolution de l'expression des RP selon le grade SBR



### 2-3-5-corrélation avec l'état des ganglions

Pour les tumeurs sans métastases ganglionnaires, 69% expriment les RE et 73% expriment les PR.

Pour les tumeurs avec métastases ganglionnaires, 67% expriment les RE et 76% expriment les PR. (tableaux 28 et 29).

La valeur de p est de 0,047 pour les RE. Elle est significative, donc il y a une corrélation entre les RE et le statut ganglionnaire.

Pour les PR, la valeur de p est de 0,163. Elle n'est pas significative, donc on n'a pas une association entre les PR et le statut ganglionnaire.

Tableau 28 : expression des RE selon le statut ganglionnaire.

Statut ganglionnaire	RE positifs n (%)	RE négatifs n (%)	Total
NO	31 (40%)	14 (38%)	45
N+	47 (60%)	23 (62%)	70
Total	78 (100%)	37 (100%)	115

Tableau 29 : expression des PR selon le statut ganglionnaire.

Statut ganglionnaire	PR positifs n (%)	PR négatifs n (%)	Total
NO	33 (38%)	12 (41,5%)	45
N+	53 (62%)	17 (58,5%)	70
Total	86 (100%)	29 (100%)	115

### 2-3-6-corrélation avec la présence de métastases à distance

Pour les tumeurs sans métastases à distance, 72% expriment les RE et 76,7% expriment les PR.

Pour les tumeurs avec métastases à distance, 38,5% expriment les RE et 69,2% expriment les PR. (tableau 30 et 31)

La valeur de p est de 0,006 pour les RE. Elle est significative, donc il y a une corrélation entre les RE et la survenue de métastases à distance.

Pour les PR, la valeur de p est de 0,155. Donc il n'y a pas de corrélation entre l'expression des PR et la survenue de métastases à distance.

Tableau 30 : expression des RE selon le statut métastatique

Statut métastatique	RE positifs n (%)	RE négatifs n (%)	Total
M0	64(92,7%)	25 (75,7%)	89
M+	5 (7,3%)	8 (24,3%)	13
Total	69 (100%)	33 (100%)	102

Tableau 31 : expression des PR selon le statut métastatique.

Statut métastatique	PR positifs n (%)	PR négatifs n (%)	Total
M0	68 (88,3%)	21(84%)	89
M+	9(11,7%)	4 (16%)	13
Total	77(100%)	25 (100%)	102

### 2-3-7-corrélation avec la présence d'embols vasculaires

Parmi les cas qui expriment les RE, des embols vasculaires sont notés dans 51,8% des cas.

Parmi les cas qui expriment les PR, des embols vasculaires sont notés dans 50% des cas. (tableau 32 et 33 et graphique 21)

Nous avons noté une association entre l'expression des RE et la présence d'embols vasculaires ( $p=0,044$ ), par contre, cette association n'a pas été notée entre l'expression du PR et la présence d'embols vasculaire ( $p= 1,125$ )

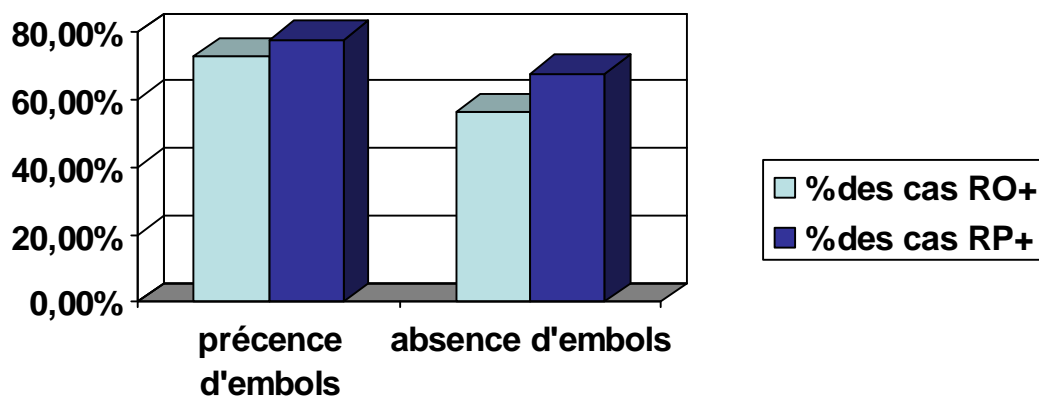
Tableau 32 : corrélation entre les RE et la présence d'embols vasculaires

	RE positifs n (%)	RE négatifs n (%)	Total
Présence d'embols	43 (51,8%)	16 (34%)	59
Absence d'embols	40 (48,2%)	31 (66%)	71
Total	83 (100%)	47 (100%)	130

Tableau 33 : corrélation entre les PR et les embols vasculaires

	RP positifs n (%)	RP négatifs n (%)	Total
Présence d'embols	46 (49%)	13 (36%)	59
Absence d'embols	48 (51%)	23 (64%)	71
Total	94	36	130

graphique 21: corrélation entre les RH et les embols vasculaires



## 2-4- Etude des corrélations de l'Her2 avec les autres facteurs pronostiques

### 2-4-1- corrélation avec l'âge :

Nous avons subdivisé notre population en 2 sous-populations en fonction de l'âge moins de 40 ans et plus de 40 ans.

Nous n'avons pas noté de corrélation entre le statut Her2 et l'âge avec un  $p=0,399$  mais nous avons noté que la moyenne d'âge chez les patientes exprimant

l'HER-2 est de 46ans alors qu'elle est de 49 ans chez les patientes qui ne l'expriment pas. (tableau 34)

Tableau 34 : corrélation entre l'HER-2 et l'âge (p=0,399)

<i>Her2</i>	<i>Score 0 et 1</i>	<i>Score 2</i>	<i>Score 3</i>	Total
≤40 ans	28 (63,6%)	3 (6,8%)	13 (29,5%)	44 (100%)
> 40 ans	62 (72,3%)	7 (7,5%)	17 (20,2%)	86 (100%)
Total	90	10	30	130

#### 2-4-2-corrélation avec la taille tumorale

##### -corrélation avec la taille en cm :

La taille moyenne des tumeurs qui n'expriment pas la protéine Her2 est de 4,1cm, alors qu'elle est de 4,6 pour les cas équivoques (score 2) et de 5,4cm pour les cas surexprimant l'HER-2.

Nous n'avons pas trouvé de lien statistique entre l'expression de l'Her2 et la taille tumorale. p =0,1058 (tableau 35)

Tableau 35 : expression de l'Her2 en fonction de la taille tumorale

Taille tumorale (cm)	Her2 (0+et 1+) n (%)	Her2 (2+) n (%)	Her2 (3+) n (%)	Total
≤2	18 (22%)	1 (11%)	6 (20,5%)	25
2-5	35 (43%)	4 (44,5%)	9 (31%)	48
>5	28 (35%)	4 (44,5%)	14 (48,5%)	46
Total	81 (100%)	9 (100%)	29 (100%)	119

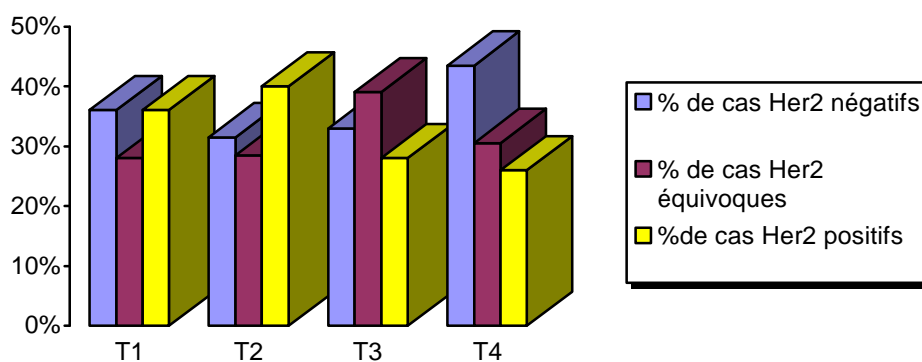
### - corrélation avec la taille TNM

Nous n'avons pas noté d'association statistique entre le stade T du TNM et l'expression de l'Her2 ( $p=0,290$ ). (tableau 36 et graphique 22)

Tableau 36 : corrélation entre l'expression de l'HER2 et le stade T ( $p=0,290$ )

	Her 2 négatif (0et1+) n (%)	Her2 2+	Her2 3+ n (%)	Total
T1	8 (36%)	6 (28%)	8 (36%)	22(100%)
T2	11 (31,5%)	10 (28,5%)	14 (40%)	35 (100%)
T3	6 (33%)	7 (39%)	5 (28%)	18 (100%)
T4	20 (43,5%)	14 (30,5)	12 (26%)	46 (100%)
Total	46	37	38	121

Graphique 22 : expression de l'HER-2 en fonction du stade T



### 2-4-3-corrélation avec le type histologique

Une corrélation entre le statut Her2 et le type histologique a été notée avec un  $p=0,049$ . (tableau 37).

Tableau 37 : expression de l'Her2 en fonction du type histologique.

Type histologique	Her2 (0+et 1+) n (%)	Her2 (2+) n (%)	Her2 (3+) n (%)	Total
CCI	76 (67,5%)	8 (7,2%)	28 (25,3%)	112 (100%)
CLI	5 (71%)	0 (0%)	2 (29%)	7 (100%)
C. métaplasique	5 (83,3%)	1 (16,7%)	0	6 (100%)
C. papillaire infiltrant	2	0	0	2
C. médullaire	1	0	0	1
C. apocrine	1	0	0	1
C. peu différencié	0	1	0	1
Total	90	10	30	130

2-4-4-corrélation avec le grade SBR :

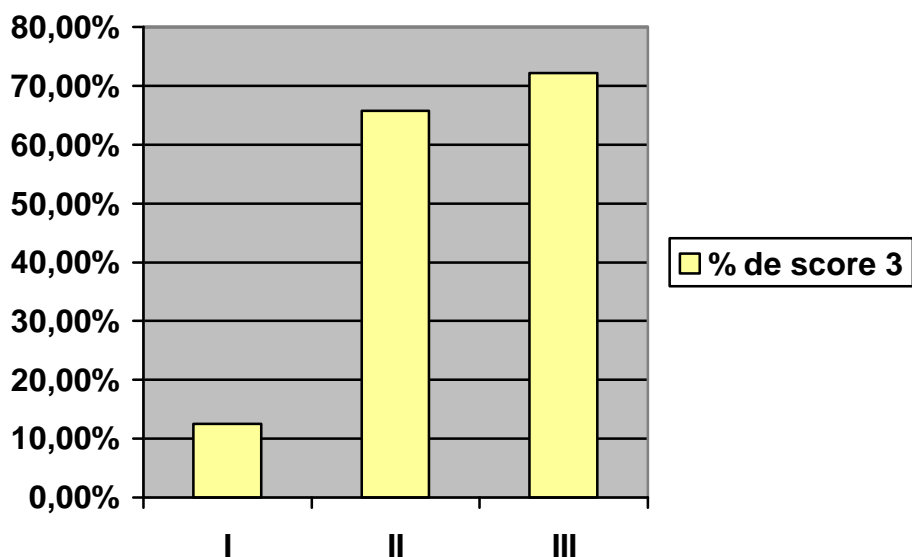
Nous avons noté que 81% des tumeurs de grade I n'expriment pas l'Her2, ce taux est de 66% dans les tumeurs de grade II et de 72% dans les tumeurs de grade III.

Nous n'avons pas noté d'association statistique entre le statut Her2 et le grade SBR ( $p=0,182$ ). Cependant seuls 7% des cas surexprimant l'HER-2 sont de grade I. (tableau 38 et graphique 23)

Tableau 38 : expression de l'Her2 en fonction du grade SBR.

Grade SBR	Her2 (0+et 1+) n (%)	Her2 (2+) n (%)	Her2 (3+) N (%)	Total
I	13 (14,5%)	1 (10%)	2 (7%)	16
II	50 (56%)	4 (40%)	22 (76%)	76
III	26 (29,5%)	5 (50%)	5 (17%)	36
Total	89 (100%)	10 (100%)	29(100%)	128

Graphique 23 : expression de l'HER2 selon le grade SBR



#### 2-4-5-corrélation avec l'état des ganglions

Pour les tumeurs sans métastases ganglionnaires, 69% n'expriment pas l'Her2 (score 0 et 1).

Pour les tumeurs avec métastases ganglionnaires, 68,5% n'expriment l'Her2 (score 2 et 3).

(Tableau 15).

La valeur de p est de 0,529. Elle n'est pas significative, donc il n'y a pas d'association entre la surexpression de l'Her2 et le statut ganglionnaire.

Tableau 39 : expression de l'Her2 selon le statut ganglionnaire (p=0,529)

Statut ganglionnaire	Her2 négatif (0+ et 1+) n (%)	Her2 positif (2+) n (%)	Her2 positif (3+) N (%)	Total
N0	31 (39%)	2 (22%)	12 (44,5%)	45
N	48 (61%)	7 (78%)	15 (55,5%)	70
-N1	- 25 (52%)	- 4 (57%)	- 9 (60%)	38
-N2	- 21 (43,7%)	- 2 (28,5%)	- 5 (33,3%)	28
-N3	- 2 (4,3%)	- 1 (24,5%)	- 1 (6,7%)	4
Total	79(100%)	9(100%)	27 (100%)	115

#### 2-4-6- corrélation avec la présence de métastases à distance (tableau 40).

Pour les tumeurs sans métastases à distance, 28 % expriment l'Her2 (score 2 et 3).

Pour les tumeurs avec métastases à distance, 25% expriment l'Her2 (score 2 et 3).

Parmi les tumeurs qui n'expriment pas l'Her2, 88% ne présentent pas de métastases à distance, ce taux est de 83,5% pour les tumeurs exprimant faiblement l'Her2 (score 2) et il est de 87% pour les tumeurs exprimant fortement l'Her2 (score 3).

La valeur de p est de 0,336. Elle n'est pas significative, donc il n'y a pas une corrélation entre l'expression de l'Her2 et la présence de métastases à distance.

Tableau 40 : expression de l'Her2 selon la présence de métastases à distance

p=0,336.

Métastases à distance	Her2 négatif (0+ et 1+) n (%)	Her2 positif (2+) n (%)	Her2 positif (3+) N (%)	Total
M0	66 (72%)	5 (5,4%)	20 (22,6%)	91 (100%)
M1	9 (69, 3%)	1 (7,7%)	3 (23%)	13 (100%)
Total	75	6	23	104 (100%)

#### 2-4-7-corrélation avec la présence d'embols vasculaires

Il n'a pas été de corrélation entre l'expression de l'HER2 et la présence d'embols vasculaires (p=0,65). (tableau 41)

Tableau 41 : corrélation entre l'expression de l'HER2 et la présence d'embols.

	g	HER2 score 2	HER2 score 3	Total
Présence d'embols	44 (49,4%)	4 (40%)	11 (36,6%)	59
Absence d'embols	46 (50,6%)	6 (60%)	19 (63,4%)	71
total	90	10	30	130

### 2-5-Corrélation entre les RE et l'HER2

Le pourcentage des cas HER-2 négatifs dans les cas RE positifs est de 74,4% alors qu'il est de 59,5% pour les cas RE négatifs. La valeur de p est significative. Elle est de 0,000. Donc, l'expression des RE et l'expression de l'HER-2 sont associées entre elles. En effet, les  $\frac{3}{4}$  des cas RE+ n'expriment pas l'HER2 et au moins le  $\frac{1}{3}$  des RE négatifs expriment l'HER-2. (tableau 42)

Tableau 42 : corrélation entre les RE et l'HER-2 (p=0,000)

	HER2 score 0/1	HER2 score 2	HER2 score 3	Total
RO +	62 (74,4%)	6 (7,3%)	15 (18,3%)	83
RO-	28 (59,5%)	4 (8,5%)	15 (32%)	47
Total	90	10	30	130

# DISCUSSION

## I- évaluation des récepteurs hormonaux en pratique anatomo-pathologique:

L'évaluation des récepteurs hormonaux se fait par plusieurs techniques, mais l'étude immunohistochimique reste la méthode de choix en raison de ses avantages multiples.

### 1-avantages et inconvénients de l'immunohistochimie [17] [43] [87] [88]

La technique immunohistochimique a plusieurs avantages :

- elle permet de s'assurer que la tranche de section comporte du carcinome invasif ce qui permet d'éviter les faux positifs et les faux négatifs.
- elle peut être réalisée à partir de prélèvements cytologiques, de tissus congelés ou fixés en paraffine.
- elle permet de travailler sur de petits fragments.
- Il est possible de renouveler l'analyse sans disposer d'un nouveau prélèvement.
- son coût est plus faible.
- Sa réalisation pratique est plus simple et permet l'analyse simultanée de nombreux échantillons.
- C'est une technique utilisable en routine.
- Il existe une possibilité d'archivage et de consultation ultérieure.
- Il existe des témoins internes permettant de s'assurer de la qualité de la technique.

Cependant, cette technique a certains inconvénients :

- l'absence d'une méthode standardisée.
- le manque d'une expression quantitative objective du récepteur.

- la reproductibilité de la coloration immunohistochimique est parfois critiquée.
- les variations du seuil de positivité entre les laboratoires.
- Le contrôle de qualité n'est pas encore généralisé.
- la validation clinique de la technique n'est pas actuellement terminée.

## 2-règles d'interprétation

### 2-1-Choix des témoins

Le choix des témoins est indispensable pour s'assurer de la qualité de la technique immunohistochimique. Ces témoins peuvent être internes ou externes.

#### - Témoins internes (glandes non tumorales)

Les RE et les PR sont exprimés par le tissu mammaire normal et représentent un bon témoin interne positif [46]. Chaque fois que cela est possible, il faut choisir un fragment de tumeur où il persiste des structures bénignes de façon à disposer pour chaque tumeur d'un témoin interne intégré. C'est le marquage de ce témoin qui permettra de valider la technique en cas de négativité de la composante carcinomateuse infiltrante [89].

Parfois une analyse peut trouver un témoin négatif, des problèmes techniques sont suspectés, mais ça peut être dû à des variations physiologiques (l'âge de la patiente doit être pris en considération étant donné que les niveaux d'expression chez les femmes en préménopause peuvent être très bas).

La fréquence de positivité est plus élevée dans les cancers invasifs de grade I, donc si le marquage est faible ou absent, il faut refaire l'examen [43] [46].

#### - Témoins externes

Chaque test doit comporter un contrôle représenté par un cas fortement positif, un cas faiblement-modérément positif et un cas négatif. Ces cas peuvent être regroupés dans un seul bloc. Ce témoin externe doit toujours être le même. Il

permet d'apprécier, sur plusieurs semaines, la variation de l'intensité du marquage de façon à homogénéiser la technique d'immunomarquage d'un jour à l'autre [43] [46] [89].

Si les lames témoins sont préparées à l'avance, elles doivent être utilisées dans les deux mois car, au-delà, leur réactivité devient aléatoire. Le stockage des blocs témoins ne nécessite pas de conditions particulières.

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. [43]

#### 2-2-Règles générales : [43] [49]

- L'appréciation du marquage doit se faire sur l'ensemble de la lame.
- On étudie la composante carcinomateuse infiltrante sur l'ensemble d'une section de la tumeur.
- Seul le marquage nucléaire est pris en compte. Ce marquage 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 intense et étendu, il est recommandé de recommencer la technique et, si cette prédominance persiste, de formuler les résultats avec réserve.
- L'analyse des marquages doit aboutir à déterminer le pourcentage de cellules carcinomateuses infiltrantes positives par rapport à l'ensemble des cellules carcinomateuses (positives et négatives). Le résultat s'exprime en

pourcentage de cellules arrondi à la dizaine, et en intensité moyenne de 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.
- Le seuil de positivité des RE et des PR est fixé à 10% de cellules positives quelle que soit l'intensité du marquage. Le choix de ce seuil est justifié par les arguments suivants :
- Il a été utilisé par plusieurs études avec corrélation clinique.
  - il est pratiquement équivalent à d'autres seuils utilisés (positivité à partir d'une cellule marquée ou de 5 % de cellules marquées) ;
  - il constitue un paramètre relativement reproductible.

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. Plusieurs systèmes de score ont été décrits dans la littérature, tel le Quick Score. Ils sont souvent bien corrélés entre eux et avec la biochimie et peuvent donner des indications quant à la probabilité de réponse à l'hormonothérapie. L'utilisation de ce score est possible si ce paramètre a été validé par le laboratoire à partir d'études corrélatives avec la biochimie ou avec la clinique.

En cas de négativité totale des cellules tumorales infiltrantes, le résultat ne sera interprétable que si l'on retrouve sur la section de tumeur des cellules positives dans les canaux ou les lobules bénins ou dans du CIC ou du CLIS.

### 3-assurance de qualité [43] [89] [90]

La fiabilité de la technique dans chaque laboratoire doit reposer sur des règles de bonnes pratiques techniques. Elle est conditionnée, en particulier, par l'observation d'un protocole optimisé et par une utilisation rigoureuse des témoins internes et externes. Il faut que le laboratoire utilisant la méthode de détection immunohistochimique des récepteurs hormonaux participe à un programme d'assurance qualité en IHC (AFAQAP-IHC, UK-NEQAS-ICC).

Dans notre service, nous utilisons la méthode immunohistochimique pour l'évaluation des récepteurs hormonaux en raison de ses avantages multiples. Dans la technique manuelle, nous avons utilisé le clone 1D5 pour l'évaluation des RE et le clone 10A9 pour l'évaluation des PR avec une dilution de 1/2. Dans la technique automatisée, nous avons utilisé l'automate BENCHMARK® LT Ventana 750. Les anticorps utilisés sont les anticorps monoclonaux primaires du lapin SP1 pour les RE et 1 E2 pour les PR. Nous avons utilisé systématiquement des témoins internes en choisissant des blocs comportant la tumeur et le tissu mammaire normal et des témoins externes. Nous n'avons pas hésité à refaire la technique chaque fois que nous avons un problème du marquage de ces témoins. Concernant l'interprétation, nous avons utilisé la valeur seuil de 10% et le résultat a été formulé en pourcentage et en intensité du marquage.

## II- intérêt des récepteurs hormonaux en clinique

### 1-intérêt thérapeutique des récepteurs hormonaux :

Dans les cancers mammaires, la détection des RH joue un rôle capital dans le choix du traitement et la valeur des récepteurs hormonaux dans la prédiction de l'hormonosensibilité des tumeurs ne fait plus aucun doute actuellement [8]. De très nombreuses études, réalisées sur des séries importantes de patientes, ont mis en évidence d'une part l'étroite corrélation entre la présence de récepteurs hormonaux et la réponse à l'hormonothérapie anti-oestrogénique, d'autre part, la durée de réponse à ces thérapeutiques est corrélée au taux des récepteurs [17].

En effet, on note une diminution de 20% des taux de rechutes métastatiques et de mortalité chez des patientes RE + recevant une hormonothérapie adjuvante et un taux global de réponse clinique de 60% chez des patientes RE+ avec diffusion métastatique [89]. Quand à la valeur prédictive de réponse à l'hormonothérapie des RP, on peut noter que les tumeurs métastatiques RE+ PR+ répondent mieux au traitement par les anti-oestrogènes que les tumeurs métastatiques RE+ PR- [91].

La valeur prédictive des RE pour la réponse à la chimiothérapie adjuvante ou néoadjuvante est plus controversée. Les taux de réponse clinique à la chimiothérapie seraient plus importants chez les patientes RE-, non ménopausées, en situation adjuvante et chez les patientes RE- en situation néoadjuvante. Ceci peut être partiellement expliqué par un taux de prolifération plus élevé dans les tumeurs RE-. Ces résultats n'ont pas été retrouvés par d'autres auteurs. [89][92]

Les PR pourraient avoir une valeur pronostique plus forte que les RE, mais ceci est essentiellement observé dans les séries cliniques où les patientes ont été traitées par chimiothérapie adjuvante. D'autres études ne trouvent aucun intérêt prédictif des PR. [93] [94]

## 2- intérêt pronostique des récepteurs hormonaux

La valeur pronostique indépendante des récepteurs hormonaux est diversement appréciée dans la littérature. [89] La valeur du statut RE comme un facteur pronostique indépendant est diminuée par son association avec d'autres indicateurs de bon pronostic comme un âge avancé, un faible grade. En plus, les patientes RE+ bénéficient de l'hormonothérapie ce qui rend l'évaluation de la valeur pronostique des RE sans influence de l'hormonothérapie difficile [87].

Les PR pourraient avoir une valeur pronostique plus forte que les RE [89]. Il est admis que les patientes dont la tumeur exprime les récepteurs à la progestérone ont un meilleur pronostic que les autres. La valeur du récepteur aux oestrogènes est moins importante. Il s'agit probablement plus d'un marqueur de la vitesse de croissance de la tumeur, que du risque métastatique [8].

En raison de la valeur pronostique et prédictive des RH d'une part, et vu l'intérêt de l'évaluation de la technique immunohistochimique d'autre part, nous avons évalué l'expression des RH chez toutes les patientes présentant un carcinome mammaire.

### Ø expression des RE (tableau 43)

64% de nos patientes expriment les RE ce qui rejoint le taux de 60-70% décrit dans la littérature [95] [96]. Ce résultat semble également proche des résultats obtenus dans plusieurs études dont les études françaises de A.Vincent-Salomon et al. (68%) [70], et de M.O.Villain (70%) [7], l'étude de P. Broett qui porte sur des patientes présentant un cancer du sein et qui n'ont reçu aucune hormonothérapie ou chimiothérapie adjuvante et qui trouve une positivité des RE dans 69% des cas [94] et l'étude américaine d'Anderson WF et al [97]. Ce taux reste par contre élevé par rapport à certaines études arabes dont l'étude jordanienne de N.M. Almasri et al.

qui trouve un taux de positivité de seulement 53% [6], l'étude tunisienne de L. Ayadi et al. (59,4%) [98], et à une étude chinoise [99] et une étude nigérienne. [100]

#### Ø Expression des PR (tableau 43)

Dans notre série, le taux de positivité des PR est de 71%, ce taux est un peu plus élevé que celui décrit dans la littérature (60-70%) [70] [94] [101]. D'autres études trouvent des taux de positivité beaucoup plus bas [98].

La technique automatisée a permis la diminution du taux d'expression (71,4% pour la technique manuelle et 70% pour la technique automatisée).

#### Ø Corrélation entre l'intensité et le pourcentage des RH

Peu d'études se sont intéressées à l'étude des corrélations entre l'intensité et le pourcentage d'expression des RE et des PR. Dans notre série, ces deux paramètres sont corrélés entre eux ce qui rejoint le résultat obtenu par Aubriot [88]

#### Ø corrélations RE/PR (tableau 43)

Dans notre étude, nous avons noté une corrélation entre les RE et les PR. Ceci rejoint le résultat de plusieurs études [6] [98].

Parmi les cas PR+, 22,5% sont RE-. Ce taux est plus élevé que le taux de 5% recommandé dans la littérature [15]. En utilisant la PCR, ce résultat est plus rare (0.2%) [15]. Cette différence d'expression entre l'IHC et la PCR peut au moins être partiellement attribuée aux points faibles de la méthode d'IHC. Dans ces cas RE-/PR+, l'expression de P.R. peut être conduite, pas par l'ER, mais par l'interférence avec des voies de récepteurs de facteur de croissance [15]. Historiquement, l'analyse de P.R. a été effectuée afin d'évaluer l'intégrité de la voie d'ER quand la tumeur est rapportée comme RE négative [87]. En effet, l'expression du PR est fortement dépendante de l'expression des RE et elle est rarement observée dans les tumeurs

RE négatives [92]. La biologie des tumeurs ER-négative/PR-positive est mal comprise.

En comparant les résultats obtenus par automate et ceux obtenus par technique manuelle, on remarque une diminution de ce taux de 27,5% par technique manuelle à 14,2% par automate.

Dans notre série, ce taux élevé peut être lié au clone utilisé dans la technique manuelle et qui est peu étudié dans la littérature ou a une sensibilité trop importante au démasquage antigénique.

Le taux obtenu par automate est par contre plus faible que celui obtenu par d'autres auteurs comme L. Ayadi et al. (18,3%) [98]

En pratique, nous recommandons une prise en compte plus importante des RE+ que des PR+ dans le choix thérapeutique vu que l'intérêt des PR dans le choix d'un traitement hormonal est encore controversé [23].

Le pourcentage des cas RE- et PR- dans notre série est de 20%. Ce résultat est superposable à celui décrit dans certaines études [101] mais plus faible que celui obtenu par d'autres [102].

Tableau 43 : comparaison de l'expression des RE, des PR et corrélation entre les deux dans notre étude et dans la littérature.

	% RE positifs	PR positifs	RE+/PR+	RE-/PR-	RE+/PR-	RE-/PR+
Notre série	64%	71%	55%	20%	9%	16%
N.M.Almasri [6]	51,6%	50,5%	39,5%	35%		
L.Ayadi [98]	59,4%	52,3%	43,8%	32,2%	14,8%	8,2%
B.V.Offersen [103]	71%					
J.A.Rusiecki et al. [102]			33%	34%	20%	13%

Ø corrélations des RH avec les autres facteurs pronostiques

- L'âge constitue un facteur pronostique aussi bien pour les récurrences locales que pour l'évolution métastatique. [89]

Le pronostic des cancers du sein de la femme jeune est généralement considéré comme moins bon. La vraie question est celle de l'âge comme facteur de risque indépendant des autres facteurs de risque connus. En fait ce sont surtout les particularités de présentation des cancers chez la femme jeune qui en altèrent le pronostic global. Le second problème est celui de la détermination du seuil pris en compte. Les données de la littérature sont contradictoires. Malgré cela, il existe un consensus pour positionner un seuil inférieur à 35 ans en dessous duquel le pronostic est plus défavorable, même après prise en compte des autres facteurs de pronostic. [8][104][105]

Dans notre étude, nous avons trouvé une association statistique inverse entre l'âge et l'expression des RE et des PR. En effet, le taux d'expression des RE et des PR est plus important chez les patientes de moins de 40 ans que chez celles de plus de 40ans ce qui est contradictoire avec les données de la littérature dont la plupart trouvent une corrélation entre l'expression des RE et l'âge dans le carcinome mammaire [6] [97] [98] [106] avec une augmentation de l'expression des récepteurs hormonaux d'une façon continue après l'âge de 40ans [107].

La diminution de l'expression des RE chez les patientes de plus de 40ans dans notre série est difficile à expliquer, ceci peut être dû à des problèmes d'estimation de l'âge chez nos patientes ou à des particularités inhérentes à notre contexte local. Il faut confirmer ces résultats sur une plus grande série et vérifier les profils génétiques de ces patientes en comparant avec les patientes d'âge plus jeune et avec la littérature.

- La taille tumorale, mesurée à l'examen macroscopique et ou microscopique, constitue un facteur pronostique important. La taille de la tumeur doit être mesurée dans au moins deux dimensions et c'est la plus grande dimension qui est utilisée pour la stadification Cette taille sera remesurée sur lame en ne tenant compte que de la composante infiltrante. Si cette dernière est plus grande, c'est elle qui devra figurer sur le compte rendu. [86][89]

Dans la littérature, la plupart des études trouvent une association entre la taille tumorale et l'expression des RE [6][108][109]. Nos résultats par contre sont contradictoires. En effet, nous n'avons pas noté un lien statistique entre l'expression des RE d'une part et la taille tumorale en cm et la taille T du TNM d'autre part. Cependant, nous avons noté une diminution du taux de RE positifs dans les tumeurs de plus de 5cm par rapport aux tumeurs de 2 à 5cm. De même pour la taille T, nous avons noté une diminution du taux des RE positifs avec l'augmentation du stade T.

Cette association n'a pas été objectivée par d'autres études [98][110][111]. La présence de cette tendance à la diminution de l'expression des RE avec l'augmentation de la taille tumorale dans notre série pourrait être prouvée statistiquement par une série plus importante.

Concernant les PR, nous n'avons pas noté un lien statistique avec la taille tumorale en cm. Ce résultat est concordant avec les résultats de certaines études [98][110][111]. Il est par contre discordant avec la plupart des études. [6] [112] Pour ce qui est de la taille T, nous avons noté une association avec le PR ( $p=0,038$ ). Le pourcentage des cas PR + diminue de T1 a T2 mais augmente par la suite. Vu le taux plus élevé des cas RE-/RP+, il est difficile d'interpréter ce résultat qui reste à confirmer sur une série plus importante.

- L'importance du type de tumeur a sensiblement diminué du fait qu'approximativement 90% des tumeurs sont classées en tant que carcinome canalaire infiltrant dans la plupart des séries. L'incidence du carcinome lobulaire infiltrant, le deuxième type par ordre de fréquence, est de moins de 5%. Les types rares tels que le carcinome tubulaire, papillaire pur et médullaire, qui ont une meilleure survie avec de faibles taux de récurrence à court terme, constituent le reste. [82]

Le consensus du collège des pathologistes américains retient comme types histologiques de bon pronostic les carcinomes lobulaires, mucineux (colloïdes) et médullaires. Des pronostics différents ont été rapportés pour certaines variantes des CLI, mais ces données sont à prendre avec prudence étant donné que les séries publiées reposent le plus souvent sur un petit nombre de patientes. [8] [89]

Des travaux contradictoires ont attribué au CLI un pronostic meilleur, similaire ou moins bon que le CCI. A grade égal, le pronostic des CLI et des CCI paraît toutefois égal. [89]

Concernant l'association avec le type histologique, les résultats de la littérature sont discordants. Certaines études décrivent une association entre le type histologique et l'expression des récepteurs hormonaux [110][111] mais d'autres ne trouvent aucune association [98].

Dans notre étude, l'étude des associations avec le type histologique n'a pu être effectuée que pour le CCI. Pour les autres entités histologiques, cette association n'a pas pu être étudiée vu leur rareté.

L'association entre le CCI et l'expression des RE a été objectivée. En effet, nous avons noté un taux d'expression élevé des RE et des PR dans les cas de CCI (67% et 75% respectivement). Ce taux est proche de celui obtenu par plusieurs études [113][114] mais supérieur à celui obtenu par d'autres [98]

Concernant le CLI, il montre un taux d'expression plus élevé que le CCI [115]. Donc nos résultats (71,5% de positivité pour les RE et 86% pour les PR) sont concordant avec ceux de la littérature [116][117]. Ce taux d'expression reste par contre plus élevé que celui de certaines séries [98] qui trouve un taux de positivité de 50%.

- Le grade SBR est un facteur de pronostic indépendant de la taille et de l'état des ganglions. De plus, une tumeur de grade 3 rechute plus rapidement qu'une tumeur de grade 2. En revanche, à plus long terme, la survie de ces deux groupes est identique. C'est aussi un facteur prédictif de la réponse à la chimiothérapie ; les tumeurs grade 3 répondent mieux que celles classées grade 1 ou 2. [8]

Mais bien que beaucoup d'études aient confirmé la signification pronostique du grade tumoral, la variabilité inter-observateur, principalement due au manque d'adhérence stricte aux critères définis, demeure un souci important qui limite son utilisation comme facteur pronostique fort.

De façon similaire à la plupart des résultats obtenus dans la littérature et qui montrent que les tumeurs de haut grade sont généralement associées à une négativité des RE et des PR [98], nous avons noté une diminution de l'expression des PR avec l'augmentation du grade avec une valeur de p significative. Cette association n'a pas été statistiquement significative pour les RE mais nous avons constaté que le taux de positivité est plus bas dans les grades III que dans les grades I. L'absence de lien significatif peut être due au faible nombre de grade III (36cas) ou bien à l'inclusion des grades II dans la comparaison statistique. La différence d'expression est beaucoup plus évidente entre les grades I et les grades III. Il est reconnu en effet que les tumeurs de grade II constituent un groupe hétérogène qui sera certainement démembré en sous entités en fonction du profil moléculaire qui reflète mieux leur profil évolutif.

Dans la littérature, certaines études ne trouvent pas d'association entre les deux [6] [112].

- Dans notre série, nous avons noté une association entre l'expression des RE et le statut ganglionnaire. En effet, le taux de positivité est légèrement plus élevé dans les cas N- que dans les cas N+ (69% et 67% respectivement).

Nos résultats concordent donc avec ceux de certaines études [116], mais il est discordant avec les résultats de la majorité des études qui ne trouvent pas de lien entre les deux. [6] [21] [98].

Pour ce qui des PR, ils ne sont pas associés au statut ganglionnaire comme c'est le cas de plusieurs études [98].

### III-détermination du statut Her2 en pratique anatomo-pathologique:

Parmi les différentes méthodes permettant de déterminer le statut d'ERBB-2, l'immunohistochimie, qui explore indirectement la surexpression de cet oncogène, apparaît, à l'heure actuelle, comme la méthode de choix. [60]

#### 1-avantages et inconvénients de l'immunohistochimie

Dans cette étude, nous avons utilisé la technique immunohistochimique en raison de ses multiples avantages. En effet, c'est une technique utilisée en routine, accessible, rapide, de coût faible et réalisable sur des prélèvements inclus en paraffine ou congelés. En plus, elle a une sensibilité élevée et une spécificité modérément élevée et elle permet la détection directe de l'expression protéique tout en conservant l'architecture tissulaire ce qui permet d'une part la distinction entre la

composante infiltrante et la composante in situ, et d'autre part la localisation précise du site d'expression (membranaire ou cytoplasmique). Cependant, comme toute technique, elle a des inconvénients dont les difficultés d'interprétation dues à la variabilité des protocoles de fixation et la subjectivité des grading. [30] [32] [55] [63]

## 2-règles d'interprétation

L'optimisation de la technique immunohistochimique passe par l'apprentissage de l'interprétation de l'immunomarquage et par l'utilisation rigoureuse des témoins. [57] [60] [89]

### Ø Les témoins peuvent être :

- du parenchyme mammaire normal: chaque fois que cela est possible, l'échantillon tumoral doit être accompagné de tissu non tumoral (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). Si la technique immunohistochimique est bien étalonnée, les glandes mammaires normales ne doivent pas présenter de marquage membranaire complet et constituent un témoin négatif pour l'HER2.
- un carcinome canalaire in situ de haut grade de type comédocarcinome, témoin positif.
- une maladie de Paget, témoin positif.
- une tumeur dont le statut ERBB-2 est connu (témoin positif) et dont le marquage est satisfaisant.
- En cas de négativité totale des cellules tumorales infiltrantes, le résultat ne sera interprétable que si le contingent canalaire in situ présent sur la coupe ou le témoin externe sont positifs.

- Il ne doit pas y avoir de marquage membranaire circonférentiel des cellules glandulaires normales. En cas de positivité des cellules tumorales infiltrantes, le résultat ne sera interprétable que si les cellules épithéliales bénignes des acini et des canaux présents sur la même coupe sont négatifs.
- Ø Le signal immunohistochimique spécifique est un marquage membranaire intense « en maille de filet », apprécier le pourcentage de cellules marquées et l'intensité du marquage. [60]
- Ø 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 le trastuzumab. [60]
- Ø Un marquage cytoplasmique seul n'est pas significatif. Il peut être associé avec un marquage membranaire, principalement avec les anticorps dirigés contre la portion cytoplasmique. Il s'observe plus fréquemment dans des tissus fixés avec des fixateurs alcooliques. [60]
- Ø Il faut toujours interpréter l'immunomarquage dans les zones tissulaires bien préservées morphologiquement et se méfier des artefacts.
- Ø Dans la majorité des cas, le marquage est homogène dans toutes les cellules car l'activation de l'HER2 est un mécanisme de tout ou rien dans les carcinomes mammaires. [57]

#### - score d'interprétation

Le score idéal pour évaluer le statut HER2 n'est pas encore défini. Il faudra donc rapporter le pourcentage de cellules marquées, l'intensité du marquage et dans la perspective d'un traitement par le Trastuzumab, le score de l'AMM. [89]

Tableau 44 : score d'interprétation de l'HER-2 et indications de l'herceptine

Score	Marquage	Interprétation	Indication d'herceptine
0	absence de marquage ou marquage membranaire intéressant moins de 10% des cellules infiltrantes.	Négatif	Non
1	faible marquage membranaire intéressant plus de 10% des cellules).	Négatif	Non
2	marquage membranaire complet, faible à modéré, intéressant > 10% de cellules ou moins de < 30% avec un marquage membranaire intense et complet.	Cas douteux	Faire FISH avant décision thérapeutique
3	marquage membranaire intense de > 30% des cellules	positif	Oui

Les scores faibles (1+, 2+) se portent au grandissement moyen et se confirment au fort (X40) grandissement.

Pour le score 3, il y a eu un changement de 10% à 30% dans le récent congrès de l'ASCO / CAP. Le score 3+ se porte au faible 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+. [57]

- facteurs influençant la lecture [46] [60]

Il existe plusieurs facteurs qui peuvent modifier l'immunoréactivité de l'HER2 et donc influencer l'interprétation. Il s'agit notamment de:

- Ø l'écrasement des cellules tumorales et les artefacts de marquage dans la biopsie à l'aiguille fine.
- Ø variation des kits de dosage.
- Ø l'excès d'antigène de récupération.
- Ø Une restauration antigénique par la chaleur augmente le seuil de détection. Lors d'un prétraitement, il convient également d'ajuster la dilution de l'anticorps. Plus des 4/5 des études de la littérature utilisent des anticorps sans restauration antigénique et le pourcentage moyen de tumeurs ERBB-2 « positives » est de 20 à 30 %.

Il convient de vérifier régulièrement que les pourcentages de cas positifs observés restent dans les limites rapportées dans la littérature. La positivité de cas de carcinomes lobulaires de forme classique, ou à l'inverse, l'absence de marquage de plusieurs carcinomes canaux infiltrants de haut grade à grandes cellules, doit attirer l'attention du pathologiste. Il pourrait s'agir de faux positifs ou bien de faux négatifs respectivement. Il convient alors de vérifier la dilution de l'anticorps et/ou la préservation des sites antigéniques. [57]

Dans notre étude, nous avons utilisé l'herceptest en respectant scrupuleusement tous les détails du protocole accompagnant ce kit.

Pour la technique manuelle, nous avons utilisé l'anticorps CB11 avec une dilution de ½.

Pour la technique automatisée, nous avons utilisé l'appareil BENCHMARK® LT Ventana 750 et l'anticorps 4B5.

Avant la première utilisation, nous avons vérifié la spécificité de l'anticorps, la stabilité et la reproductibilité des résultats en l'appliquant à plusieurs reprises sur une série de tissus.

Nous avons aussi utilisé des témoins internes (en choisissant des prélèvements comportant la tumeur et du tissu mammaire normal, du carcinome canalaire in situ de type comédocarcinome et/ou une maladie de Paget lorsqu'elle est présente) et des témoins externes (lames témoins).

Pour l'interprétation, nous avons utilisé le score de l'AMM.

### 3-assurance de qualité [89] [118]

L'étude du statut Her-2 en pratique courante demande un bon étalonnage de son IHC et des contrôles de qualité internes et externes fréquents. Les contrôles de qualité internes peuvent se faire sur des blocs multi-tissulaires de tumeur dont le statut génique est connu en FISH ou en CISH. Des contrôles externes sont proposés par des associations comme l'AFAQAP ou UK-NEKAS.

Lorsqu'une technique est utilisée pour la première fois dans une structure, elle doit être validée par rapport à un « gold standard ». Cette étape visant à fixer les niveaux de sensibilité de la technique et à préciser la nature des critères d'analyse et le seuil de positivité est nécessaire pour assurer une bonne reproductibilité. Le GEFPICS a publié des recommandations permettant de calibrer et de contrôler la technique immunohistochimique (utilisation des témoins, évaluation d'une série de 100cas et comparaison aux données de la littérature).

Du fait de l'enjeu thérapeutique et des conséquences économiques, ces contrôles de qualité externes pourraient dans l'avenir devenir obligatoires.

## 4- intérêt du statut Her2 en clinique

### 4-1-Valeur thérapeutique de l'Her2

#### 4-1-1-Her2 et prédiction de la réponse à la chimiothérapie

La surexpression de l'HER2 est associée à une mauvaise réponse au doxorubicine, au cyclophosphamide, méthotrexate et fluorouracil (CMF), et au paclitaxel, alors que le tamoxifène s'est révélé inefficace et même nuisible chez les patientes HER2 positif. [11]

#### 4-1-2-Her2 et prédiction de la réponse à l'hormonothérapie [89][119]

Les résultats restent discordants pour l'hormonothérapie en situations adjuvante et néoadjuvante et métastatique. De nombreuses études ont clairement démontré une forte association entre l'amplification et la surexpression du gène Her-2 et la négativité des récepteurs hormonaux dans le carcinome mammaire. Dans une série de Carlomagno et al., la surexpression de l'Her-2 est un facteur plus important que le statut hormonal lui-même dans la prédiction d'une mauvaise réponse à l'hormonothérapie.

#### 4-1-3 Her2 et prédiction de la réponse au Trastuzumab [55] [46] [60] [66]

[120]

Les essais cliniques ont montré l'intérêt du traitement par le Trastuzumab (commercialisé sous le nom d'Herceptine) chez les patientes qui présentent un carcinome mammaire infiltrant surexprimant la protéine HER-2/neu. Ce traitement consiste à l'utilisation d'un anticorps monoclonal dirigé contre le domaine extracellulaire p185 de la protéine ERBB-2. Il a été produit par humanisation d'un anticorps monoclonal murin (MAB) 4D5, un puissant inhibiteur de la croissance de cellules tumorales mammaires humaines qui surexpriment l'HER-2. Les premiers essais thérapeutiques ont intéressé le cancer du sein métastatique. Plus récemment,

plusieurs études randomisées prospectives ont montré que le Trastuzumab adjuvant permet de réduire le risque de récurrence et de mortalité chez les patientes exprimant l'HER2 et porteuses d'un cancer du sein à un stade précoce. Cela a abouti à son utilisation comme traitement adjuvant et à son approbation par le FDA en 1998. Cependant, pour que le traitement soit efficace, et en raison de ses effets secondaires dont la cardiotoxicité, les tests utilisés pour détecter la surexpression ou l'amplification du gène doivent être fiables et précis.

#### 4-2-Valeur pronostique

Les travaux étudiant l'association entre l'amplification ou la surexpression de l'HER2 et les facteurs pronostiques traditionnels ont donné des résultats hétérogènes. [11] La plupart des études, depuis la publication de Slamon et al. en 1987, ont montré le rôle pronostique de l'HER2 [30] [55]. Ces études trouvent une corrélation entre l'expression de l'HER2 et les autres facteurs pronostiques classiques comme la taille tumorale, le haut grade, la présence de métastases ganglionnaires, l'absence de l'expression des récepteurs hormonaux et l'index de prolifération. Par contre, d'autres études ne trouvent pas cette association [11].

La valeur pronostique indépendante de l'HER2 chez les patientes avec et sans métastases ganglionnaires a été difficile à établir vu que la plupart des études étaient rétrospectives et utilisaient des méthodes différentes d'évaluation. [30]

Dans une étude réalisée par Birgitte Vrou Offeren et al. On a noté que la surexpression de l'Her2 est corrélée à un mauvais pronostic chez toutes les patientes et aussi chez les sous groupes avec et sans métastases ganglionnaires. [103]

D'autres auteurs rapportent que la surexpression de l'her2 n'est pas significativement associée au pronostic [10].

#### 4-3- Expression de l'Her2 et les corrélations avec les autres facteurs

##### pronostiques

La protéine Her2 est exprimée dans 31% des cas de notre série avec 23% des cas de score 3 et 8% des cas de score 2. Ce taux reste dans les limites du taux de positivité de 20 à 30% recommandé [55] [95] [96]. Ce taux est également respecté dans plusieurs études : l'étude jordanienne de N.M. Almasri (24%) [6], l'étude tunisienne de L. Ayadi (26%) [98], l'étude danoise de B.B.Rasmussen (20,8% de surexpression) [122] et l'étude australienne de M. Bilous qui trouve un taux de 26% de positivité avec 12% de score 3. [121]

D'autres auteurs ont trouvé des taux d'expression plus élevés [55]. (tableau 45)

Tableau 45 : comparaison de l'expression de l'HER2 entre notre série et celles de la littérature

	<i>HER2 score 0 et 1</i>	<i>HER2 score 2</i>	<i>HER2 score3</i>
Notre série	69%	8%	23%
B.B.Rasmussen [122]	61,5%	17,7%	20,8%
N.M.Almasri [6]	54%	22%	24%
L.Ayadi [98]			26%
M.Bilous [121]	75%	13%	12%
A. Edith [129]	73%	14%	13%

Nous avons noté une tendance de l'augmentation de la surexpression de l'HER2 chez les patientes de moins de 40ans par rapport aux patientes de plus de 40ans (29,5% de positivité versus 20,2%) mais cette tendance n'est pas statistiquement significative. En plus l'âge moyen des patientes qui n'expriment pas l'HER2 est 3ans plus élevé que celui des patientes qui l'expriment (score 2 et 3). Ce résultat

concorde avec celui de plusieurs études qui montrent une diminution du taux d'expression avec l'augmentation de l'âge [6][122].

D'autres études par contre ne trouvent aucune association. [98][103].

Plusieurs études trouvent une association entre la taille tumorale et l'expression de l'HER2 [10][121][122]. D'autres études trouvent une tendance à l'augmentation de l'expression de l'HER2 avec l'augmentation de la taille tumorale [6] [98]. Des résultats similaires à ces derniers sont notés dans notre série mais avec un p non significatif. En effet, nous avons noté une augmentation de la taille tumorale moyenne avec l'augmentation du score HER2 (4,1cm pour les cas négatifs, 4,6cm pour les cas équivoques et de 5,4cm pour les cas positifs). En plus, le pourcentage de cas HER2 score 3 augmente avec l'augmentation de la taille tumorale. L'utilisation d'un échantillon plus important pourrait donner des résultats plus précis.

En dehors du CCI, l'association entre l'expression de l'HER2 et le type histologique ne peut être étudiée. Dans cette série, et comme le résultat obtenu par plusieurs études, [6] [121] [123], nous avons noté une association entre les deux paramètres. En effet, nous avons noté un taux de positivité de l'HER2 plus élevé dans le CCI que dans le CLI. Dans la littérature, l'expression de l'HER2 est rare dans le CLI sauf pour la variante pléomorphe [124], or dans notre série, le taux de positivité du CLI (2cas positifs soit 29%) était plus élevé que celui de plusieurs études [6] [125].

Certaines études trouvent des résultats discordants aux nôtres, parmi lesquelles une étude tunisienne qui ne trouve pas d'association ni de différence de l'expression de l'her2 entre le CCI et le CLI [98] [126].

La plupart des études ont associé entre la surexpression de l'her2 et le grade [10][121][125], alors que d'autres études arabes n'ont pas montré d'association. C'est le cas de l'étude de N.M. Almasri qui trouve un taux de surexpression similaire entre le grade II et le grade III. [6] et l'étude tunisienne de L. Ayadi [98]. Dans cette étude, nous n'avons pas noté d'association statistique entre le statut Her2 et le grade SBR ; en effet, le taux d'expression de l'Her2 est beaucoup plus élevé dans le grade II que dans le grade III et la plupart des tumeurs grade III sont HER2 négatives.

Le rôle pronostique de l'her2 a été aussi analysé selon le statut ganglionnaire N-/N+ ; la plupart des études qui ont analysé ce rôle chez les patientes avec des métastases ganglionnaires ont montré que l'amplification de l'her2 est associée à un mauvais pronostic et à des métastases ganglionnaires [10][98][122][125]. Quant à notre étude, elle n'a pas montré d'association entre le statut her2 et les métastases ganglionnaires rejoignant ainsi le résultat obtenu par certaines études [121].

Concernant l'étude de N.M. Almasri, elle ne trouve pas d'association significative mais elle trouve une tendance vers l'augmentation du taux de cas ayant plus de 3 ganglions métastatiques avec l'augmentation de l'expression de l'HER2 [6].

Nous n'avons pas noté d'association entre l'expression de l'HER-2 et la présence de métastases à distance ce qui est contradictoire avec l'étude de SA Aziz qui a étudié l'association entre l'expression de l'her2 et la présence de métastases cérébrales, pulmonaires ou osseuse. Elle a objectivé une association entre l'her2 et les métastases cérébrales et pulmonaires mais pas avec les métastases osseuses [10].

Peu d'études se sont intéressées à l'étude de l'association de l'HER2 avec la présence d'embols vasculaires. Dans cette série, il n'y avait pas d'association entre la surexpression de l'HER2 et la présence d'embols vasculaires ce qui rejoint les résultats obtenus par S.A. Aziz [10].

#### 4-4-corrélation entre les RE et le statut Her2

L'HER2 lui-même régule les voies de signalisation des RE soit par phosphorylation de ce récepteur ou bien par l'activation des protéines kinases [98]. Nous avons noté une forte association entre l'expression des RE et de l'HER2. En effet, la proportion des cas HER2 score 3 est plus importante dans les cas RE- que dans les cas RE+. Dans la littérature, cette association a été décrite par la plupart des auteurs. Il a été démontré que l'amplification de l'HER2 est significativement plus fréquente dans les cas RE négatifs. Approximativement 35% de tous les cas RE négatifs présentent cette amplification alors que seulement 10-15% des cas RE positifs la présentent [127]. La même constatation a été faite dans les études utilisant l'immunohistochimie comme l'étude danoise de B.B. Rasmussen qui trouve un pourcentage de l'HER2 score 3 plus important dans les cas RE négatifs que dans les cas RE positifs [122] et par la plupart des autres études [10][21][98].

En fait, l'HER-2 semble entraîner une prolifération en l'absence de la voie RE et l'œstrogène supprime la transcription de l'HER2. En général, il est accepté qu'il y a une corrélation inverse entre l'expression des RE et de l'HER2, cette corrélation n'est pas absolue. Environ la moitié des cas HER-2 positifs sont aussi RE positifs (environ 10% des patientes). [128]

# CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Le cancer du sein représente le premier cancer de la femme et la première cause de décès par cancer chez la femme. L'avènement de nouvelles thérapeutiques rend la recherche de nouveaux facteurs pronostiques comme l'expression des récepteurs à l'œstrogène et à la progestérone et de l'HER2 indispensable pour une meilleure prise en charge vu leur rôle pronostique et prédictif.

Dans notre étude, nous avons noté un taux d'expression des récepteurs hormonaux et de l'her2 proche de celui décrit dans la littérature. Les récepteurs hormonaux sont corrélés entre eux et avec l'expression de l'HER2.

L'expression des RE est associée à certains facteurs de bon pronostic comme l'absence de métastases ganglionnaires, elle a tendance à augmenter dans les stades T du TNM précoces et les cas de bas grade.

L'expression de l'HER2 avait tendance à augmenter avec la présence de certains facteurs de mauvais pronostic comme un âge jeune et une taille tumorale augmentée.

Au cours de cette étude, nous avons remarqué que l'association entre les différents paramètres étudiés n'était pas toujours statistiquement significative. Pour remédier à ce problème, il faudrait poursuivre l'étude afin d'avoir un échantillon plus important.

Parmi les autres problèmes rencontrés, celui des cas de l'HER2 score 2 dont la positivité ou la négativité n'a pas été confirmée par d'autres techniques, ce qui pourrait fausser nos résultats. Pour éviter ce problème, nous allons confirmer systématiquement la positivité ou la négativité de ces cas par la recherche d'une amplification génique par la FISH.

En se référant à ces résultats, et vue leur reproductibilité par rapport aux résultats de la littérature, nous pouvons déduire que notre technique immunohistochimique a fait preuve de sa fiabilité dans la recherche de l'expression des récepteurs hormonaux et de l'HER2 dans le cancer du sein. Nous avons constaté que l'utilisation de l'automate améliore la sensibilité de la technique surtout pour la détection des RE et de HER2 ce qui permettra de mieux sélectionner les patientes pour le traitement.

La continuité de ce travail doit impérativement comporter toutes les informations nécessaires concernant l'évolution des patientes et leur survie. En effet dans toutes les séries de la littérature les corrélations les plus importantes se font avec ces paramètres beaucoup plus qu'avec les facteurs de mauvais pronostic connus comme le grade et le stade métastatique. L'ouverture du centre d'oncologie du CHU participera certainement à un meilleur suivi local des patientes.

Par ailleurs, nous prévoyons de développer les techniques d'étude moléculaire au niveau du laboratoire et en collaboration avec des centres internationaux, ce qui permettra peut être d'expliquer mieux les discordances ou les particularités observées dans notre travail.

# RESUME

## Introduction

Le cancer du sein représente le cancer le plus fréquent de la femme dans le monde. L'évaluation de l'expression des récepteurs à l'œstrogène et à la progestérone et de l'HER-2 est devenue indispensable pour la prise en charge des patientes porteuses d'un cancer du sein vu qu'elle donne une information d'ordre pronostique et thérapeutique.

Le but de ce travail est d'évaluer l'expression des récepteurs hormonaux et de la protéine Her-2 dans le cancer du sein, étudier les corrélations entre eux et avec les autres facteurs pronostiques, comparer nos résultats avec ceux de la littérature et évaluer notre technique immunohistochimique.

## Matériel et méthodes

Il s'agit d'une étude prospective portant sur 130 cas de cancer du sein diagnostiqués au service d'anatomie pathologique du CHU Hassan II de Fès entre janvier 2008 et décembre 2009. L'évaluation de l'expression des récepteurs hormonaux et de l'HER2 était réalisée par méthode immunohistochimique.

## Résultats :

Les RE sont exprimés dans 64% des cas, les PR dans 71% des cas et l'HER2 dans 31% des cas.

La corrélation entre le pourcentage et l'intensité du marquage par les RE et les PR était statistiquement significative.

Comme la plupart des études de la littérature, nous avons noté une association entre les RE et les PR et entre les RE et l'HER2.

Les RE étaient associés avec les métastases ganglionnaires et avaient tendance à diminuer avec l'augmentation du stade T du TNM et du grade SBR. Il n'a pas été remarqué d'association avec la taille tumorale.

Concernant les PR, ils étaient corrélés avec l'âge mais pas avec la taille tumorale ni avec le statut ganglionnaire.

L'HER2 était associé avec le type histologique. Il y avait une tendance à l'augmentation de son expression avec la diminution de l'âge et l'augmentation de la taille tumorale, sans qu'elle soit statistiquement significative. Il n'était pas associé au grade SBR ni à la présence d'embols.

### Conclusion

Nos résultats concordent généralement avec ceux de la littérature et notre technique immunohistochimique a fait preuve de sa fiabilité.

Le développement des moyens d'étude moléculaire et la collaboration avec les différents services de notre CHU permettra de mieux comprendre certaines particularités de nos patientes.

# SUMMARY

## Introduction

Breast cancer is the most frequent malignancy among women all over the world.

Assessment of expression of estrogen and progesterone receptors and of HER-2 is nowadays mandatory in the care of patient having breast cancer taking into consideration the prognosis and treatment information provided by these parameters.

The aim of this study is to assess expression of hormonal receptors and the protein Her-2 in the context of breast cancer, to study correlation between these parameters and prognosis factors, to compare our results with those published in the literature, and to assess our immunohistochemical technic.

## Patients and methods

It's a prospective study involving 130 cases of breast cancer diagnosed in pathology department of the University Hospital Hassan II of Fez, between January 2008 and December 2009. Assessment of expression of hormonal receptors and HER2 was performed by immunohistochemical technic.

## Results

OR are expressed in 64 % of cases, PR in 71 % and HER 2 in 31% of cases.

Correlation between percentage and intensity of expressivity of OR and PR was statistically significative. Like most of studies published in the literature, we have noticed a strong association between OR and OR and between OR and HER2.

The OR was associated with age and lymphatic metastasis with a tendency to decreasing with worsening of stage of TNM classification and SBR grade. No correlation with tumor size was noticed. Concerning PR, there was a correlation with age but not with tumor size and lymphatic status.

HER2 was associated with histologic type. There was a tendency to increasing of expression with the decreasing of age and increasing of tumor size, without statistic significance. It was not associated with SBR grade and presence of embolus.

### Conclusion

Our results are compatible with those already published in the literature, and our immunohistochemical technic is reliable.

Development of new molecular study means and collaboration between different departments of our UH would allow us a better understanding of some peculiar aspects of our patients.

# الملخص

## مقدمة

يعد سرطان الثدي السرطان الأكثر انتشارا لدى النساء في العالم ولقد أصبح تقييم مستقبل الأوستروجين، مستقبل البروجسترون والبروتين HER2 ضروريا للتكفل بمرضى سرطان الثدي حيث يعطي معلومات إنذارية وعلاجية.

الهدف من هذه الدراسة هو تقييم المستقبلات الهرمونية والبروتين HER2 لسرطان الثدي، دراسة العلاقات بينهم من جهة وبينهم وبين باقي العوامل الإنذارية مع مقارنة نتائجنا مع النتائج المحصل عليها في دراسات أخرى.

## المواد والطرق:

يتعلق الأمر بدراسة قبلية ل 130 حالة سرطان ثدي تم الكشف عنها في مصلحة التشريح المرضي بالمستشفى الجامعي الحسن الثاني بفاس ما بين يناير 2008 وشتنبر 2009. لقد تم تقييم المستقبلات الهرمونية وال HER2 عن طريق الكيمياء السيتولوجية المناعية.

## النتائج:

لقد تم التعبير عن مستقبلات الأوستروجين في 64 % من الحالات، مستقبلات البروجسترون في 71 % من الحالات وال HER2 في 31 % من الحالات.

هناك ترابط إحصائي ذو معنى بين نسبة وشدة التعبير عن مستقبلات الأوستروجين والبروجسترون. كما هو الحال بالنسبة لأغلب الدراسات، سجلنا ترابطا بين مستقبلات الأوستروجين والبروجسترون وبين مستقبلات الأوستروجين من جهة وال HER2 والاجتياح الغددي من جهة أخرى. لقد لاحظنا أيضا نقصانا في التعبير عن مستقبل الأوستروجين مع تقدم المرحلة T من TNM والدرجة SBR ولكن هذا النقصان لم يكن ذا معنى إحصائي. لم نلاحظ أي علاقة مع قياس الورم بالسنتيمتر. فيما يتعلق بمستقبل البروجسترون ، لاحظنا ارتباطه بالسن لكنه لم يكن مرتبطا بقياس الورم بالسنتيمتر ولا بالاجتياح الغددي.

لقد كان ال HER2 مرتبطا بالنوع السيتولوجي كما لاحظنا ارتفاعا في التعبير عنه لدى المرضى الأصغر سنا وفي الأورام الأكبر حجما دون أن يكون لذلك معنى إحصائي. لم يكن ال HER2 مرتبطا بالدرجة SBR .

## خاتمة:

تتلاءم بعض نتائجنا مع تلك المحصل عليها في باقي الدراسات. لقد أثبتت الكيمياء السيتولوجية فعاليتها. سوف يسمح تقدم طرق الدراسة الجزيئية والعمل بتعاون مع مختلف مصالح المستشفى الجامعي بفهم أفضل لبعض خصائص مرضانا.



# BIBLIOGRAPHIE

- [1] Plu-Bureau G et al  
Sein et hormones  
Gynécologie [810-A-10] ; 2002
- [2] Hill C. et al  
Fréquence des cances en France.  
Bulletin cancer 2003 ; 90 : 207-13.
- [3] Bengobrane H. et al  
Pronostic du cancer du sein à l'institut de carcinologie Salah Azaïz de Tunis  
Eastern Mediterranean Health Journal, Vol.13, No. 2, 2007
- [4] El Kacemi H.  
Le cancer du sein à l'INO en 2003, étude épidémiologique, clinique et thérapeutique  
[mémoire] Rabat. université de Rabat ; 2005.
- [5] Tavassoli FA. et al  
Eds: World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics  
of Tumours of the Breast and Female Genital Organs; Lyon: IARC Press; 2004.
- [6] N.M.Almasri, M.Al Hamad  
Immunohistochemical evaluation of human epidermal growth factor receptor 2 and  
estrogen and progesterone receptors in breast carcinoma in Jordan  
Breast Cancer Research 2005, 7: R598-R604
- [7] M.O.Vilain et al  
Detection immunohistochimique des récepteurs de l'oestradiol et de la progesterone  
sur coupes en paraffine après traitement par micro-ondes.  
Ann Pathol, 1997, 17, N 2, p. 82-88
- [8] I. Treilleux, A. Brémond  
Pronostic des cancers du sein. Encycl Méd Chir (Editions Scientifiques et Médicales  
Elsevier SAS, Paris), Gynécologie, 865-F-20,2002, 7 p4.
- [9] R.M. Parache and C. Migeon  
Revue française des laboratoires, volume 1996, issue 286, Septembre 1996, p. 149.

[10] S.A.Aziz et al.

Significance of Immunohistochemical c-ErbB-2 Product Localisation Pattern for Prognosis in Human Breast Cancer ; Pathology oncology research, Vol 7, No 3, p.190, 2001.

[11] S.Ménard et al.

Role of HER2 Gene Overexpression in Breast Carcinoma; Journal of cellular physiology 182:p. 150 (2000).

[12] Chieh L. et al

erb-b2 Amplification by Fluorescence In Situ Hybridization in Breast Cancer Specimens Read as 2+ in Immunohistochemical Analysis  
Am J Clin Pathol. 2005;124(1):97-102.

[13] M. SANCHEZ-DENEUX

Immunosuppresseurs et antistéroïdes dans les cellules de cancers de sein humains : effets sur la prolifération cellulaire, les récepteurs des œstrogènes et sur la transcription des gènes qu'ils régulent ; thèse de doctorat de l'institut national agronomique Paris-Grignon ; p 30 ; Décembre 2003.

[14] V. Speirs, R.A. Walker

New perspectives into the biological and clinical relevance of oestrogen receptors in the human breast; J Pathol 2007; 211: 499-506

[15] S. Badve, H. Nakshatri

Oestrogen-receptor-positive breast cancer: towards bridging histopathological and molecular classifications; Journal of Clinical Pathology 2009; 62:6-12

[16] G. G. J. M. Kuiper, E. Enmark, M. Peltö-Huikko, S. Nilsson, J.A. Gustaffsson

Cloning of a novel estrogen receptor expressed in rat prostate and ovary  
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1996), 93, 5925-5930

[17] J. P. Brettes, C. Mathelin, B. Gairard, J. P. Bellocq

Cancer du sein  
Edition 2007

[18] H.Gronemeyer

Transcription activation by estrogen and progesterone receptors.  
Annu Rev Genet 1991. 25: 89-123.

- [19] Picard, D., Kumar, V., Chambon, P. et Yamamoto, K. R.  
Signal transduction by steroid hormones: nuclear localization is differentially regulated in estrogen and glucocorticoid receptors. *Cell Regul* 1990. 1: 291-299.
- [20] Nichols, M., Rientjes, J. M. J. et Stewart, A. F.  
Different positioning of the ligand-binding domain helix 12 and the F domain of the estrogen receptor accounts for functional differences between agonists and antagonists.  
*EMBO J.* 1998. 17: 765-773.
- [21] S.Borgquist, C. Holm, M. Stendahl, L. Anagnostaki, G. Landberg, K. Jirström  
Oestrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$  show different associations to clinicopathological parameters and their co-expression might predict a better response to endocrine treatment in breast cancer.  
*Journal of Clinical Pathology* 2008; 61: 197-203.
- [22] Hall J.M., Couse J.F., Korach K.S.  
The multifaceted mechanisms of estradiol and estrogen receptor signalling.  
*J Biol Chem*  
2001; 276:36869-36872.
- [23] Xiaojiang Cui, Rachel Schiff, Grazia Arpino, C. Kent Osborne, Adrian V. Lee  
Biology of Progesterone Receptor Loss in Breast Cancer and its Implications for Endocrine Therapy  
*Journal of Clinical Oncology*, vol 23, No 30 (October 20), 2005: pp. 7721-7735
- [24] Li X, Lonard DM, O'Malley BW  
A contemporary understanding of progesterone receptor function.  
*Mech Ageing Dev.* 125: 669-678, 2004
- [25] Chauchereau A., Georgiakaki M., Perrin-Wolff M., Milgrom E. et Lousfelt H.  
JAB1 interacts with both the progesterone receptor and SRC-1  
*J Biol Chem*, Vol. 275, Issue 12, 8540-8548, March 24, 2000
- [26] Amazit L., Quesne M., Guiochon-Mantel A., Milgrom E.  
Sumoylation on the progesterone receptor and the steroid receptor coactivator SRC-1  
*J Biol Chem* (2003) April 4; 278 (14): 12335-43.

- [27] Mote PA, Balleine RL, McGowan EM et al.  
Colocalization of progesterone receptors A and B by dual immunofluorescent histochemistry in human endometrium during the menstrual cycle.  
J Clin Endocrinol Metab 1999;84:2963-71.
- [28] Hopp TA, Weiss HL, Hilsenbech HG et al  
Breast cancer patients with progesterone receptor PR-A-rich tumors have poorer disease-free survival rates.  
Clin Cancer Res 10: 2751-2760, 2004
- [29] Manner L., Milano G., Penault Llorca F., Merlin J.L.  
Targeting of membrane receptor tyrosine kinase: is there resistance in the HER?  
Bulletin du cancer, Vol 91, No 9, 685-94, Sépt 2004
- [30] A. Perez, MD  
HER-2 as a Prognostic, Predictive, and Therapeutic Target in Breast Cancer  
Cancer Control 6(3):233-240, 1999.
- [31] Revillon F. et al.  
ErbB2 oncogene in human breast cancer and its clinical significance  
Eur. J. Cancer 1998 ; 34 : 791-808
- [32] Bartlett J. et al  
The clinical evaluation of HER-2 status : which test to use ?  
J Pathol 2003; 199: 411-417
- [33] Nancy E. Hynes; Heidi A. Lane  
ERBB Receptors and Cancer: The Complexity of Targeted Inhibitors  
Nat Rev Cancer. 2005; 5(5):341-354.
- [34] Garrett, T. P. *et al.*  
Crystal structure of a truncated epidermal growth factor receptor extracellular domain bound to transforming growth factor  $\alpha$ .  
Cell 110, 763-773 (2002)
- [35] Ogiso, H. et al.  
Crystal structure of the complex of human epidermal growth factor and receptor extracellular domains.  
Cell 110, 775-787 (2002).

[36] Mitchell MS et al.

The role of immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridisation for HER-2/neu in assessing the prognosis of breast cancer.

Semin Oncol 1999; 26 (suppl. 12): 108-16.

[37] Dansereau S, Ferron D

La thérapie ciblée en oncologie et la pointe de l'iceberg. Première partie : le récepteur épidermique humain HER/ErbB.

Pharmactuel ; Vol. 39 ; N° 3 ; Mai-Juin-Juillet 2006 ; p 135-43

[38] Moreno A. et al.

Ductal carcinoma in situ of the breast : correlation between histologic classification and biologic markers.

Modern pathology 10 (1997); pp. 1088-1092.

[39] Sherri Mann MD et al

Estrogen receptor beta expression in invasive breast cancer.

Human Pathology; Vol 32; Issue 1; January 2001. 51506

[40] Fédération nationale des centres de lutte contre la cancer (FNCLCC)

Cancers du sein infiltrants non métastatiques (2<sup>ème</sup> édition 2001).

Editions John Libbey Eurotext

[41] Goussard J

Bases biochimiques de la détection des récepteurs d'œstrogène et de la progestérone des tumeurs mammaires par immunohistochimie.

Ann Pathol. 1996,16, N° 2, 91-96

[42] Zindan A et al

Oestrogen and progesterone assessment in core biopsy specimens of breast carcinoma.

Journal of Clinical Pathology 1997;50:27-29

[43] Balaton AJ et al

Recommandations pour l'évaluation immunohistochimique des récepteurs hormonaux sur coupes en paraffine dans les carcinomes mammaires. Mise à jour 1999

Annales de Pathologie, Vol 19, N° 4 - août 1999, p. 336

- [44] Layfield LJ et al  
Tissue heterogeneity for immunohistochemically detected estrogen receptor.  
Implications for image analysis  
Am J Clin Pathol 1998 ; 110 : 758-64
- [45] Von Wasielewski R et al  
Influence of fixation, antibody clone , and signal amplification on steroid receptor analysis  
The breast journal, vol 4, issue 1, p 33-40 (2003)
- [46] Walker RA  
Immunohistochemical markers as predictive tools for breast cancer  
Journal of clinical pathology 2008; 61: 689-696
- [47] Wakins J et al  
Enhancement of immunostaining (correspondance).  
Histopathology 1990 Aug;17(2):185-9
- [48] BEVITT D. J. et al  
New monoclonal antibodies to oestrogen; progesterone receptors effective for paraffin sections immunohistochemistry. J of pathology 1997, vol183, issue 2, p228-232
- [49] Howard S et al  
Effect of surfactants on immunohistochemical demonstration of estrogen receptors.  
J Pathol (suppl): 24A
- [50] Lopez Presas et al  
A comparison of ER clones 1D5 et 6F11 using manual and automated methods in paraffin embedded tissue  
J Pathol 1998; 11; 186A
- [51] Ehemann V., Sykora J., Vera-Delgado J., Lange A., Otto H.F.  
Flow cytometric detection of spontaneous apoptosis in human cancer using the TUNEL-technique.  
Cancer Let, 2003,194 : 125-131.

[52] Leers M., Schutte B., Theunissen P., Ramakers F., Nap M.  
A novel flow cytometric steroid hormone receptor assay for paraffin-embedded breast carcinomas : An objective quantification of the steroid hormone receptors and direct correlation to ploidy status and proliferative capacity in a single-tube assay.

Human Pathol, 2000, 31 : 584-592

[53] Leers M P G et al

Determination of Threshold values for determining the size of the fraction of steroid hormone receptor-positive tumor cells in paraffin-embedded breast carcinoma.

Cytometry part B:clinical cytométrie, 64B: 43-52 2005.

[54] Slamon D. J. et al

Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene.

Science 235 (1987), pp. 177-182

[55] Lauren Hammock MD et al

Strong HER-2/neu protein overexpression by immunohistochemistry often does not predict oncogene amplification by fluorescence in situ hybridization.

Human pathology, Vol 34, Issue 10, October 2003, pp. 1043-1047.

[56] SHAHLA MASOOD ; MARILYN M, BUI

Pronostic and Predictive Value of HER 2 / neu Oncogene in Breast cancer

MICROSCOPY RESEARCH AND TECHNIQUE 59 : 102-108 (2002)

[57] Penault-Llorca F et al

L'évaluation immunohistochimique du statut HER2 dans les carcinomes mammaires infiltrants : mise au point du protocole technique et de la lecture des résultats : recommandations.

Annales de pathologie, Vol 22 ; N° 2-Avril 2002 ; 150-157

[58] Allred DC et al

Testing for erb-B2 by immunohistochemistry in breast cancer.

Am J Clin Pathol 2000; 113: 171-5

[59] Mass R et al

The role of HER-2 expression in predicting response to therapy in breast cancer.

Sem Oncol 2000; 27: 46-52.

[60] Penault-Llorca et al

Le défi de la qualité en immunohistochimie : exemple du statut ERBB-2 dans le cancer du sein.

Annales de pathologie, Vol 19 ; N°4 ; Aout 1999 ; 280-280

[61] Fiche M

Fluorescence in situ hybridisation (FISH) : current developments and prospects in pathology.

Ann pathology; 2001 Oct; 21 (5): 383-5

[62] Antonio C Wolff et al

American society of clinical oncology/college of American pathologists guideline : recommendations for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 testing in breast cancer.

J of Clin Oncol 2007; 25: 118-145.

[63] Saez A et al

HER-2 gene amplification by chromogenic in situ hybridisation (CISH) compared with fluorescence in situ hybridisation (FISH) in breast cancer-A study of two hundred cases.

The breast, Vol 15; Issue 4, August 2006, p 519-527.

[64] Arnould L et al

Agreement between chromogenic in situ hybridisation (CISH) and FISH in the determination of HER2 status in breast cancer.

Br j Cancer. 2003; 88 (10): 1587-91.

[65] Denoux Y et al

HER2 gene amplification assay : is CISH an alternative to FISH ?

Ann Pathol. 2003 ; Dec ; 23 (6) : 617-22.

[66] Grondin K et al

L'hybridation in situ colorimétrique (CISH) : un complément au FISH pour l'évaluation de l'amplification de l'HER2/NEU

Ann Pathol 2006 : 26 : 68-78.

[67] Lebeau A et al

HER-2/neu analysis in archival tissue samples of human breast cancer : comparison of immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization.

J Clin Oncol 19 (2001), pp. 852-859.

[68] Tubbs RR et al

Discrepancies in clinical laboratory testing of eligibility for trastuzumab therapy : apparent immunohistochemical false-positives do not get the message.

J Clin Oncol 19 (2001), pp. 2714-2721

[69] Ridolfi RL et al

HER-2/neu testing in breast carcinoma : a combined histochemical and fluorescence in situ hybridization approach.

Mod Pathol 13 (2000), pp. 866-873.

[70] Vincent-Salomon A et al

Calibration of immunohistochemistry for assessment of HER2 in breast cancer : results of the french multicentre GEFPICS study.

Histopathology 2003, 42, 337-347.

[71] Bethune-Volters A et al

Stratégies d'exploration fonctionnelle et de suivi thérapeutique : HER-2 sérique, cancer du sein et trastuzumab (Herceptine®)

Immuno-analyse et biologie spécialisée, Vol 19, Issue 5, Oct 2004, pp 250-254

[72] Lüftner D et al

Serum HER-2/neu in the management of breast cancer patients

Clinical biochemistry 36 (2003) 233-240

[73] Kong S Y et al

Serum HER-2 concentration in patients with primary breast cancer.

J Clin Pathol 2006, 59 : 373-736

[74] Quaranta M, Daniele A, Coviello M, et al

C-erbB-2 protein level in tissue and sera of breast cancer patients: A possibly useful clinical correlation.

Tumori 92:311-317, 2006.

[75] Salvadori B, Pinzani P, Distante V, et al

Comparison of pre- and postsurgical concentrations of blood HER-2 mRNA and HER-2 extracellular domain reflects HER-2 status in early breast cancer.

Clin Chem 51:254-256, 2005.

[76] OLSEN Dorte A. et al

HER-2 protein concentrations in breast cancer cells increase before immunohistochemical and fluorescence in situ hybridization analysis turn positive. *Clinical chemistry and laboratory medicine* 2007, vol. 45, n°2, pp. 177-182

[77] Ludovini V. et al

Evaluation of serum HER2 extracellular domain in early breast cancer patients: correlation with clinicopathological parameters and survival. *Annals of Oncology* 2008 19(5):883-890

[78] Alexandra F. et al

Value and Limitations of Measuring HER-2 Extracellular Domain in the Serum of Breast Cancer Patients  
*Journal of Clinical Oncology*, Vol 27, No 10 (April 1), 2009: pp. 1694-1705

[79] Mazouni C, Hall A, Broglio K, et al

Kinetics of serum HER-2/neu changes in patients with HER-2-positive primary breast cancer after initiation of primary chemotherapy. *Cancer* 109:496-501, 2007.

[80] Kostler WJ, Steger GG, Soleiman A, et al

Monitoring of serum Her-2/neu predicts histopathological response to neoadjuvant trastuzumab-based therapy for breast cancer. *Anticancer Res* 24:1127-1130, 2004.

[81] Kostler WJ, Schwab B, Singer CF, et al

Monitoring of serum Her-2/neu predicts response and progression-free survival to trastuzumab-based treatment in patients with metastatic breast cancer. *Clin Cancer Res* 10:1618-1624, 2004.

[82] World Health Classification of Tumours

Pathology and genetics; Tumours of the breast and female genital organs  
Edited by Fattaneh A. Tavassolli et Peter Devilee  
Edition 2003

[83] Chevalier B

Inflammatory breast cancer.  
*Bull Cancer*, 1993, 80 (12) : p. 1024-34

[84] Sataloff DM et al

Pathologic response to induction chemotherapy in locally advanced carcinoma of the breast : a determinant of outcome.

J Am Coll Surg, 1995. 180 (3) : p. 297-306

[85] Elston CW et al

Pathological prognostic factors in breast cancer. The value of histological grade in breast cancer : experience from a large study with long-term follow-up.

Histopathology 1992 ; 20 : 479-498

[86] Attiqa N. et al

Prognostic Factors in Node-Negative Breast Cancer : a Review of Studies With Sample Size More Than 200 and Follow-Up More Than 5 Years

Ann of Sur, Vol. 235, No. 1, 10-26 ; 2002

[87] Esteva FJ et al

Prognostic molecular markers in early breast cancer

Breast Cancer Res 2004, 6: 109-118

[88] Aubriot M

Intérêt de l'immunohistochimie dans l'évaluation de l'expression des récepteurs aux oestrogènes et à la progestérone dans les cancers du sein. Comparaison avec la méthode biochimique immunoenzymatique sur une série de 795 cas.

Thèse N° 79; années 1999; Paris; faculté de médecine Sain Antoine.

[89] Sigal-Zafrani B et al

EPU pathologie mammaire 2007

[90] Balaton AJ et al

Approche systématique de la qualité technique et immunohistochimique.

Ann Pathol 1999 : 299-308.

[91] Elledge RM et al.

Estrogen receptor (ER) and progesterone receptor (PgR), by ligandbinding assay compared with ER, PgR and pS2, by immunohistochemistry in predicting response to tamoxifen in metastatic breast cancer: a Southwest Oncology Group Study.

Int J Cancer 2000;89:111-7.

- [92] Dowsett M et al  
Emerging Biomarkers and New Understanding of Traditional Markers in Personalized Therapy for Breast Cancer  
Clin Cancer Res 2008;8019 14(24) December 15, 2008
- [93] Bardou VJ et al  
Progesterone receptor status significantly improves outcome prediction over estrogen receptor status alone for adjuvant endocrine therapy in two large breast cancer databases.  
J Clin Oncol 2003; 21, 1973\_9
- [94] Broett P et al  
Rôle pronostique à long terme des récepteurs stéroïdiens dans le cancer du sein  
Bull du cancer, V 85, N°4, 347-52, Avr 1998
- [95] Pauletti G et al  
Assessment of methods for tissue-based detection of the HER-2/neu alteration in human breast cancer: a direct comparison of fluorescence in situ hybridization and immunohistochemistry.  
J Clin Oncol 2000, 18: 3651-3664
- [96] Varshney D et al  
Determination of HER-2 status and chromosome 17 polysomy in breast carcinomas comparing Herceptest and PathVysion FISH assay.  
Am J Clin Pathol 2004, 121: 70-77
- [97] Anderson WF et al  
Tumor variants by hormone receptor expression in white patients with node-negative breast cancer from the surveillance, epidemiology and end results database.  
J Clin Onc. 2001, 19: 18-27.
- [98] Ayadi L et al  
Correlation of HER-2 overexpression with clinico-pathological parameters in Tunisian breast carcinoma  
World J of Surgical Onc 2008, 6: 112
- [99] Chow LW, Ho P  
Hormonal receptor determination of 1052 Chinese breast cancers  
J Surg Onc 75: 172-175, 2000

[100] Ikpatt of et al.

Estrogen and progesterone receptors in Nigerians breast cancer: relationship to tumour histopathology and survival of patients.

Cent Afr J Med 49: 122-126, 2003

[101] Arnould L et al

Evaluation immunohistochimiques des récepteurs hormonaux en routine : comment assurer la relève?

bulletin de la division française de l'académie internationale de pathologie 2000 ; 32 : 17-21

[102] Jennifer A et al

Breast cancer risk factors according to joint estrogen receptor and progesterone receptor status.

Cancer Detection and Prevention 29 (2005) 419-426

[103] Offersen BV et al

A comparison among HER2, TP53, PAI-1, angiogenesis, and proliferation activity as prognostic variables in tumours from 408 patients diagnoses with early breast cancer.

Acta Oncologica, 2008; 47: 618-632

[104] M. Espie, P.H. Cottu

Cancer du sein de la femme jeune : problèmes et questions

Pathologie Biologie 51 (2003) 391-392

[105] Barrett C. et al

Amplification of the HER-2 gene in breast cancers testing 2+ weak positive by herceptest TM immunohistochemistry: false positive or false negative IHC?

Doi: 10.1136/JCP. 2006.039602

[106] El saghir NS et al

Effects of young age at presentation on survival in breast cancer.

BMC cancer 2006 Jul Vol 20. 6:194

[107] Christopher C. Benz

Impact of aging on the biology of breast cancer

Critical Reviews in Oncology/Hematology 66 (2008) 65-74

[108] Zafrani B et al

High sensitivity and specificity of immunohistochemistry for the detection of hormone receptors in breast carcinoma: comparison with biochemical determination in a prospective study of 793 cases.

Histopathology 2000, 37: 536-545

[109] Anderson WF et al

Tumor variants by hormone receptor expression in white patients with node-negative breast cancer from the surveillance, epidemiology and end results database.

J Clin Onc. 2001, 19: 18-27.

[110] Bamberger AM et al

Progesterone receptors isoforms, PR-B and PR-A , IN BREAST CANCER: correlations with clinicopathologic tumor parameters and expression of AP-1 factors.

Horm Res 2000, 54: 32-7

[111] Kiliç N et al

P53, c-erbB-2 expression and steroid hormone receptors in breast carcinoma: correlations with histopathological parameters.

Eur J Gynecol Oncol 2004, 26: 606-10

[112] Sayed K et al

Progesterone receptor by immunohistochemistry and clinical outcome in breast cancer: a validation study

Modern pathology (2004) 17, 1545-1554

[113] M. Colleoni, V. Bagnardi, N. Rotmensz et al.,

Increasing steroid hormone receptors expression defines breast cancer subtypes non responsive to preoperative chemotherapy, Breast Cancer Res Treat (2008).

[114] M.C. Mathieu, R. Rouzier, A. Llombart-Cussac et al.,

The poor responsiveness of infiltrating lobular breast carcinomas to neoadjuvant chemotherapy can be explained by their biological profile, Eur J Cancer 40 (2004), 342-351.

[115] P. Rosen,

Rosen's Breast Pathology, First ed., Lippincott-Raven, 1997.

[116] Jennet M et al

Estrogen receptor status by immunohistochemistry is superior to the ligand binding assay for predicting response to adjuvant endocrine therapy in breast cancer.

J. of Clin. Oncol, Vol 17, Issue 5 (May), 1999: 1474

[117] Stierer M. et al

Immunohistochemical and biochemical measurement of estrogen and progesterone receptors in primary breast cancer correlation of histopathology and prognostic factors.

Ann of Surgery, Vol 218, N° 1, 13-21 1993

[118] Penault Llorca F.

Cancer du sein et HER2

Edition John Libbey, 2003

[119] Joseph P. et al

A data model to predict HER2 status in breast cancer based on the clinical and pathologic profiles of a large patient population at a single institution

The Breast (2006) 15, 728-735

[120] Rhodes Antony et al

Evaluation of HER-2/neu Immunohistochemical assay sensitivity and scoring on formalin-fixed and paraffin-processed cell lines and breast tumors.

Am J Clin Pathol 2002; 118: 408-417

[121] Bilous M et al

Predicting the HER2 status of breast cancer from basic histopathology data: an analysis of 1500 breast cancers as part of the HER2000 international study.

The breast, Vol 12, Issue 2, April 2003, pp 92-98

[122] Rasmussen BB

Evaluation of and quality assurance in HER2 analysis in breast carcinomas from patients registered in Danish breast cancer group (DBCG) in the period of 2002-2006. a nationwide study including correlation between HER-2 status and other prognostic variables.

Acta oncologica, 2008; 47: 784-788

[123] Boussen H et al

Inflammatory breast cancer in Tunisia: reassessment of incidence and clinicopathological features.

Semin Oncol 2008, (35): 17-24

[124] Zsuzsanna Vargaa, Elizabeth Mallon

Histology and Immunophenotype of Invasive Lobular Breast Cancer. Daily Practice and Pitfalls

Breast Disease 30 (2008,2009) 15-19 15 DOI 10.3233/BD-2009-0278 IOS Press

[125] Hoff ER et al

HER-2/neu amplification in breast cancer: stratification by tumor type and grade .

Am J Clin Pathol 2002, 117: 916-921

[126] Moriki T et al

Histological grade in invasive ductal carcinoma of breast correlates with the proliferative activity evaluated by BrdU: an immunohistochemical study including correlations with p53, c-erbB-2 and estrogen receptor status.

Pathol Int 1996, 46: 417-25

[127] Eliss MJ, Tao Y, Murray J et al

Estrogen-independent proliferation is present in estrogen-receptor HER-2 positive primary breast cancer after neoadjuvant letrozole.

J Clin Oncol 2006; 24: 3019-3025

[128] Natasa Todorovic-Rakovic

TGF- $\beta$ 1 could be a missing link in the interplay between ER and HER-2 in breast cancer

Medical Hypotheses (2005) 65, 546-551

[129] Adith A. Perez, MD, Patrik C. Roche, PhD et al

HER 2 Testing in Patients With Breast Cancer : poor correlation Between Weak positivity by Immunohistochemistry and Gene Amplification by Fluorescence In Situ Hybridization

2002 Mayo Foundation for Medical Education and Research