

Comparaison de l'évaluation des récepteurs hormonaux, du Ki67 et de Her2 par le kit STRAT4 (RT-qPCR) et l'immunohistochimie dans le cancer du sein.

Charlyne Bel

▶ **To cite this version:**

Charlyne Bel. Comparaison de l'évaluation des récepteurs hormonaux, du Ki67 et de Her2 par le kit STRAT4 (RT-qPCR) et l'immunohistochimie dans le cancer du sein.. Médecine humaine et pathologie. 2019. dumas-02383163

HAL Id: dumas-02383163

https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-02383163

Submitted on 27 Nov 2019

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UFR DE MÉDECINE
ET DES PROFESSIONS PARAMÉDICALES
Université Clermont Auvergne

N°

UNIVERSITÉ CLERMONT AUVERGNE

UFR DE MÉDECINE ET DES PROFESSIONS PARAMÉDICALES

THÈSE D'EXERCICE

pour le

DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN MÉDECINE

par

BEL Charlyne

Présentée et soutenue publiquement le 05/07/2019

Comparaison de l'évaluation des récepteurs hormonaux, du Ki67 et de Her2 par le kit STRAT4 (RT-qPCR) et l'immunohistochimie dans le cancer du sein.

Directeur de thèse : Madame TIXIER Lucie, Docteur, CJP Clermont Ferrand, service d'anatomo-pathologie.

Président du jury : Madame PENAULT-LLORCA Frédérique, Professeur, UFR de Médecine et des Professions paramédicales de Clermont-Ferrand

Membres du jury : Monsieur KEMENY Jean-Louis, Professeur, UFR de Médecine et des Professions paramédicales de Clermont-Ferrand

Madame GODFRAIND Catherine, Professeur, UFR de Médecine et des Professions paramédicales de Clermont-Ferrand

UNIVERSITE CLERMONT AUVERGNE

_____

PRESIDENTS HONORAIRES	: **JOYON** Louis
UNIVERSITE D'AUVERGNE	: **DOLY** Michel
	: **TURPIN** Dominique
	: **VEYRE** Annie
	: **DULBECCO** Philippe
	: **ESCHALIER** Alain
PRESIDENTS HONORAIRES	: **CABANES** Pierre
UNIVERSITE BLAISE PASCAL	: **FONTAINE** Jacques
	: **BOUTIN** Christian
	: **MONTEIL** Jean-Marc
	: **ODOUARD** Albert
	: **LAVIGNOTTE** Nadine
PRESIDENT DE L'UNIVERSITE et	
PRESIDENT DU CONSEIL ACADEMIQUE PLENIER	: **BERNARD** Mathias
PRESIDENT DU CONSEIL ACADEMIQUE RESTREINT VICE-	: **DEQUIEDT** Vianney
PRESIDENT DU CONSEIL D'ADMINISTRATION VICE-	: **WILLIAMS** Benjamin
PRESIDENT DE LA COMMISSION DE LA RECHERCHE	: **HENRARD** Pierre
VICE PRESIDENTE DE LA COMMISSION DE LA FORMATION ET DE LA VIE UNIVERSITAIRE	: **PEYRARD** Françoise
DIRECTEUR GENERAL DES SERVICES	: **PAQUIS** François

✧✧✧✧✧

UFR DE MEDECINE
ET DES PROFESSIONS PARAMEDICALES

DOYENS HONORAIRES	: **DETEIX** Patrice
	: **CHAZAL** Jean
DOYEN	: **CLAVELOU** Pierre
RESPONSABLE ADMINISTRATIVE	: **ROBERT** Gaëlle

LISTE DU PERSONNEL ENSEIGNANT

PROFESSEURS HONORAIRES :

MM. BACIN Franck - BEGUE René-Jean - BOUCHER Daniel - BOURGES Michel - BUSSIERE Jean-Louis - CANO Noël - CASSAGNES Jean - CATILINA Pierre - CHABANNES Jacques – CHAZAL Jean - CHIPPONI Jacques - CHOLLET Philippe - COUDERT Jean - DASTUGUE Bernard - DEMEOCQ François - DE RIBEROLLES Charles - ESCANDE Georges - Mme FONCK Yvette - MM. GENTOU Claude - GLANDDIER Gérard - Mmes GLANDDIER Phyllis - LAVARENNE Jeanine - MM. LAVERAN Henri - LEVAI Jean-Paul - MAGE Gérard - MALPUECH Georges - MARCHEIX Jean-Claude - MICHEL Jean-Luc - MOLINA Claude - MONDIE Jean-Michel - PERI Georges - PETIT Georges - PHILIPPE Pierre - PLAGNE Robert - PLANCHE Roger - PONSONNAILLE Jean - RAYNAUD Elie - REY Michel - Mme RIGAL Danièle - MM. ROZAN Raymond - SCHOEFFLER Pierre - SIROT Jacques - SOUTEYRAND Pierre - TANGUY Alain - TERVER Sylvain - THIEBLOT Philippe - TOURNILHAC Michel - VANNEUVILLE Guy - VIALLET Jean-François - Mle VEYRE Annie

PROFESSEURS EMERITES :

MM. - BEYTOUT Jean - BOITEUX Jean-Paul - BOMMELAER Gilles - CHAMOUX Alain - DAUPLAT Jacques - DETEIX Patrice - ESCHALIER Alain - IRTHUM Bernard - JACQUETIN Bernard - KEMENY Jean-Louis – Mme LAFEUILLE Hélène – MM. LEMERY Didier - LESOURD Bruno - LUSSON Jean-René - RIBAL Jean-Pierre

PROFESSEURS DES UNIVERSITES-PRATICIENS HOSPITALIERS

PROFESSEURS DE CLASSE EXCEPTIONNELLE

M.	VAGO Philippe	Histologie-Embryologie Cytogénétique
M.	AUMAITRE Olivier	Médecine Interne
M.	LABBE André	Pédiatrie
M.	AVAN Paul	Biophysique et Traitement de l'Image
M.	DURIF Franck	Neurologie
M.	BOIRE Jean-Yves	Biostatistiques, Informatique Médicale et Technologies de Communication
M.	BOYER Louis	Radiologie et Imagerie Médicale option Clinique
M.	POULY Jean-Luc	Gynécologie et Obstétrique
M.	CANIS Michel	Gynécologie-Obstétrique
Mme	PENAULT-LLORCA Frédérique	Anatomie et Cytologie Pathologiques
M.	BAZIN Jean-Etienne	Anesthésiologie et Réanimation Chirurgicale
M.	BIGNON Yves Jean	Cancérologie option Biologique
M.	BOIRIE Yves	Nutrition Humaine
M.	CLAVELOU Pierre	Neurologie
M.	DUBRAY Claude	Pharmacologie Clinique
M.	GILAIN Laurent	O.R.L.

M.	LEMAIRE Jean-Jacques	Neurochirurgie
M.	CAMILLERI Lionel	Chirurgie Thoracique et Cardio-Vasculaire
M.	DAPOIGNY Michel	Gastro-Entérologie
M.	LLORCA Pierre-Michel	Psychiatrie d'Adultes
M.	PEZET Denis	Chirurgie Digestive
M.	SOUWEINE Bertrand	Réanimation Médicale
M.	BOISGARD Stéphane	Chirurgie Orthopédique et Traumatologie
M.	CONSTANTIN Jean-Michel	Anesthésiologie et Réanimation Chirurgicale
Mme	DUCLOS Martine	Physiologie
M.	SCHMIDT Jeannot	Thérapeutique

PROFESSEURS DE 1ère CLASSE

M.	DECHELOTTE Pierre	Anatomie et Cytologie Pathologique
M.	CAILLAUD Denis	Pneumo-phtisiologie
M.	VERRELLE Pierre	Radiothérapie option Clinique
M.	CITRON Bernard	Cardiologie et Maladies Vasculaires
M.	D'INCAN Michel	Dermatologie -Vénéréologie
Mme	JALENQUES Isabelle	Psychiatrie d'Adultes
Mle	BARTHELEMY Isabelle	Chirurgie Maxillo-Faciale
M.	GARCIER Jean-Marc	Anatomie-Radiologie et Imagerie Médicale
M.	GERBAUD Laurent	Epidémiologie, Economie de la Santé et Prévention
M.	SOUBRIER Martin	Rhumatologie
M.	TAUVERON Igor	Endocrinologie et Maladies Métaboliques
M.	MOM Thierry	Oto-Rhino-Laryngologie
M.	RICHARD Ruddy	Physiologie
M.	RUIVARD Marc	Médecine Interne
M.	SAPIN Vincent	Biochimie et Biologie Moléculaire
M.	BAY Jacques-Olivier	Cancérologie
M.	BERGER Marc	Hématologie
M.	COUDEYRE Emmanuel	Médecine Physique et de Réadaptation
Mme	GODFRAIND Catherine	Anatomie et Cytologie Pathologiques
M.	ROSSET Eugénio	Chirurgie Vasculaire
M.	ABERGEL Armando	Hépatologie
M.	LAURICHESSE Henri	Maladies Infectieuses et Tropicales
M.	TOURNILHAC Olivier	Hématologie
M.	CHIAMBARETTA Frédéric	Ophtalmologie
M.	FILAIRE Marc	Anatomie – Chirurgie Thoracique et Cardio-Vasculaire
M.	GALLOT Denis	Gynécologie-Obstétrique
M.	GUY Laurent	Urologie
M.	TRAORE Ousmane	Hygiène Hospitalière
M.	ANDRE Marc	Médecine Interne
M.	BONNET Richard	Bactériologie, Virologie
M.	CACHIN Florent	Biophysique et Médecine Nucléaire
M.	COSTES Frédéric	Physiologie
M.	FUTIER Emmanuel	Anesthésiologie-Réanimation
Mme	HENG Anne-Elisabeth	Néphrologie
M.	MOTREFF Pascal	Cardiologie
Mme	PICKERING Gisèle	Pharmacologie Clinique

PROFESSEURS DE

2ème CLASSE

Mme CREVEAUX Isabelle	Biochimie et Biologie Moléculaire
M. FAICT Thierry	Médecine Légale et Droit de la Santé
Mme KANOLD LASTAWIECKA Justyna	Pédiatrie
M. TCHIRKOV Andréï	Cytologie et Histologie
M. CORNELIS François	Génétique
M. DESCAMPS Stéphane	Chirurgie Orthopédique et Traumatologique
M. POMEL Christophe	Cancérologie – Chirurgie Générale
M. CANAVESE Fédérico	Chirurgie Infantile
M. LESENS Olivier	Maladies Infectieuses et Tropicales
M. RABISCHONG Benoît	Gynécologie Obstétrique
M. AUTHIER Nicolas	Pharmacologie Médicale
M. BROUSSE Georges	Psychiatrie Adultes/Addictologie
M. BUC Emmanuel	Chirurgie Digestive
M. CHABROT Pascal	Radiologie et Imagerie Médicale
M. LAUTRETTE Alexandre	Néphrologie Réanimation Médicale
M. AZARNOUSH Kasra	Chirurgie Thoracique et Cardiovasculaire
Mme BRUGNON Florence	Biologie et Médecine du Développement et de la Reproduction
Mme HENQUELL Cécile	Bactériologie Virologie
M. ESCHALIER Romain	Cardiologie
M. MERLIN Etienne	Pédiatrie
Mme TOURNADRE Anne	Rhumatologie
M. DURANDO Xavier	Cancérologie
M. DUTHEIL Frédéric	Médecine et Santé au Travail
Mme FANTINI Maria Livia	Neurologie
M. SAKKA Laurent	Anatomie – Neurochirurgie
M. BOURDEL Nicolas	Gynécologie-Obstétrique
M. GUIEZE Romain	Hématologie
M. POINCLOUX Laurent	Gastroentérologie
M. SOUTEYRAND Géraud	Cardiologie

PROFESSEURS DES UNIVERSITES

M. CLEMENT Gilles	Médecine Générale
Mme MALPUECH-BRUGERE Corinne	Nutrition Humaine
M. VORILHON Philippe	Médecine Générale

PROFESSEURS ASSOCIES DES UNIVERSITES

Mme BOTTET-MAULOUBIER Anne	Médecine Générale
M. CAMBON Benoît	Médecine Générale

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS

MAITRES DE CONFERENCES HORS CLASSE

Mme CHAMBON Martine	Bactériologie Virologie
Mme BOUTELOUP Corinne	Nutrition

MAITRES DE CONFERENCES DE 1ère CLASSE

M. MORVAN Daniel	Biophysique et Traitement de l'Image
Mle GOUMY Carole	Cytologie et Histologie, Cytogénétique
Mme FOGLI Anne	Biochimie Biologie Moléculaire
Mle GOUAS Laetitia	Cytologie et Histologie, Cytogénétique
M. MARCEAU Geoffroy	Biochimie Biologie Moléculaire
Mme MINET-QUINARD Régine	Biochimie Biologie Moléculaire
M. ROBIN Frédéric	Bactériologie
Mle VERONESE Lauren	Cytologie et Histologie, Cytogénétique
M. DELMAS Julien	Bactériologie
Mle MIRAND Andrey	Bactériologie Virologie
M. OUCHCHANE Lemlih	Biostatistiques, Informatique Médicale et Technologies de Communication
M. LIBERT Frédéric	Pharmacologie Médicale
Mle COSTE Karen	Pédiatrie
M. EVRARD Bertrand	Immunologie
Mle AUMERAN Claire	Hygiène Hospitalière
M. POIRIER Philippe	Parasitologie et Mycologie
Mme CASSAGNES Lucie	Radiologie et Imagerie Médicale
M. LEBRETON Aurélien	Hématologie

MAITRES DE CONFERENCES DE 2ème CLASSE

Mme PONS Hanaë	Biologie et Médecine du Développement et de la Reproduction
M. JABAUDON-GANDET Matthieu	Anesthésiologie – Réanimation Chirurgicale
M. BOUVIER Damien	Biochimie et Biologie Moléculaire
M. BUISSON Anthony	Gastroentérologie
M. COLL Guillaume	Neurochirurgie
Mme SARRET Catherine	Pédiatrie
M. MAQDASY Salwan	Endocrinologie, Diabète et Maladies Métaboliques
Mme NOURRISSON Céline	Parasitologie - Mycologie

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES

Mme	BONHOMME Brigitte	Biophysique et Traitement de l'Image
Mme	VAURS-BARRIERE Catherine	Biochimie Biologie Moléculaire
M.	BAILLY Jean-Luc	Bactériologie Virologie
Mle	AUBEL Corinne	Oncologie Moléculaire
M.	BLANCHON Loïc	Biochimie Biologie Moléculaire
Mle	GUILLET Christelle	Nutrition Humaine
M.	BIDET Yannick	Oncogénétique
M.	MARCHAND Fabien	Pharmacologie Médicale
M.	DALMASSO Guillaume	Bactériologie
M.	SOLER Cédric	Biochimie Biologie Moléculaire
M.	GIRAUDET Fabrice	Biophysique et Traitement de l'Image
Mme	VAILLANT-ROUSSEL Hélène	Médecine Générale
Mme	LAPORTE Catherine	Médecine Générale
M.	LOLIGNIER Stéphane	Neurosciences – Neuropharmacologie
Mme	MARTEIL Gaëlle	Biologie de la Reproduction
M.	PINEL Alexandre	Nutrition Humaine

MAITRES DE CONFERENCES ASSOCIES DES UNIVERSITES

M.	TANGUY Gilles	Médecine Générale
M.	BERNARD Pierre	Médecine Générale
Mme	ESCHALIER Bénédicte	Médecine Générale
Mme	RICHARD Amélie	Médecine Générale

TABLES DES MATIERES

Liste des abréviations 3

Liste des tableaux, photographies, figures et annexes 5

I INTRODUCTION 8

1.1. Cancer du sein 8

1.1.1. Epidémiologie 8

1.1.2. Principaux types histologiques de carcinome infiltrant 9

1.1.3. Critères histopronostiques 10

1.1.4. Biomarqueurs d'intérêt 12

1.1.4.1. Récepteurs aux œstrogènes (RE) 12

1.1.4.2. Récepteurs à la progestérone (RP) 13

1.1.4.3. L'oncogène HER2 13

1.1.4.4. L'index de prolifération KI67 14

1.1.5. Classification moléculaire 15

1.1.6. Signature moléculaire 18

1.2. Évaluation des biomarqueurs 21

1.3. Limite de la méthode classique IHC/FISH 23

1.4. Objectif de l'étude 25

II MATERIEL ET METHODES 26

2.1. Constitution de la cohorte 26

2.2. Analyse par immunohistochimie 28

2.2.1. Technique 28

2.2.2. Méthode de lecture 29

2.3. Analyse par RT-qPCR à l'aide de GeneXpert Instrument 35

2.4. Analyses statistiques 38

III RESULTATS 39

3.1. Analyse descriptive des données cliniques et histologiques 39

3.2. Étude des concordances entre le lecteur 1 et le lecteur 2 41

3.2.1. Récepteurs aux œstrogènes 41

3.2.2. Récepteurs à la progestérone 42

3.2.3. Her2 43

3.2.4. Ki67 44
3.2.4.1. Entre lecteur 1 et lecteur 2 44
3.2.4.2. Entre lecteur 2 et lecteur 3 46
3.2.4.3. Entre les deux méthodes AFAQAP 47
3.2.4.4. Entre la lecteur 3 et la méthode AFAQAP 47
3.3. Étude des concordances entre lecteur IHC et biologie moléculaire 49
3.3.1. Pour les pièces opératoires 49
3.3.2. Pour les biopsies 52
3.4. Étude des concordances par couple biopsie/pièce opératoire 53
3.5. Étude des discordances entre IHC et biologie moléculaire sur pièce opératoire .. 58

IV. DISCUSSION 62
4.1. Point sur notre étude 62
4.1.1. Population étudiée 62
4.1.2. Concordance IHC/FISH inter observateur 63
4.1.3. Concordance méthode classique/GeneXpert instrument 65
4.1.4. Optimisation des dCt 66
4.1.5. Concordance biopsie/pièce opératoire 67
4.1.6. Choix du gène de ménage 67
4.2. Point sur d'autres études de RT-qPCR 68
4.3. Point sur l'intérêt de Xpert Breast Cancer STRAT4 69
4.4. Point sur le coût des techniques 70

V. CONCLUSION 71

Annexe 1 72
Annexe 2 72
Annexe 3 75
Annexe 4 76
Annexe 5 77
Annexe 6 80
Annexe 7 81
Bibliographie 82
Serment d'Hippocrate 90

Liste des abréviations

ADN : acide désoxyribonucléique

ADNc : acide désoxyribonucléique complémentaire

AFAQAP : association française d'assurance qualité en anatomie et cytologie pathologique

AJCC : comité mixte américain sur le cancer

ARN : acide ribonucléique

ARNm : acide ribonucléique messager *ASCO* : société américaine d'oncologie clinique

CAP : collège de pathologiste américain

CEN17 : centromère du chromosome 17

CINS : carcinome infiltrant non spécifique

CS : cancer du sein

Ct : cycle seuil

CYFIP1 : protéine d'interaction cytoplasmique (gène de référence)

DAPI : Di Aminido Phenyl Indol

dCt : delta cycle seuil

ESMO : société européenne d'oncologie médicale

ERBB2: Human Epidermal Growth Factor Receptor2 (gène)

ESR1 : Récepteur aux œstrogènes 1 (gène)

FISH : hybridation in situ par fluorescence

FFPE : fixé au formol et enrobé de paraffine

GATA3 : facteur de transcription, GATA Binding Protein 3

GEFPICS : Groupe d'étude des facteurs pronostiques immunohistochimiques dans le cancer du sein

Her2 : récepteur au facteur de croissance épidermique humain 2

HPS : Hématoxyline Phloxine Safran

IHC : immunohistochimie

Ki67 : index de prolifération

mMKi67 : index de prolifération ARNm

OMS : organisation mondiale de la santé

PCR : réaction de polymérisation en chaine

PGR : récepteur à la progestérone (gène)

préD : pré dilution

RE : récepteur aux œstrogènes

RP : récepteur à la progestérone

Réf. : référence

ROC : receiving operator characteristic

RT : rétro transcription

RT-qPCR : PCR (réaction en chaîne par polymérase) quantitative à partir d'un échantillon d'ARN rétrotranscrit.

SEM : Statistics Epidemiology Medicine

SBR : score de SCARFF, BLOOM et RICHARDSON

TNM : Système de classification des tumeurs selon trois critères qualifiant l'évolution de la maladie : T = taille de la tumeur primaire N = atteinte éventuelle des ganglions lymphatiques M = présence éventuelle de métastases

VPN : valeur prédictive négative

VPP : valeur prédictive positive

Liste des tableaux, photographies, figures et annexes

Tableaux :

Tableau I : Grading SBR (Scarff-Bloom-Richardson) modifié par Elston et Ellis

Tableau II : Classification intrinsèque par immunohistochimie selon Saint-Gall 2013

Tableau III : Tableau comparatif des quatre signatures moléculaires

Tableau IV : Récapitulatif des procédures immunohistochimiques

Tableau IV : Comparaison RE en IHC sur pièce opératoire entre Lecteur 1 et Lecteur 2

Tableau V : Comparaison RP en IHC sur pièce opératoire entre Lecteur 1 et Lecteur 2

Tableau VI : Comparaison Her2 en IHC sur pièce opératoire entre Lecteur 1 et Lecteur 2

Tableau VII : Comparaison Ki67 en IHC sur pièces opératoires entre Lecteur 1 et Lecteur 2

Tableau VIII : Comparaison Ki67 en IHC entre Lecteur 2 et Lecteur 3

Tableau IX : Comparaison résultats RE pièce opératoire entre résultats obtenus en IHC et en biologie moléculaire

Tableau X : Comparaison résultats RP pièce opératoire entre résultats obtenus en IHC et en biologie moléculaire

Tableau XI : Comparaison résultats Her2 pièce opératoire entre résultats obtenus en IHC/FISH et en biologie moléculaire

Tableau XII : Comparaison résultats Ki67 pièce opératoire entre résultats obtenus en IHC et en biologie moléculaire

Tableau XIII : Comparaison résultats RE en IHC entre pièce opératoire et biopsie

Tableau XIV : Comparaison résultats RE pièce opératoire / biopsie en biologie moléculaire

Tableau XV : Comparaison résultats RP en IHC entre pièce opératoire et biopsie

Tableau XVI : Comparaison résultats RP pièce opératoire / biopsie en biologie moléculaire

Tableau XVII : Comparaison résultats Ki67 en IHC entre pièce opératoire et biopsie

Tableau XVIII : Comparaison résultats Ki67 pièce opératoire / biopsie en biologie moléculaire

Photographies :

Photographie 1 : Carcinome infiltrant non spécifique grade II SBR- III MSBR HPS X200

Photographie 2 : Exemple de marquage IHC nucléaire par RE : positif (100%,3+, Allred 8) x200

Photographie 3 : Exemple de marquage IHC membranaire par Her2 : du score 0 au score 3+

Figures :

Figure 1 : Heat map des différents sous types moléculaires du cancer du sein

Figure 2 : Méthode de calcul du score d'Allred

Figure 3 : Algorithme pour l'évaluation du statut HER2 en IHC selon recommandations de l'ASCO 2018

Figure 4 : Algorithme pour l'évaluation du statut HER2 en FISH selon recommandations de l'ASCO 2013

Figure 5 : Exemple de découpage d'une tumeur hétérogène avec 3 niveaux d'index ki67

Figure 6 : Méthode A et B sur le site de l'AFAQAP

Figure 7 : Exemple d'un tracé de fluorescence de q-PCR

Figure 8 : Exemple de graphique généré par le logiciel de GeneXpert

Figure 9 : Données TNM de l'étude

Figure 10 : Données histologiques de l'étude

Figure 11 : Résumé grade SBR de l'étude

Figure 12 : Répartition des biomarqueurs dans notre population

Figure 13 : Équation de régression : Y = 0.9056 * X -0.03967 pour Her2

Figure 14 : Équation de régression : Y = 0.927 * X + 1.142 pour Ki67 lecteur 1/2

Figure 15 : Graphe de Bland et Altman pour Ki67 lecteur 1/2

Figure 16 : Équation de régression : Y = 0.9297 * X + 1.811 pour Ki67 lecteur 2/3

Figure 17 : Équation de régression : Y = 1.026 * X + 0.838 pour Ki67 AFAQAP/lecteur 3

Figure 18 : **Graphe Bland et Altman avec une différence moyenne de -1.32 ± 4.1**

Figure 19 : Équation de régression : Y = 0.05534 * X -4.428 pour Ki67

Figure 20 : Courbe ROC pour le calcul dCt optimal pour les RP

Figure 21 : Courbe ROC pour le calcul dCt optimal pour Her2

Figure 22 : Courbe ROC pour le calcul du pourcentage IHC optimal pour le Ki67

Annexes :

Annexe 1 : Courbe traçant l'évolution de l'incidence et de la mortalité de 1980 à 2012 en France par cancer mammaire

Annexe 2 : Classification OMS 2012 des cancers du sein

Annexe 3 : Classification TNM du cancer du sein OMS 2012

Annexe 4 : Exemple d'arbre décisionnel thérapeutique pour un cancer du sein de sous type moléculaire Luminal

Annexe 5 : Différentes étapes de la manipulation fournie dans le manuel de la société Cepheid®

Annexe 6 : Matériels et réactifs utiles pour effectuer l'analyse avec GeneXpert Instrument

Annexe 7 *:* Nouvelles recommandations de l'ASCO 2018 pour l'évaluation du statut HER2 FISH

I. INTRODUCTION

1.1. Cancer du sein

1.1.1. Épidémiologie

Le cancer du sein est le plus fréquent des cancers de la femme en France avec une incidence de 58 968 cas en 2017. Avec 12 000 décès par an, il s'agit du deuxième cancer en termes de mortalité. [1]

L'incidence a fortement augmenté au cours de ces dernières décennies ; augmentation en partie liée au développement du dépistage. Néanmoins, la survie à 5 ans, standardisée sur l'âge, s'améliore au cours du temps (Annexe 1). Elle est passée de 80 % entre 1989 et 1993 à 87 % entre 2005 et 2010.

Cela s'explique notamment par l'amélioration des traitements et par un dépistage organisé. Ce dernier consiste en une mammographie tous les deux ans, proposée en France aux femmes âgées de 50 à 74 ans. Ce dépistage mammographique a fait les preuves de son efficacité et permet de diagnostiquer ces cancers à un stade précoce [2]. Plusieurs études ont montré une réduction de la mortalité par cancer du sein de l'ordre de 30 % chez les femmes participant aux programmes, par rapport à celles qui n'ont eu aucun dépistage. [3]

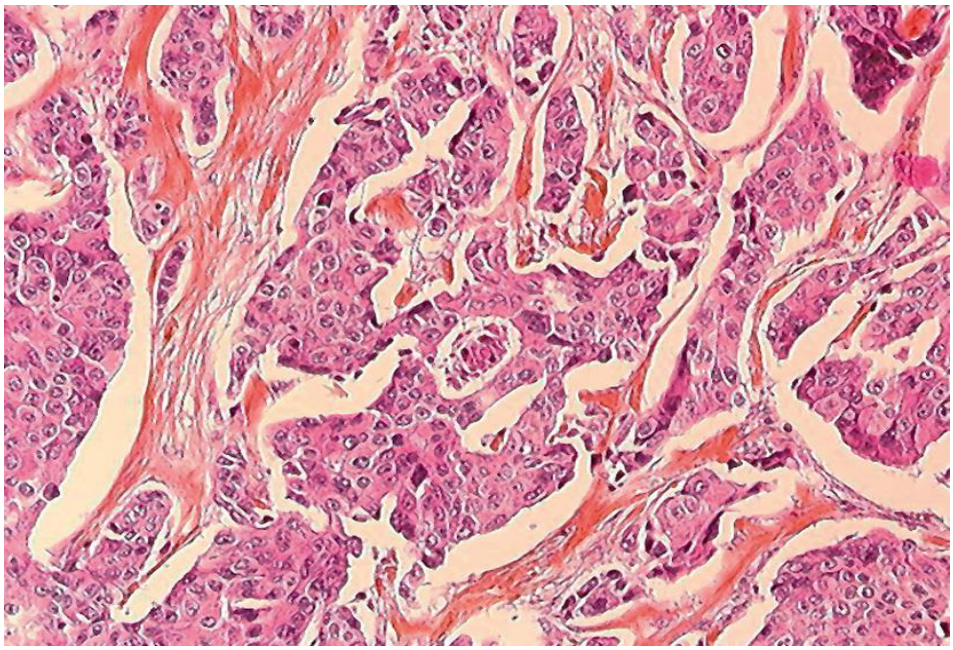
Les principaux facteurs de risque connus du cancer du sein sont l'âge, l'obésité, la prédisposition génétique, des antécédents personnels de lésions mammaires dites « à risque » et une longue exposition aux œstrogènes au cours de la vie.

Ainsi ont été décrites les expositions hormonales endogènes prolongées (puberté précoce, nulliparité, âge tardif de la première grossesse, ménopause tardive ...) et exogènes (traitement hormonal substitutif de la ménopause/ contraception orale).[4] [1]

1.1.2. Principaux types histologiques de carcinome infiltrant

La classification de l'OMS 2012 des carcinomes infiltrants du sein définit 41 entités. Cette classification repose sur des caractéristiques morphologiques et phénotypiques, complétées par des altérations moléculaires. (Annexe 2)

La forme la plus fréquente de carcinomes infiltrants est le carcinome de type non spécifique. Il représente à lui seul 80% des carcinomes mammaires.[5]



Photographie 1 : carcinome infiltrant non spécifique grade II SBR- III MSBR, HPS X200

Le second type représentant 5 à 15% des cancers infiltrants du sein est le carcinome lobulaire.[6] Son incidence est en augmentation chez les femmes de plus de 50 ans et serait lié au développement de l'hormonothérapie substitutive de la ménopause.[7] [8]

Enfin, sont décrits les carcinomes dits de types spéciaux représentant de 0,01 à 5% des cas (carcinome médullaire, micro papillaire invasif, sécrétant, carcinome métaplasique, à polarité

inversée, salivary gland like…), certains étant de bon pronostic (carcinome tubuleux, mucineux, adénoïde kystique et cribriforme).

1.1.3. Critères histopronostiques

Le rôle des facteurs histopronostiques est de fournir aux cliniciens des indications sur l'agressivité de la tumeur. Ils devront ainsi évaluer le risque de rechute locale ou métastatique encouru par les patientes et adapter au mieux le traitement.[9]

Parmi les critères histopronostiques majeurs, sont retrouvés la taille histologique (pT), le statut ganglionnaire (pN), le type histologique, la présence ou non d'emboles vasculaires et le grade histologique (Annexe 3 : TNM). Ce dernier est déterminé grâce au score de SCARFF, BLOOM et RICHARDSON (SBR), modifié par Elston et Ellis [10]. Il prend en compte trois critères : la différenciation architecturale (en fonction du pourcentage de glandes), l'anisocaryose (faible, modérée, forte), et le nombre de mitoses rapportées sur 10 champs au grossissement, x400. Chaque critère est coté de 1 à 3. L'addition de ces trois chiffres donne le grade. Il y a trois grades histologiques de malignité : grade I (bas grade : de 3 à 5), grade II (grade intermédiaire : 6 /7), et grade III (haut grade : 8/9), comme cela est représenté dans le tableau suivant.[11]

1. Différenciation tubulo-glandulaire : proportion de tubes ou glandes dans la tumeur (en % de surface tumorale)	**Score**
>75 % : tumeur bien différenciée	1
10 à 75 % : tumeur moyennement différenciée	2
<10 % : tumeur peu différenciée	3
2. Pléomorphisme nucléaire : degré d'atypie apprécié sur la population tumorale prédominante	
Noyaux petits, réguliers, uniformes	1
Pléomorphisme modéré	2
Variations marquées de taille, de forme, avec nucléoles proéminents	3
Nombre de mitoses (à compter sur 10 champs au grossissement x400 ; valeurs définies pour un champ de 0,48 mm de diamètre ; calibrage du microscope nécessaire pour des champs différents)	
0 à 6 mitoses	1
7 à 12 mitoses	2
>12 mitoses	3
AU TOTAL	
Grade I	3 ou 4 ou 5
Grade II	6 ou 7
Grade III	8 ou 9

Tableau I : Grading SBR (Scarff-Bloom-Richardson) modifié par Elston et Ellis

1.1.4. Biomarqueurs d'intérêt

1.1.4.1. Récepteurs aux œstrogènes (RE)

Il s'agit d'une protéine de la super famille des récepteurs nucléaires. Il en existe deux sous types, RE alpha et RE béta, codés par deux gènes distincts, *ESR1* et *ESR2*. REα a une activité nucléaire de facteur de transcription en régulant la transcription de gènes cibles en réponse au 17β-œstradiol.[12]

Le rôle de RE béta est encore mal connu. [13]

Le statut des récepteurs aux œstrogènes est le marqueur prédictif négatif le plus puissant dans le traitement hormonal du cancer du sein avec une bonne corrélation à la réponse thérapeutique si positif.[14] C'est un traitement qui consiste à bloquer l'action stimulante des hormones féminines sur les cellules cancéreuses. Il est prescrit en cas de positivité des récepteurs aux œstrogènes, selon le seuil défini.[15]

Les traitements utilisés seront différents selon le statut hormonal de la patiente : ménopausée/non ménopausée. Chez la femme non ménopausée (au diagnostic), le standard est le tamoxifène pendant 5 ans (anti-oestrogènes).

Chez la femme ménopausée (au diagnostic), les molécules utilisées font partie de la classe des inhibiteurs de l'aromatase (IA).[16]

1.1.4.2. Récepteurs à la progestérone (RP)

Le récepteur de la progestérone est également un membre de la superfamille des récepteurs nucléaires, jouant le rôle de facteurs de transcription. Son activité dépend de la liaison à un ligand, la progestérone. Il est codé par le gène humain *PGR* (localisation chromosomique : 11q2.2) dont la transcription est régulée en particulier par RE alpha.[17]

RP est un bon facteur prédictif. Près de 50% de toutes les tumeurs RE positifs seraient également RP positifs et environ 75% de ces tumeurs RE/RP positifs répondent favorablement au traitement endocrinien par hormonothérapie vu ci-dessus. Il s'agit également d'un important facteur pronostique.[18]

1.1.4.3. L'oncogène HER2

Le gène *ERBB2* ou *HER2* (Human epidermal growth factor receptor) est localisé sur le bras long du chromosome 17 et code pour une glycoprotéine transmembranaire à activité tyrosine-kinase. Cette protéine est un récepteur de facteur de croissance cellulaire. Elle intervient notamment dans la transduction des signaux de prolifération et de différenciation cellulaire. L'activation de l'oncogène *HER2* passe par une amplification génique et se traduit par une surexpression protéique.[19]

La détermination du statut HER2 est capitale. Il s'agit d'un bon marqueur prédictif négatif de réponse aux anticorps monoclonaux [20] et, pour certains auteurs, d'un marqueur pronostique.[21] Cet oncogène serait associé à des tumeurs d'une plus grande agressivité et propension métastatique. [22]

Environ 15% des cancers du sein précoces sont HER2 positifs [21]. Le traitement de référence à la phase précoce est le trastuzumab associé à une chimiothérapie.[23]

Il s'agit d'un anticorps monoclonal anti-HER2, humanisé, qui va spécifiquement bloquer la prolifération des cellules sur-exprimant HER2. Ce traitement, associé à la chimiothérapie, a permis une nette amélioration de la survie globale de ces patientes.[20]

1.1.4.4. L'index de prolifération KI67

Le Ki67 est une protéine nucléaire non histone de 360 kDa qui a été décrite dans une lignée cellulaire dérivée de cellules lymphomateuses hodgkiniennes en Allemagne (Kiel = Ki, 67 : numéro du clone). Le gène correspondant est localisé sur le chromosome 10.[24]
Il est exprimé par les noyaux de toutes les cellules au cours des différentes phases du cycle cellulaire (G1, S, G2 et M), hors G0. Il permet de repérer les cellules non quiescentes, inscrites dans le cycle de prolifération. [25]

Durant la mitose cette protéine est exprimée à la périphérie des chromosomes et agit comme un tensioactif qui permet de maintenir séparés les chromosomes mitotiques. Même si son rôle n'est pas clairement élucidé il est évident qu'il est impliqué dans le contrôle du cycle cellulaire.[26]

L'activité proliférative témoigne de la cinétique tumorale. Elle a une valeur pronostique et prédictive, notamment de la réponse immédiate à une chimiothérapie néo adjuvante[27]. Un indice de Ki-67 élevé (> 14% selon consensus de Saint-Gallen) a également été associé à un pronostic plus sombre et à une récidive précoce (<2 ans). En revanche, un indice de Ki-67 inférieur a été corrélé à un pronostic favorable et une récidive tardive (>10 ans)[28]. Ainsi,

l'activité prolifération telle que déterminée par Ki-67 peut refléter le comportement agressif du cancer du sein et prédire le moment de la récidive. [29][30]

Cependant, dû à la faible reproductibilité du score Ki67, une standardisation de la méthode de scoring est nécessaire [31]. Aujourd'hui, bien que très utilisé, le Ki67 n'apparait pas dans les recommandations internationales (en particulier pour le seuil de positivité qui n'est pas unanimement établi, variant entre 10, 14 et 20%).[32]

1.1.5. Classification moléculaire

Le cancer du sein est une maladie hétérogène, notamment sur le plan moléculaire.

En 2000, Pérou et Sorlie ont révolutionné l'approche diagnostique et thérapeutique de ces tumeurs en proposant leur classification d'après leur portrait moléculaire [33] [34].

Cette classification transcriptomique des cancers mammaires repose sur l'analyse simultanée du niveau d'expression des ARNm de centaines de gènes dans une même tumeur et sur le regroupement de ces dernières en cinq catégories selon leur profil d'expression génique [34] :

- Tumeur de phénotype Luminal A
- Tumeur de phénotype Luminal B
- Tumeur de phénotype Her2 enrichi
- Tumeur de phénotype basal-like
- Tumeur de phénotype Normal Breast-like

Parmi ces cinq catégories, deux grands groupes de tumeurs sont souvent opposés : les tumeurs luminales (A et B) et les autres. Cette dichotomie est basée sur la présence (type Luminal) ou non de l'expression du gène *ESR1,* codant pour l'expression du récepteur aux œstrogènes alpha.

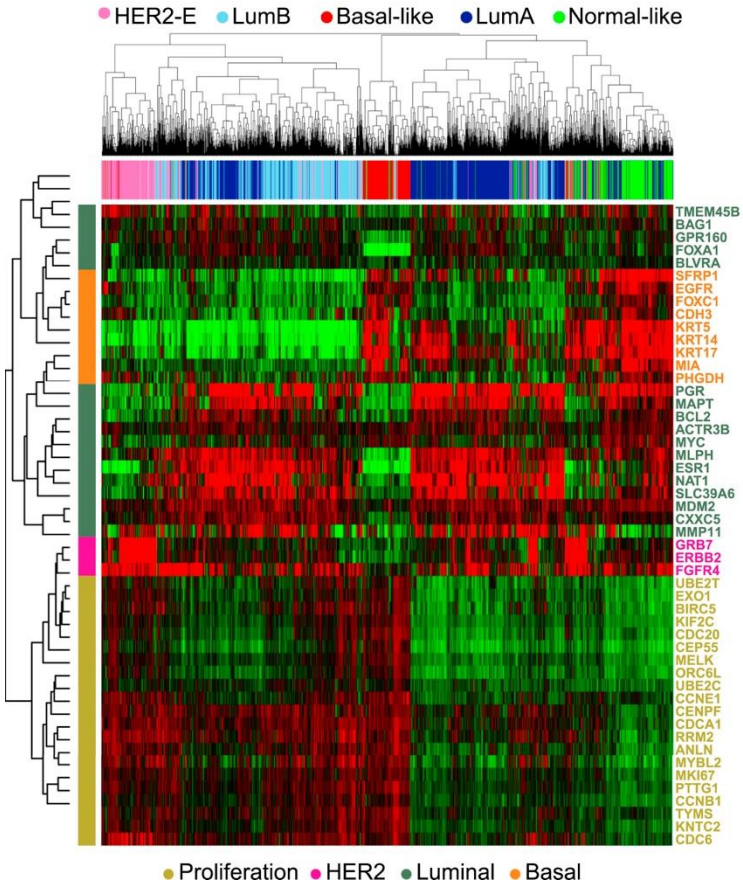


Figure 1 : Heat map des différents sous types moléculaires du cancer du sein.[35]

Par la suite, une classification intrinsèque dite « surrogate », car définie, non pas par le transcriptome, mais sur les paramètres histopathologiques et l'expression protéique détectable en routine par immunohistochimie, a été proposée par Cheang et al.[36] et validée en 2011 à la conférence internationale de Saint-Gallen [37]. Cette classification, plus pratique en routine, utilise les quatre biomarqueurs d'intérêts vus ci-dessus : le récepteur aux œstrogènes (RE), le récepteur à la progestérone (RP), le HER2 et le Ki-67. [38]

Sont ainsi définies quatre catégories par immunohistochimie :

- **Luminal A** (représentant environ 60% des cas de cancers du sein) défini par des récepteurs hormonaux positifs, Her2 négatif et un Ki67 faible.
- **Luminal B** (20%) défini par des RE positifs mais RP négatifs ou faibles et un Ki67 plus élevé. Her2 peut être amplifié.
- **Her2 enrichi** (10 à 12%) défini par un Her2 amplifié et des récepteurs hormonaux négatifs.
- **Basal-like (triple négatif)** (10 à 15%) défini par une absence d'expression des RE, RP et Her2.

La définition de ces quatre catégories par immunohistochimie a été complétée grâce au développement des signatures moléculaires dans le cancer du sein.

En effet, les recommandations de Saint-Gallen 2015 [39] ajoutent la notion de signature moléculaire de « bas risque » dans la définition des tumeurs de type Luminal A. Les tumeurs de type Luminal B sont quant à elles définies par une signature moléculaire à « haut risque ».

Le taux du Ki-67 permet de différencier les sous types luminaux-like A et B.[40]

Le type luminal-like A est le moins agressif. Il se caractérise par une expression élevée de RE/RP et de leurs gènes cibles (*GATA-3, FOXA1*).[41]

Le type luminal-like B à un phénotype plus agressif avec un grade histologique souvent plus élevé, mais une meilleure réponse à la chimiothérapie.[42]

Les sous-types triple négatif et Her2 positif sont de plus mauvais pronostics. [37]

Classification servant aujourd'hui de base pour la prise en charge des patientes :

- Luminal-like : RE+, HER2−
  - A : non proliférative et/ou RP> 20 %
  - B : proliférative et/ou RP bas ou négatif et/ou HER2+
- HER2 enrichi: HER2+, RH−
- Triple négatif: RE−, RP−, HER2−

Tableau II : Classification intrinsèque par immunohistochimie selon Saint-Gallen 2013

Cette classification moléculaire, réalisée à partir des quatre biomarqueurs sus-cités (RE/RP/Ki67/Her2) est un facteur pronostic majeur et guide la prise en charge thérapeutique (Annexe 4). Elle permet d'adapter le traitement à chaque sous-type moléculaire. Cela entraîne une approche plus individuelle en plus des critères standards que sont l'âge, la taille tumorale, le volume mammaire, le grade et le statut ganglionnaire.[39] [43]

1.1.6. Signature moléculaire

L'absence de consensus international évident pour le Ki67 entraîne des ambiguïtés quant à son utilité en tant que facteur pronostique et pour la décision thérapeutique, notamment pour les cas RH+/Her2 - possédant un Ki67 en « zone grise ». En 2018, l'actualisation de la classification AJCC confirme les paramètres suivants comme étant des facteurs pronostiques importants : l'atteinte ganglionnaire, le grade et le statut des récepteurs hormonaux et d' HER2 [44]. Dans la population hormonodépendante, il est rappelé qu'une meilleure évaluation du pronostic est un enjeu important dans un objectif d'optimisation de la prise en charge. Ainsi, la prolifération peut être prise en compte afin d'évaluer le pronostic. Une

prolifération très faible ou très élevée permet de définir respectivement un pronostic plutôt favorable ou défavorable. Cependant, les difficultés de reproductibilité dans une zone considérée comme intermédiaire (15-25 %) ne permettent pas de l'utiliser aisément pour évaluer le pronostic dans ces cas-là. En s'appuyant sur les recommandations de l'AJCC qui considèrent l'addition des paramètres biologiques dans le cancer du sein luminal, les experts retiennent quatre signatures transcriptomiques comme ayant une valeur ajoutée pour l'évaluation du pronostic et la décision thérapeutique (mise en place ou non d'une chimiothérapie).

Ils ont ainsi défini une population « cible » pour les signatures moléculaires pour laquelle il existe une incertitude quant au rapport bénéfice/risque de la chimiothérapie adjuvante, identifiée par les situations suivantes :

Grade 1	T1c, N1	
	ou T2, N0/N1	
Grade 2	< 2 cm et	N0 mais prolifération élevée (Ki67 > 20%) ou présence d'emboles
	2,1-5 cm, N0	
Grade 3	1-2 cm, N0	

Les tests disponibles reposent tous sur la quantification de l'expression de gènes impliqués dans la cancérogénèse, mais divergent sur les méthodes et les cibles utilisées. Il existe quatre signatures moléculaires retenues par les sociétés savantes telles que l'ASCO, Saint-GALLEN, et l'ESMO : Mammaprint®, Oncotype®, Prosigna®, et Endopredict®.

- Mammaprint® de Agendia est une méthode de microarray basée sur l'évaluation de l'expression de 70 gènes. L'information obtenue est le taux de rechute à cinq ans avec

deux catégories (faible risque et haut risque). Cette signature a été validée dans un essai prospectif international (MINDACT) [45]

- Oncotype® de Genomic Health, signature utilisant la RT-qPCR basée sur l'évaluation de l'expression de 21 gènes. L'information obtenue est le taux de rechute à dix ans avec trois catégories (risque faible, intermédiaire ou haut risque). Cette signature a été validée dans deux essais prospectifs (TAILORx et RxPonder) [46][47][48]
- Prosigna® de Nanostring, qui prend en compte l'expression de 50 gènes (N-counter) et intègre à son analyse la taille tumorale et le statut ganglionnaire. Il fournit un risque de récidive à 10 ans, avec également un risque intermédiaire.[49]
- Endopredict® de Myriad Genetics, qui évalue par RT-qPCR l'expression de huit gènes d'intérêt (et trois gènes de ménage) et prend également en compte les caractéristiques clinicopathologiques (taille et envahissement ganglionnaire). Il fournit un risque de récidive à 10 ans avec deux catégories (haut risque et bas risque).[50]

NOM	Mammaprint™	Oncotype DX® Genomic Healtn	Endopredict® Myriad Genetics	Prosigna® Nanostring
TECHNIQUES	Microarray	RT-qPCR	RT-qPCR	N-counter
PARAMETRE PRIS EN COMPTE	70 gènes	21 gènes	8 gènes Taille tumorale Statut ganglionnaire	50 gènes Taille tumorale Statut ganglionnaire
MATERIEL	Bloc tumoral	Bloc tumoral	Bloc tumoral	Bloc tumoral
VALEUR PRONOSTIQUE	Récidive à 5 ans	Récidive à 10 ans	Récidive à 10 ans	Récidive à 10 ans
RESULTATS	Bas Risque Haut Risque	Bas, Intermédiaire ou Haut Risque RS de 0 à 100	Bas Risque Haut Risque EPClin de 0 à 6	Bas, Intermédiaire ou Haut Risque ROR de 0 à 100 Sous type moléculaire

Tableau III : tableau comparatif des quatre signatures moléculaires

1.2. Évaluation des biomarqueurs

En routine, au sein des laboratoires de pathologie, ces biomarqueurs d'intérêt sont évalués, avec des kits standardisés, par immunohistochimie et par FISH (hybridation *in situ* par fluorescence) pour Her2. C'est le gold standard actuel.

- **Récepteurs hormonaux (RE/RP)**

Il s'agit d'un marquage nucléaire. Le résultat est exprimé sous forme de pourcentage (évaluation du nombre de cellules tumorales marquées/nombre de cellules tumorales). On précise également l'intensité du marquage (faible/modérée/intense). Le seuil de positivité utilisé en France est de 10%. Les recommandations de l'ASCO/CAP et de pays étrangers retiennent quant à eux le seuil de 1%. Néanmoins, la pertinence du seuil de 10% a été consolidée par certaines études pour la prescription d'une hormonothérapie. (38)

On peut aussi utiliser le score d'Allred allant de 0 à 8, en additionnant le pourcentage de cellules marquées (de 0 à 5) et leur intensité (de 0 à 3).

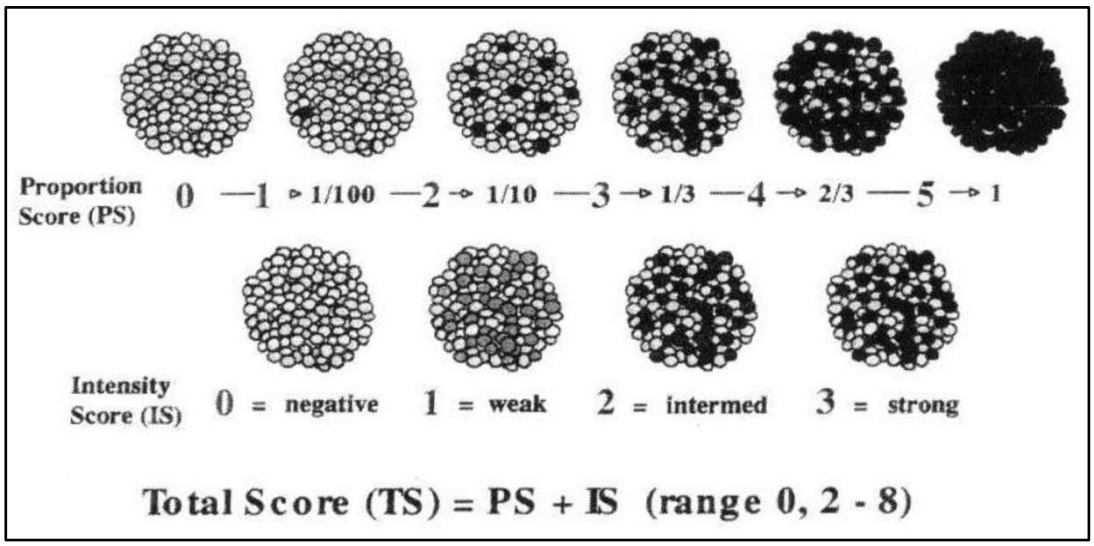


Figure 2 : Méthode de calcul du score d'Allred.

- **HER2**

La définition du statut HER2 doit répondre aujourd'hui aux critères de l'ASCO/CAP 2018 et du GEFPICS 2019. C'est un marquage membranaire. Il faut évaluer le caractère complet ou incomplet du marquage membranaire, son intensité (faible, modérée, forte) et le pourcentage de cellules tumorales marquées. En fonction de ces critères on établit un score entre 0 et 3+. Les cas 0 et 1+ sont dits Her2 non amplifié ; les cas 3+ sont Her2 amplifié. Pour les cas 2+, une étude complémentaire par FISH est nécessaire.

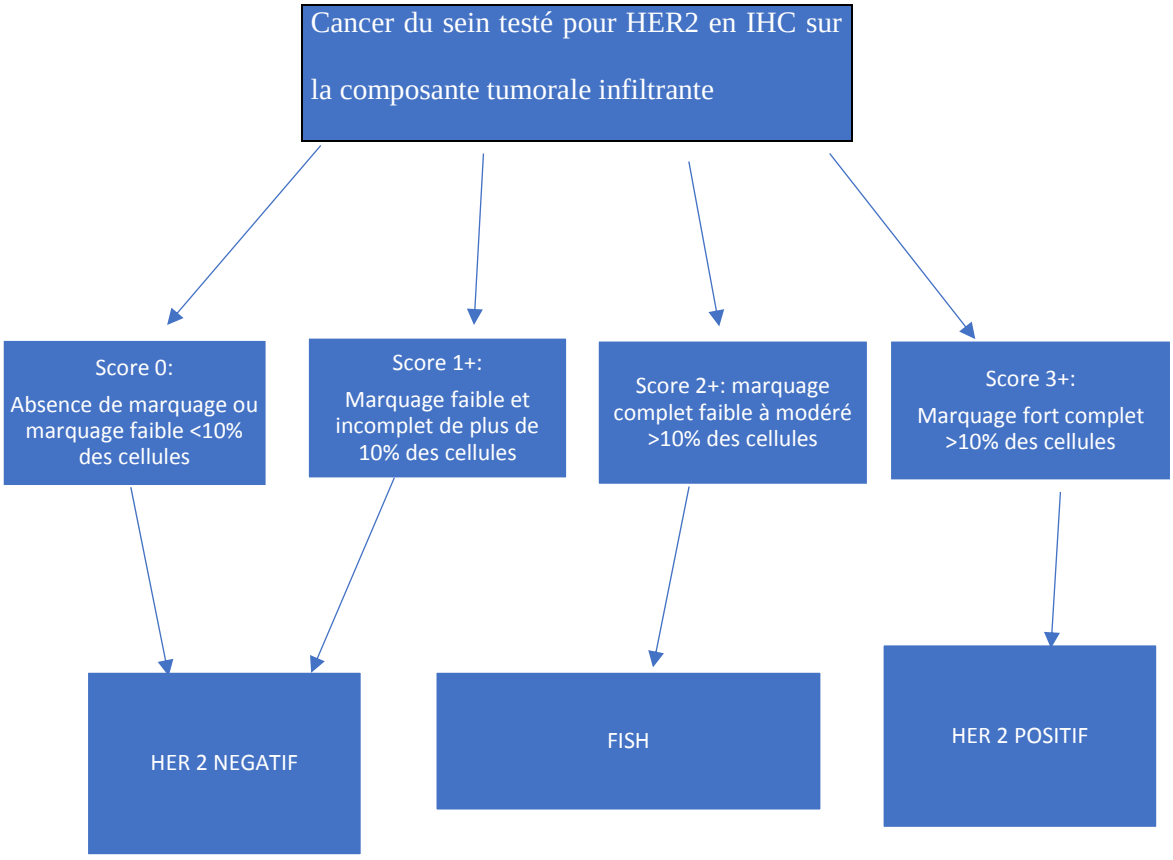


Figure 3 : Algorithme pour l'évaluation du statut HER2 en IHC selon les recommandations de l'ASCO 2018

En hybridation *in situ,* Her2 est dit positif si le nombre de copies du gène *HER2* est ≥ 6 ou si le rapport *HER2* / chromosome 17 (CEP17) est ≥ 2 et copies HER2 ≥ 4. (Annexe 7).

- **Ki67**

Il n'y a pas de réel consensus d'évaluation pour le Ki67 [51]. La valeur seuil pour considérer un Ki67 élevé ne fait pas l'objet d'un consensus international [52]. En France, elle a été fixée à 20%.[53]

Il s'agit d'un marquage nucléaire à apprécier par eyeballing (appréciation appuyée à l'œil au x400) ou par comptage manuel. Il est important de prendre en compte toutes les intensités de marquage. Le résultat est donné en pourcentage de cellules tumorales marquées. En cas d'hétérogénéité du marquage il faut sectoriser la tumeur en deux ou trois surfaces maximums de niveaux d'index différents au faible grossissement et apprécier la part occupée par chaque surface, puis établir chaque index sur un champ représentatif, au fort grossissement.[25]

1.3. Limite de la méthode classique IHC/FISH

Comme nous l'avons vu, la prise en charge thérapeutique du cancer du sein dépend en grande partie de son sous-type moléculaire et donc des 4 biomarqueurs qui le composent. Il est nécessaire que leurs valeurs soient fiables et reproductibles [54]. L'immunohistochimie peut être critiquable sur ces deux points. Pour être fiables, ces techniques demandent du savoir-faire et un bon respect des phases pré-analytiques et analytiques [25] [55].

De même pour l'évaluation du statut Her2, la FISH reste une méthode assez complexe, longue et onéreuse. Elle nécessite également une grande expertise de lecture [56]. De plus 5 à 10%

des carcinomes mammaires testés en FISH Her2 sont classés équivoques selon les recommandations 2013 de l'ASCO/CAP. Cette catégorie, qui a disparu des recommandations 2018, a entrainé de nombreuses problématiques au sujet du traitement du patient et de la mise en place ou non d'une thérapie ciblée.[57]

De nouvelles techniques de quantification de ces quatre biomarqueurs se développent, notamment en biologie moléculaire avec la RT-qPCR. La société Cepheid a mis au point à cet effet un nouvel appareil, GeneXpert Instrument, pour le test Xpert Breast Cancer STRAT4 (STRAT4).

1.4. Objectif de l'étude

Le gold standard actuel est l'immunohistochimie/FISH dans les laboratoires d'anatomie et cytopathologie. Une nouvelle approche par la biologie moléculaire (RT-qPCR) a été récemment développée.

L'objectif principal de cette étude est de comparer les résultats des quatre biomarqueurs RE, RP, HER2 et Ki-67 obtenus par immunohistochimie/FISH et par RT-qPCR à l'aide du kit STRAT4 sur GeneXpert Instrument afin de vérifier leur concordance.

Les objectifs secondaires sont de vérifier la concordance inter-observateurs en immunohistochimie et entre couple biopsie/pièce opératoire.

II. MATERIEL ET METHODES

2.1. Constitution de la cohorte

268 cas de carcinomes canalaires infiltrants diagnostiqués dans le Département de pathologie du Centre Jean Perrin, entre le 08/04/2016 et le 23/07/2018, ont été sélectionnés de manière rétrospective à l'aide du logiciel DIAMIC, spécialisé pour la gestion de données en laboratoire. Il s'agissait de 56 biopsies et 212 pièces opératoires.

Nous avons suivi le protocole de l'étude Xpert Breast Cancer STRAT4 mis au point par la société Cepheid.

Les critères d'inclusion étaient :

- Disposition d'un bloc de tissu FFPE (formalin-fixed paraffin- embedded) ou d'une coupe de tissu provenant d'un excès de tissu non nécessaire pour le management du patient et ne pénalisant pas la conservation réglementaire de tissus pathologiques à visée sanitaire.
- Disposition d'un bloc de tissu FFPE contenant suffisamment de tissu pour réaliser le nombre de coupes nécessaires pour cette étude.
- Disposition d'un bloc de tissu FFPE ou d'une coupe de tissu provenant d'un prélèvement chirurgical (mastectomie, tumorectomie) ou de biopsies initiales du site tumoral mammaire invasif.

Les critères d'exclusion étaient :

- Le bloc de tissu FFPE ou la coupe de tissu contient une zone <5mm^2 de cancer mammaire invasif.
- Le prélèvement a été fixé dans un autre fixateur que du formol à 10%.

Les données suivantes ont été recueillies pour chaque cas grâce au logiciel interne CORA :

- L'âge du patient lors du diagnostic
- Sexe du patient
- L'année du diagnostic du cancer du sein invasif
- Le type histologique
- Stade tumoral (TNM)
- Taille de la tumeur
- Grade de la tumeur
- Statut ganglionnaire
- Les résultats immunohistochimiques des biomarqueurs (RE/RP/Her2/KI67) au diagnostic
- L'existence ou non d'un traitement néo adjuvant

2.2. Analyse par immunohistochimie

2.2.1. Technique

Les blocs de paraffine et les lames correspondant aux dossiers sélectionnés ont été désarchivés.

Lors du diagnostic initial chaque bloc avait été débité au moyen d'un microtome permettant d'obtenir des coupes de 4 à 5 µm d'épaisseur. La coupe avait ensuite été déposée sur une lame adhésive conçue pour l'immunohistochimie (IHC), puis séchée sur une plaque chauffante pendant environ 10 minutes à 56°C. Pour chaque cas la détection immunohistochimique suivante avait été réalisée : RE, RP, KI67, HER2. La réaction antigène/anticorps a été visualisée à l'aide des kits de révélation UltraView DAB (Réf. 760-500, Ventana/Roche Diagnostics, Meylan, France). Les réactions ont été effectuées dans le circuit clos d'un automate BenchMark Ultra (XT) de Ventana. L'ensemble des spécificités techniques de réalisation des immunohistochimies est détaillé dans le tableau suivant.

Anticorps	Source	Clone	Restauration antigénique	Dilution	Temps d'incubation	Marquage retenu
RE	Ventana	SP1	CC2 36 min	PréD	32 min	Nucléaire
RP	Ventana	1E2	CCI 30 min	PréD	20 min	Nucléaire
KI67	Thermo Scientific	SP6	CCI 36 min	1/100	60 min	Nucléaire
HER2	Ventana	4B5	CCI 30 min	PréD	20 min	Membranaire

Tableau IV : Récapitulatif des procédures immunohistochimiques.

2.2.2. Méthode de lecture

Les diagnostics histopathologiques et immunohistochimiques initiaux ont été déterminés par les cinq pathologistes du centre (considérés comme le **lecteur 1**).

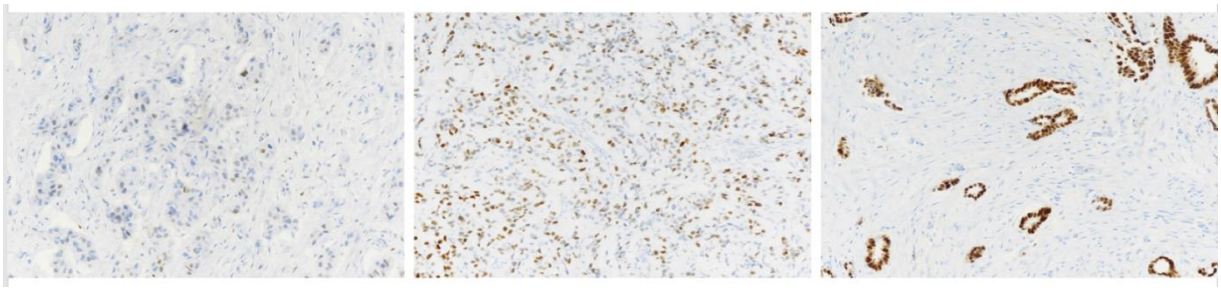
L'ensemble des lames d'immunohistochimie a fait l'objet d'une relecture par un seul pathologiste en aveugle (appelé **lecteur 2**), de la manière suivante :

- **RE/RP :**

Une cellule tumorale est considérée comme positive quand elle montre un marquage nucléaire quelle que soit son intensité.

Pour chaque cas nous avons déterminé le pourcentage de cellules positives (de 0 à 100%) et l'intensité du marquage (faible 1+, modérée 2+ ou forte 3+).

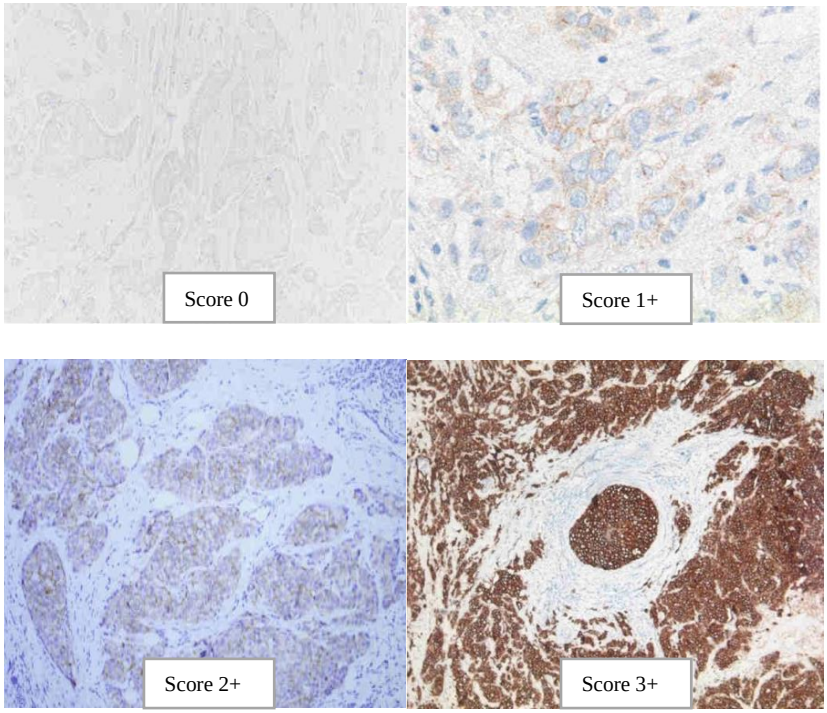
Les cas ont ensuite été classés en positif ou négatif selon un "cut off" de 10% (positif si $\geq 10\%$). En cas d'absence de marquage des cellules tumorales (0%), nous nous sommes assurés de la présence sur la lame d'un témoin interne positif ou d'un témoin externe.



Photographie 2 : Exemple de marquage IHC nucléaire par RE x200 : négatif (5%,1+, Allred 3), positif (70%, 1 à 2+, Allred 6), positif (100%,3+, Allred 8)

- **HER2 :**

Les résultats sont donnés sous forme de score 0, 1+, 2+, et 3+. Nous avons utilisé les anciennes recommandations de l'ASCO/CAP 2013, en raison de la date de l'étude. Les scores 0 et 1+ sont considérés comme négatifs ; les 3+ comme Her2 positifs. Concernant les cas 2+, une évaluation par FISH a été nécessaire pour affirmer ou non l'existence d'une amplification.



Photographie 3 : Exemple de marquage IHC membranaire par Her2 : du score 0 au score 3+

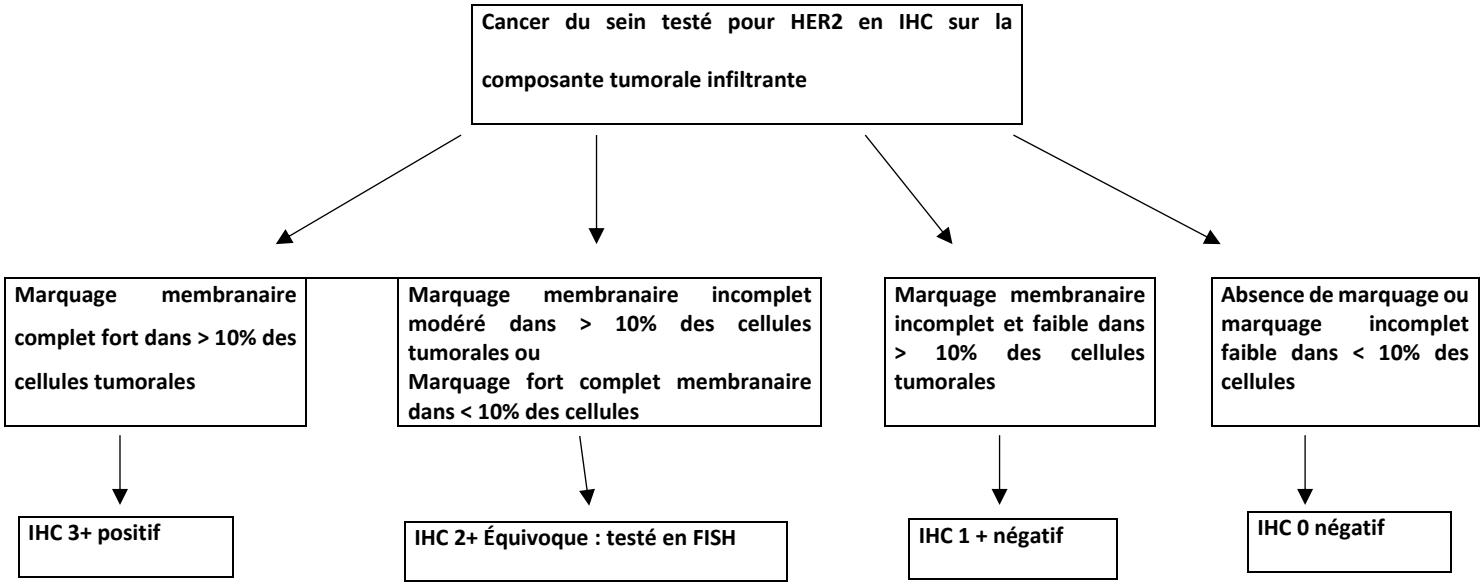


Figure 3 : Algorithme pour l'évaluation du statut HER2 en IHC selon les recommandations de l'ASCO 2013

La technique de FISH a été effectuée sur des coupes de paraffine de 3 μm d'épaisseur en utilisant le kit Zytolight Spec HER2/CEN17 (Zytovision, CliniSciences). Par la suite la fluorescence a été lue par le pathologiste responsable du dossier en utilisant un microscope Leica DMRB à fluorescence. Au minimum 30 noyaux de cellules tumorales ont été analysés, avec vérification de la zone analysée en contre coloration DAPI.

Le ratio HER2/CEN17 est obtenu en divisant le nombre de copie du gène *HER2* par le nombre de CEN 17. L'analyse de l'amplification du gène HER2 est définie comme le montre le schéma suivant, avec une catégorie équivoque, selon les anciennes recommandations de l'ASCO/CAP 2013.[58]

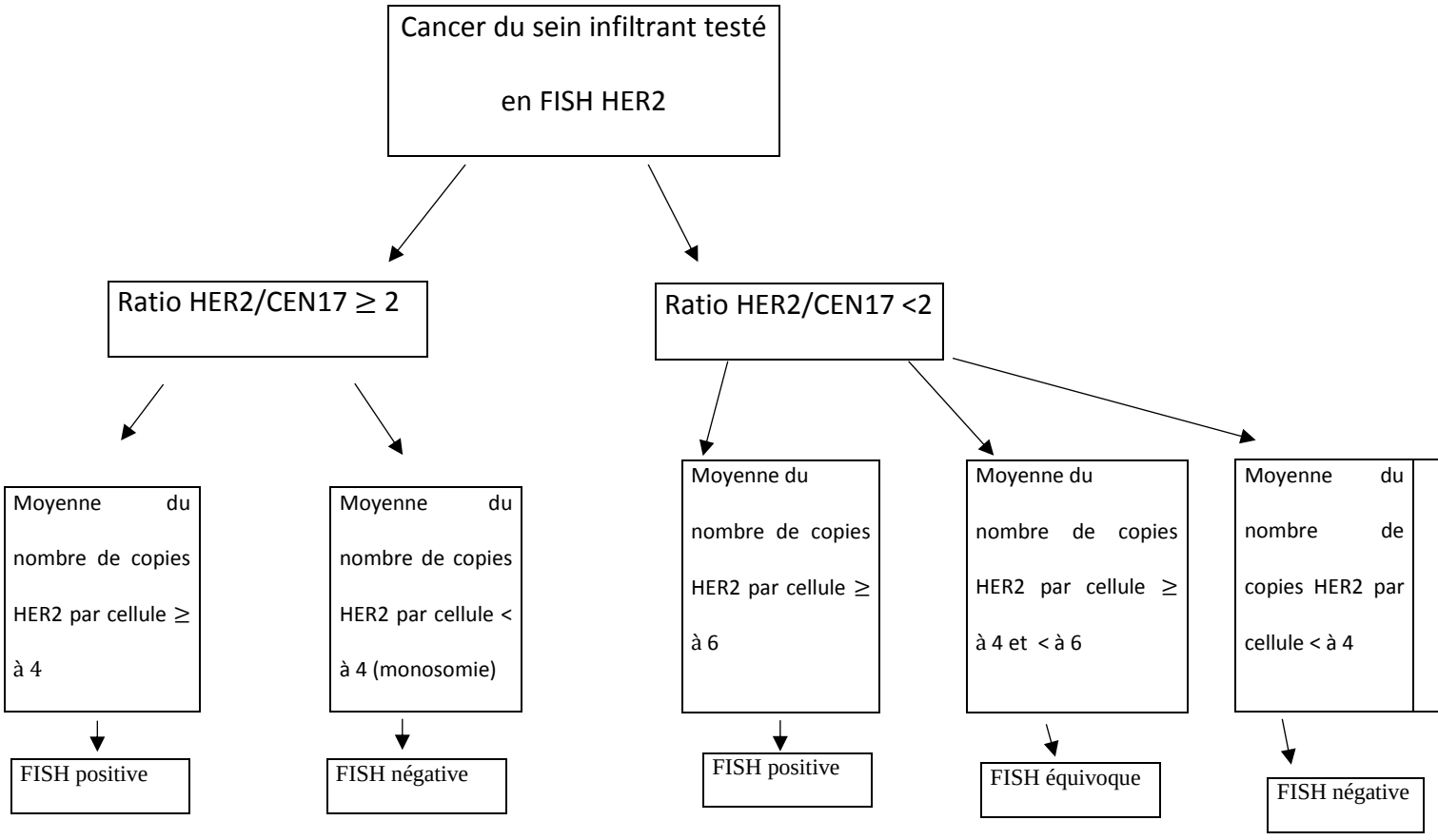


Figure 4 : Algorithme pour l'évaluation du statut HER2 en FISH selon les recommandations de l'ASCO 2013

- **Ki67 :**

L'évaluation du pourcentage de cellules tumorales marquées a été réalisée par eyeballing (appréciation appuyée à l'œil au grossissement X400). C'est un marquage nucléaire. Il faut prendre en compte toutes les intensités de marquage et ne pas se focaliser sur les « hot spots ». Le seuil de positivité retenu est de 20%.[30]

Pour ce biomarqueur, une autre lecture en aveugle a été réalisée par un troisième lecteur appelé **lecteur 3** (évaluation par eyeballing et également par les deux méthodes proposées par l'Association Française d'Assurance Qualité en Anatomie et Cytologie Pathologiques, AFAQAP)

Il s'agit de deux méthodes nommées *méthodes A et B,* développées afin de faciliter et harmoniser le calcul du Ki67 notamment pour les cas hétérogènes.
En cas de tumeur possédant un marquage homogène, la méthode A consiste à effectuer un comptage manuel du nombre de cellules tumorales marquées par le Ki67 et du nombre total de cellules tumorales sur un champ représentatif au X400, sachant qu'à ce grandissement une tumeur modérément cellulaire comporte environ 500 à 700 cellules tumorales.
Pour la méthode B, on réalise un comptage manuel du nombre de cellules tumorales marquées par le Ki67 et du nombre de cellules tumorales non marquées sur un champ représentatif au X400.

En cas d'hétérogénéité du marquage tumoral (par plages) on sectorise la tumeur en deux ou trois zones de niveaux d'index différents au faible grossissement et apprécie la part occupée

par chaque territoire. Le calcul est ensuite effectué par le logiciel en ligne fourni par le site de l'AFAQAP.

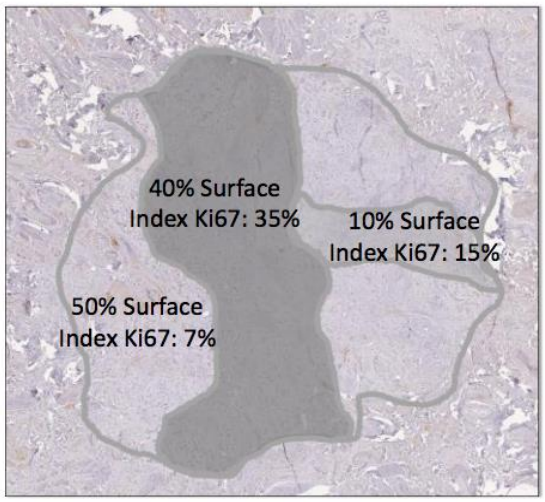


Figure 5 : Exemple de découpage d'une tumeur hétérogène avec 3 niveaux d'index ki67.



Figure 6 : Méthode A et B sur le site de l'AFAQAP.

2.3. Analyse par RT-qPCR à l'aide de GeneXpert Instrument

Pour notre étude nous avons utilisé le matériel GeneXpert Instrument du test Xpert Breast Cancer STRAT4 (STRAT4) de la société Cepheid. C'est un test de diagnostic moléculaire in vitro en RT-qPCR pour la détection quantitative du statut d'expression de l'ARNm des gènes *ERBBB2, ESR1, PGR et MKI67* dans les tissus humains de cancer du sein, fixés au formol et inclus en paraffine provenant de chirurgie ou de biopsie.

A partir d'une zone tumorale repérée sur lame colorée en HPS, la zone d'intérêt de carcinome mammaire invasif a été macro-disséquée dans le bloc de paraffine.

Elle a été ensuite placée dans un tube de 1,5 millilitres avec du tampon de lyse (Xpert FFPE lysis kit) permettant la digestion de la coupe FFPE. Un aliquot de la solution obtenue a ensuite été transféré dans une cartouche et placé dans le thermocycleur GeneXpert Instrument qui effectue un programme de 40 cycles de RT-qPCR en 75 minutes (Annexes 5-6).

Cette cartouche contient quatre chambres réactionnelles. Chacune d'elles renferme la reverse transcriptase (RT) permettant de retranscrire les ARNm en ADNc ; l'enzyme qui permet de polymériser l'ADN (Taq polymérase), du chlorure de magnésium, des amorces, des nucléotides, du tampon et des sondes. Ces sondes sont couplées à un « quencher » fluorochrome et sont spécifiques des 4 gènes cibles recherchés *ESR1, PGR, ERBB2*, *mMKi67* et du gène de ménage *CYFIP1.*

Ces sondes ne produisent de la fluorescence qu'une fois fixées à l'ADN. Un seuil de fluorescence est établi par le programme de l'appareil de PCR en temps réel. Les données de fluorescence sont collectées à chaque cycle de la PCR et représentent la quantité de produit amplifié à cet instant. Plus l'échantillon est concentré en molécules cibles à l'origine, moins il faudra de cycles pour atteindre un point pour lequel le signal fluorescent est significativement

supérieur au bruit de fond. Ce point est défini comme le Ct pour "Cycle Threshold" ou cycle seuil et apparaît en début de phase exponentielle. Ce concept de Ct est à la base de la précision et de la reproductibilité de la technique. Si l'on suit la fluorescence au cours du temps d'une PCR en temps réel, on observe une augmentation de cette fluorescence et donc du nombre de fragments PCR en 3 phases distinctes :

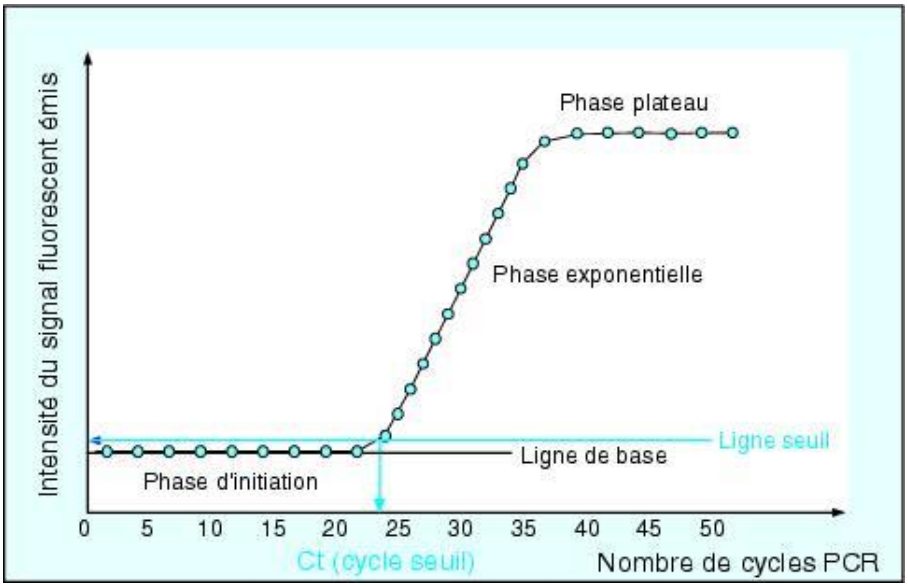


Figure 7 : Exemple d'un tracé de fluorescence de q-PCR.

- Phase de bruit de fond ou initiation : la quantité de fragment amplifié est insuffisante pour générer un signal fluorescent supérieur au bruit de fond.

- Phase exponentielle : la quantité de fragment amplifié génère un signal fluorescent supérieur au seuil de détection de l'appareil, puis le nombre de produit amplifié double à chaque cycle. En coordonnées logarithmiques, cette phase est représentée par une droite.

- Phase de plateau (ou de saturation) : certains composants de la réaction deviennent limitants. Le système ne permet plus une amplification exponentielle.

Ces 3 étapes constituent un cycle de PCR en temps réel ou qPCR.[59]

Une fois l'analyse effectuée, un graphique est obtenu automatiquement grâce au logiciel.

Sur cet automate, il est possible de passer 4 échantillons en même temps, indépendamment les uns des autres.

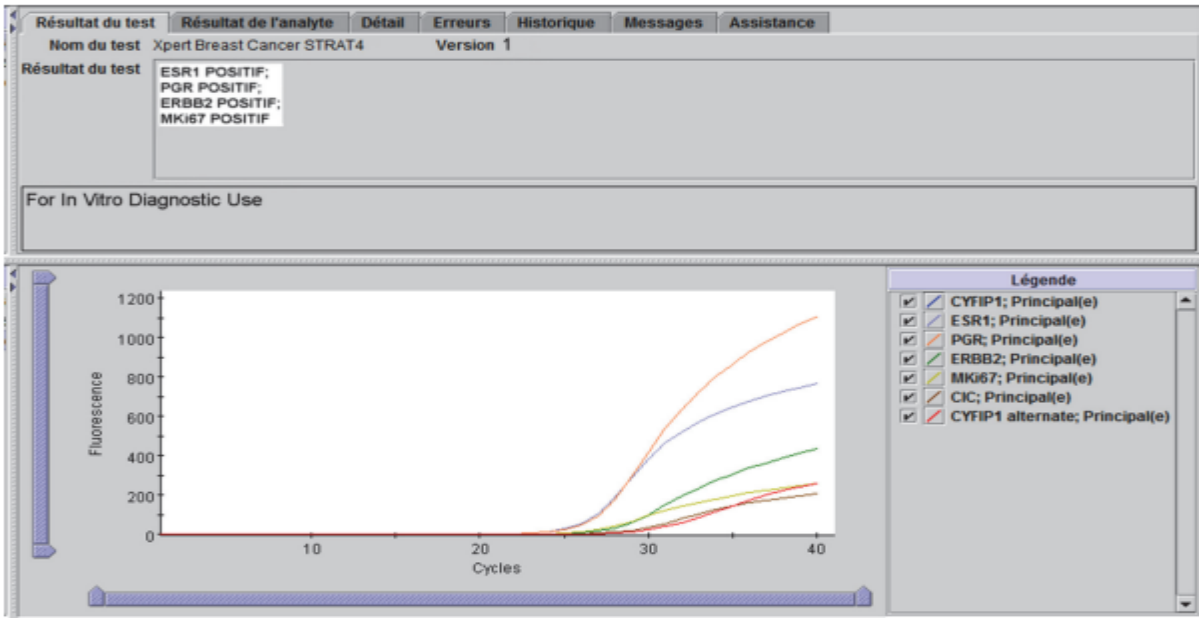


Figure 8 : Exemple de graphique généré par le logiciel de GeneXpert.

Les gènes de ménage, sont un groupe de gènes qui codent pour des protéines dont la fonction est essentielle à la viabilité de la cellule. Il est présumé que ces gènes ont une expression ubiquitaire, stable entre les différents tissus, entre les individus et quelles que soient les conditions expérimentales. L'utilisation de ce contrôle endogène permet de contrôler toutes les étapes du protocole expérimental ; son expression reflétant non seulement la quantité et la qualité de l'ARN utilisé, mais aussi l'efficacité de la RT-qPCR. Ici c'est le gène *CYFIP1* qui est utilisé, gène qui code pour une protéine qui régule la dynamique du cytosquelette et la traduction des protéines.

Le logiciel analyse ensuite automatiquement les différentes courbes de fluorescence et calcule la différence de Ct entre le gène de ménage et chaque biomarqueur. Cela donne un delta Ct (dCt) qui permet de conclure à un résultat positif ou négatif, selon des cut off de dCt prédéfinis dans le protocole du test STRAT4.

dCt (delta de signaux seuils)= Ct gène de ménage – Ct gène d'intérêt

2.4. Analyses statistiques

L'ensemble des données cliniques, histologiques, immunohistochimiques et moléculaires a été compilé dans un tableau récapitulatif et analysé à l'aide du logiciel SEM (Statistics Epidemiology Medicine) [60].

Pour les paramètres quantitatifs nous avons effectué des analyses descriptives avec calcul de moyenne, médiane, écart-type, étendue et normalité de la distribution (test de Kolmogorov-Smirnov). Pour les paramètres qualitatifs, nous avons dénombré les effectifs par classe puis calculé les pourcentages correspondants. Les sensibilités, spécificités, VPN (valeur prédictive négative) et VPP (valeur prédictive positive) ont été calculées.

Nous avons réalisé des analyses de régression : le coefficient de corrélation de Pearson ou celui des rangs de Spearman a été calculé selon que les distributions étaient gaussiennes ou non. La droite de régression a été aussi calculée par la méthode des moindres carrés.

Un test t des séries appariées a par ailleurs permis d'évaluer la différence absolue selon les différentes méthodes ou les lecteurs, deux à deux.

Pour étudier la répartition des différences de lecture selon les lecteurs ou les méthodes AFAQAP, un diagramme de Bland & Altman a été tracé avec calcul de la corrélation entre les différences et la moyenne par couple de valeurs.

Enfin pour rechercher les meilleurs dCt permettant au mieux de discriminer un paramètre qualitatif (positif/négatif), nous avons tracé des courbes ROC. Le seuil optimal a été calculé grâce à l'indice de Youden. L'AUC (aire sous la courbe) a servi pour l'évaluation de l'efficacité discriminante du seuil trouvé.

III. RESULTATS

Deux cent soixante-huit dossiers ont été initialement inclus dans notre cohorte. Quinze ont été exclus car ils n'ont pas pu être analysés par RT-qPCR par manque de matériel (surface de carcinome infiltrant <5mm^2 ou risque d'épuisement du bloc). Au total 253 dossiers ont été analysés, correspondant à 200 patientes (cohorte finale).

Cela comprenait 53 biopsies et 200 pièces opératoires.

3.1. Analyse descriptive des données cliniques et histologiques

L'ensemble des patients est de sexe féminin.

L'âge moyen au diagnostic est de 61.7 ± 12.3 [36-93], avec une médiane = 62.5 ans.

Cent soixante-quinze patientes ont été traitées par chirurgie première, 25 ont eu un traitement néo-adjuvant.

Le TNM au diagnostic a été renseigné pour 196 pièces opératoires : 135 patientes présentaient une tumeur classée T1 (67,5%), 45 une tumeur T2 (22,5%), 16 une tumeur T3 /T4 (10%).

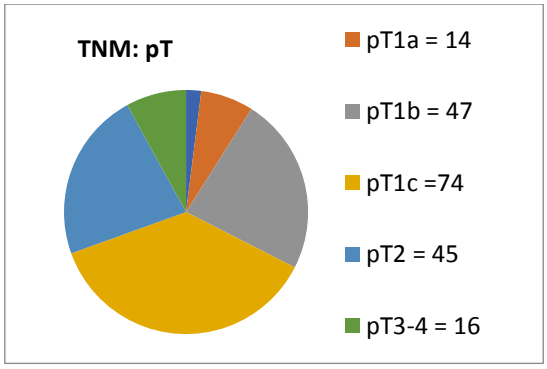


Figure 9 : Données TNM de l'étude.

Concernant le type histologique, on observe 155 carcinomes non spécifiques (77,5%), 37 carcinomes lobulaires (18,5%) et 8 autres types histologiques (4%).

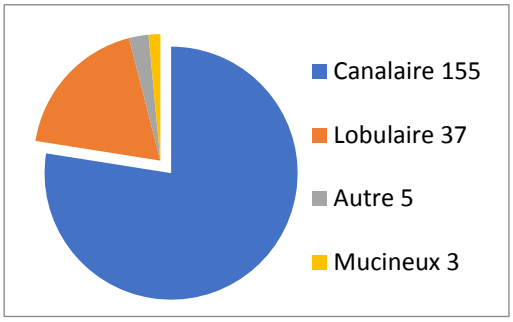


Figure 10 : Données histologiques de l'étude.

Il s'agit dans 24% des cas d'une lésion de grade I SBR (48), dans 66,5% des cas de grade II SBR (133) et dans 9,5% de grade III SBR(19).

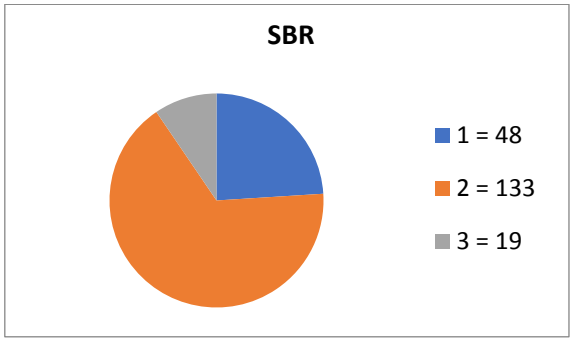


Figure 11 : Résumé grade SBR de l'étude.

Au diagnostic, 178 tumeurs sont RE positives (89%) avec une moyenne de 83,11% et 139 sont RP positives (69,5%) avec une moyenne de 51,28%.

Pour le statut Her2, 171 tumeurs sont négatives (85,5%), 22 amplifiées (11%), et 7 équivoques (3,5%).

Le Ki67 est négatif dans 131 tumeurs (66%) avec une moyenne = 18.1 ± 19.6 [1-95], médiane à 10.

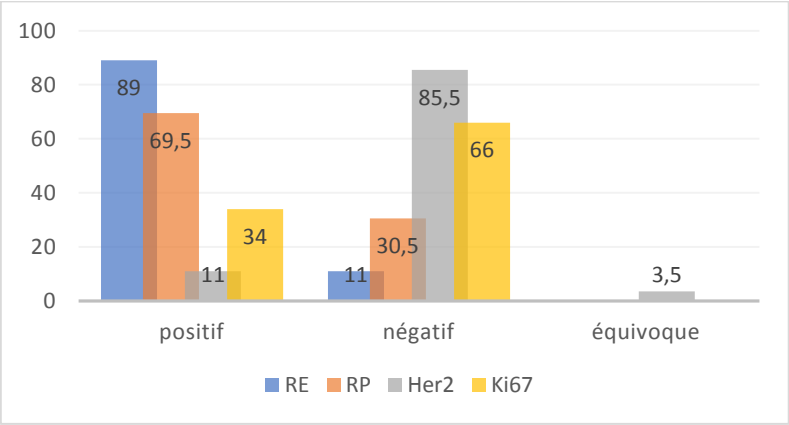


Figure 12 : Répartition des biomarqueurs dans notre population.

3.2. Étude des concordances entre le lecteur 1 et le lecteur 2

Pour chacun des quatre biomarqueurs nous avons comparé les résultats IHC du **lecteur 1** (un des cinq pathologistes du centre) et du **lecteur 2** (un seul pathologiste qui a relu l'ensemble des cas) sur pièces opératoires et sur biopsies. Le lecteur 1 est pris comme référentiel.

3.2.1. Récepteurs aux œstrogènes

Cent quatre-vingt-seize pièces opératoires ont pu être comparées. Deux cas seulement sont discordants (5%/10% - 1%/10%) ; soit une concordance de 98.9% avec une sensibilité de 98.8% et une spécificité de 100%.

Pour les biopsies les valeurs sont identiques.

RE lecteur 2 ***RE lecteur1***	**Positive**	**Négative**	**Total**	**Proportion**
Positive	173	2	175	89,3%
Négative	0	21	21	10,7%
Total	173	23	196	
Proportion	88,3%	11,7%		

Tableau IV : Comparaison RE en IHC sur pièce opératoire entre Lecteur 1 et Lecteur 2.

3.2.2. Récepteurs à la progestérone

Pour les pièces opératoires, 18 cas sont discordants avec le cut off à 10 %, soit une concordance de 91,9% avec une sensibilité de 89% et une spécificité de 95%.

Il y a trois faux positifs (donné à 10, 20 et 25% par le **lecteur 2** contre zéro, zéro et 5% pour le **lecteur 1**) et 15 faux négatifs (rendu entre 0 et 5% par le **lecteur 2** contre huit cas à 10%, cinq cas à 20%, un cas à 25%, et un 30% pour le **lecteur 1**).

Pour les biopsies la concordance est de 100%.

RPlecteur2 ***RPlecteur1***	**Positive**	**Négative**	**Total**	**Proportion**
Négative	3	57	60	30,3%
Positive	123	15	138	69,7%
Total	126	72	198	
Proportion	63,6%	36,4%		

Tableau V : Comparaison RP en IHC sur pièce opératoire entre Lecteur 1 et Lecteur 2.

3.2.3. HER2

Pour l'étude de Her2 sur nos pièces opératoires, les cas 2+ en IHC ont été testés par FISH par les deux lecteurs et sont tous non amplifiés (les cas équivoques ont été classés dans les non amplifiés, conformément aux recommandations 2018). Donc nous avons considéré ici les cas 0, 1+ et 2+ comme négatifs et les cas 3+ comme positifs.

A partir de là nous avons obtenu une sensibilité de 94%, une spécificité de 100%, une concordance de 99%, une VPN de 100% et VPP de 93.3%. Il y a eu un cas discordant.

Her2 lect 2 **Her2 lect1**	**0**	**1+**	**2+**	**3+**	**Total**	**Proportion**
0	74	5	1	0	80	41%
1+	24	15	2	0	41	21%
2+	3	5	51	0	59	30,3%
3+	0	0	1	14	15	7,7%
Total	101	25	55	14	195	
Proportion	51,8%	12,8%	28,2%	7,2%		

Tableau VI : Comparaison Her2 en IHC sur pièce opératoire entre Lecteur 1 et Lecteur 2.

Nous avons également fait une analyse quantitative avec une analyse de régression. Le r des rangs de Spearman est de 0,856 : $p < 0.0000001$; il existe une bonne corrélation (r tend vers 1) ; les deux facteurs sont donc liés significativement.

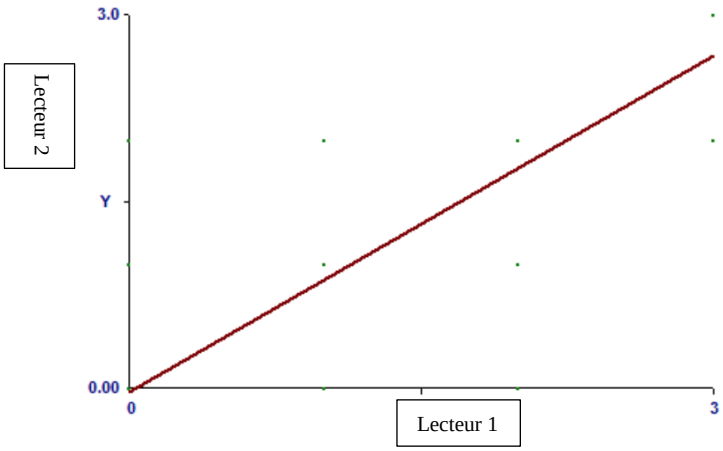


Figure 13 : Équation de régression : Y = 0.9056 * X -0.03967 pour Her2

Pour les biopsies, nous n'avons pas eu de cas Her2 amplifié (c'est-à-dire qu'il n'y a pas eu de 3 + en IHC ou 2+ amplifié en FISH). Le taux de concordance était de 100%.

3.2.4. KI67

3.2.4.1. Entre lecteur 1 et lecteur 2

Les résultats pour le lecteur 1 sont de 17,93 +/- 19,57 et pour le lecteur 2 de 17,77 +/- 20,48.

	Lecteur 1	Lecteur 2
Moyenne	17.93	17.77
Écart-type	19.57	20.48

Tableau VII : Comparaison Ki67 en IHC sur pièce opératoire entre Lecteur 1 et Lecteur 2

Pour comparer les résultats IHC du Ki67 entre les deux lecteurs sur nos 200 pièces opératoires, nous avons fait une analyse de régression. Le r des rangs de Spearman est de 0,802 : $p < 0.0000001$; les deux facteurs sont donc liés significativement.

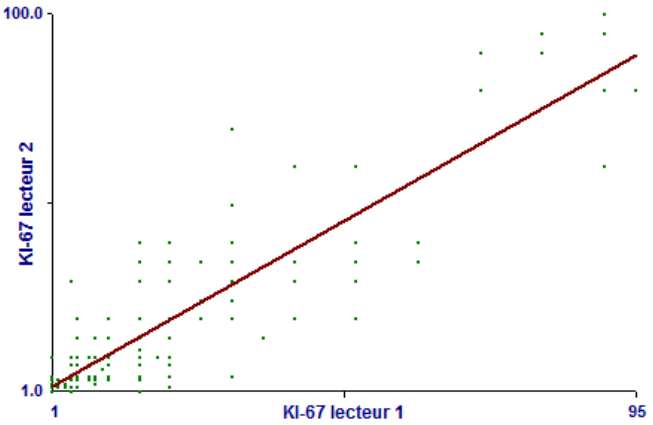


Figure 14 : Équation de régression : Y = 0.927 * X + 1.142 pour Ki67 lecteur 1 /2

On observe une différence moyenne de 0.17% ± 9.62 entre les deux lecteurs d'après le graphe de Bland et Altman avec un lecteur 1 qui a tendance à donner des valeurs plus élevées que le lecteur 2, notamment dans les valeurs hautes.

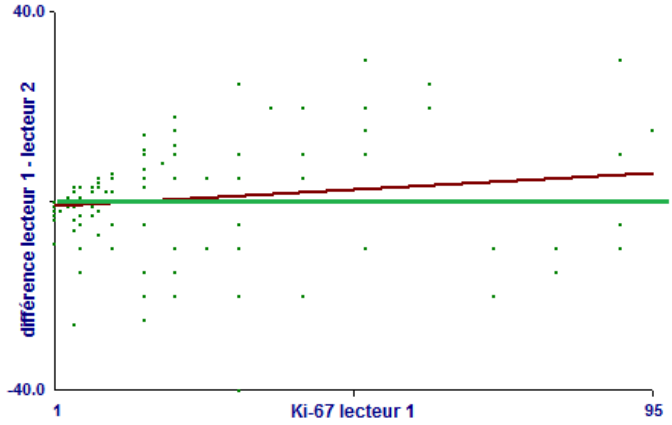


Figure 15 : Graphe de Bland et Altman pour Ki67 lecteur 1/2.

3.2.4.2. Entre lecteur 2 et lecteur 3

Pour le lecteur 2, les valeurs du KI67 sont de 17,77 +/- 20,48 contre 18,4 +/- 20,5 contre le lecteur 3.

	Lecteur 2	Lecteur 3
Moyenne	17.77	18.4
Écart-type	20.48	20.5

Tableau VIII : Comparaison Ki67 en IHC entre Lecteur 2 et Lecteur 3

Entre le lecteur 2 et le lecteur 3 les résultats sont encore plus concordants avec un petit r des rangs de Spearman à 0,906 : $p < 0.0000001$, donc très proche de 1. Les deux facteurs sont liés significativement.

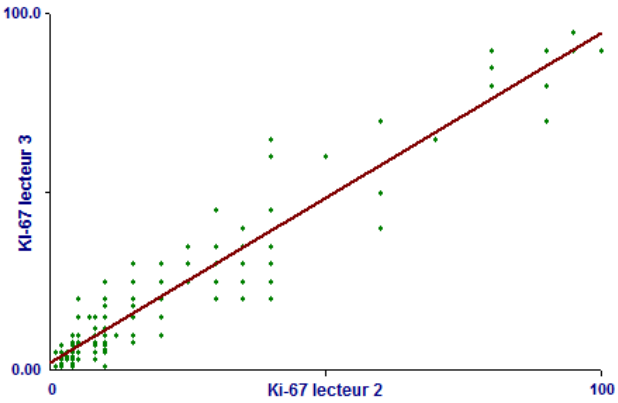
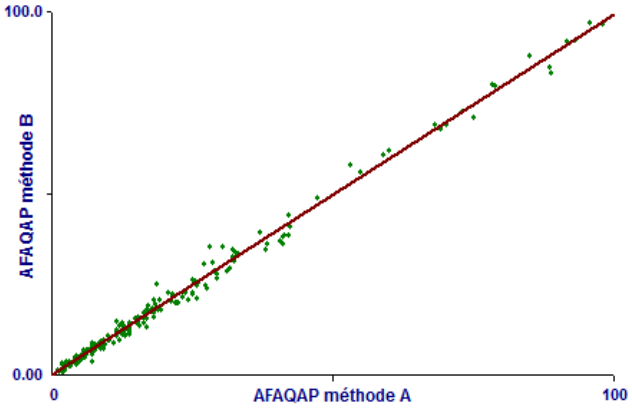


Figure 16 : Équation de régression : Y = 0.9297 * X + 1.811 pour Ki67 lecteur 2/3

Nous remarquons que la corrélation est meilleure entre le lecteur 2 et lecteur 3 qu'entre le lecteur 1 et lecteur 2. Cela peut s'expliquer par le fait que le lecteur 1 correspond aux différents pathologistes du centre et entraine donc plus de variabilité de lecture.

3.2.4.3. Entre les deux méthodes AFAQAP

Entre les deux méthodes AFAQAP (méthode A et méthode B) il n'y a pas de différence significative, comme on peut le voir sur la droite de régression avec un r des rangs de Spearman égal à 0,992 ; p < 0.0000001. Les deux méthodes sont très bien corrélées.



L'équation de régression donne Y = 0.9932 * X + 0.1627 avec une différence entre les 2 méthodes qui est de -0.02716% ± 1.8.

Pour la suite des analyses, on utilisera comme référence la méthode A puisqu'aucune différence significative existe avec la méthode B.

3.2.4.4. Entre le lecteur 3 et la méthode AFAQAP

Comme il existe une bonne concordance entre les résultats du Ki67 donnés par les différents lecteurs, nous avons choisi de prendre les résultats du lecteur 3 pour les comparer aux résultats des méthodes AFAQAP.

D'après la droite de régression il n'y a pas non plus de différence significative entre ces résultats. Le r des rangs de Spearman est de 0.870 : p < 0.0000001. Les deux facteurs sont liés

significativement. On ne démontre donc pas d'avantage pour la méthode AFAQAP. Le graphe de Bland et Altman ne montre pas de différence significative, les deux droites sont quasiment superposées.

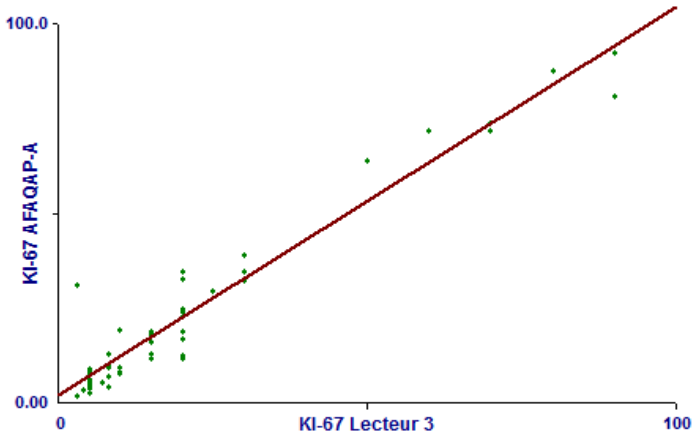


Figure 17 : Équation de régression : Y = 1.026 * X + 0.838 pour Ki67 AFAQAP/lecteur 3

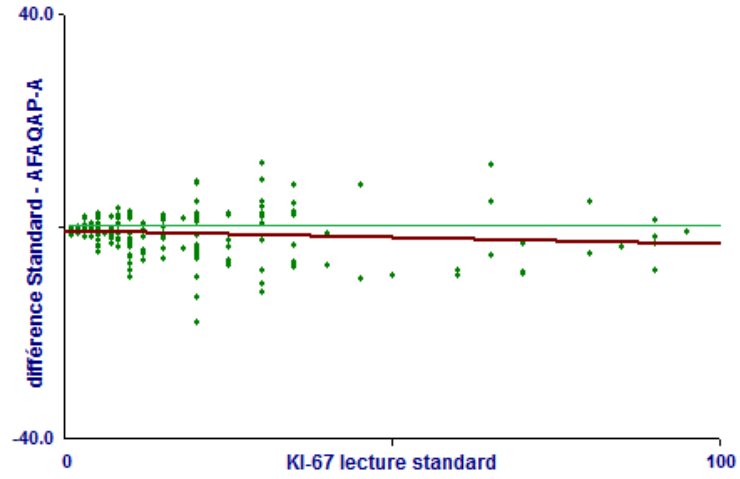


Figure 18 : **Graphe Bland et Altman avec une différence moyenne de -1.32 ± 4.16.**

A noter que pour les biopsies toutes ces comparaisons donnent des résultats similaires.

3.3. Étude des concordances entre lecteur IHC et biologie moléculaire

Les cas discordants en immunohistochimie entre les trois lecteurs vus ci-dessus ont été relus par un quatrième pathologiste qui a retenu à l'aveugle la valeur qui lui semblait correcte. Ceci nous a permis de comparer les résultats de l'analyse GeneXpert/STRAT4 aux résultats immunohistochimiques « optimisés », pris comme référentiel.

3.3.1. Pour les pièces opératoires

- **Récepteur aux œstrogènes**

Pour l'analyse des RE sur pièce opératoire, la concordance est de 96% avec une sensibilité de 98.3% et une spécificité de 77.3%. Nous avons observé 5 faux positifs et 3 faux négatifs.

La VPN est à 85% et la VPP à 97.2%.

RE biomol ***RE IHC***	**Positif**	**Négatif**
Positif	175	3
Négatif	5	17

Tableau IX : Comparaison résultats RE pièce opératoire entre résultats obtenus en IHC et en biologie moléculaire.

- **Récepteur à la progestérone**

On obtient une concordance de 77,5% avec une sensibilité de 98.5% mais une spécificité de seulement 35.8%. La VPN est de 92,3% et la VPP de 75,3%. On a 43 faux positifs et deux faux négatifs.

RP biomol ***RP IHC***	**Positif**	**Négatif**
Positif	131	2
Négatif	43	24

Tableau X : Comparaison résultats RP pièce opératoire entre résultats obtenus en IHC et en biologie moléculaire.

- **Her2**

Pour l'analyse du biomarqueur Her2 nous avons pris les résultats finaux, c'est à dire après étude par FISH pour les cas classés 2+ en IHC. Les dossiers équivoques sont traités comme des négatifs.

En immunohistochimie 22 cas sont classés positifs contre 82 avec l'instrument GeneXpert. De même 178 cas sont classés négatifs en immunohistochimie contre 118 en biologie moléculaire.

Her2 biomol ***Her2*** ***(IHC + FISH)***	**Négatif**	**Positif**
Négatif	117	61
Positif	1	21

Tableau XI : Comparaison résultats Her2 pièce opératoire entre résultats obtenus en IHC/FISH et en biologie moléculaire.

Nous relevons un faux négatif et 61 faux positifs. Cela nous donne une sensibilité de 95,5%, une spécificité de 65,7%, une VPN de 99,2% et une VPP de 25,6%. La concordance est de 68%.

- **Ki67**

La concordance entre les résultats du Ki67 en IHC et en biologie moléculaire est établie par l'analyse de régression. Le petit r des rangs de Spearman est à 0,609 ; $p < 0.0000001$.

Les deux facteurs sont ici aussi liés significativement.

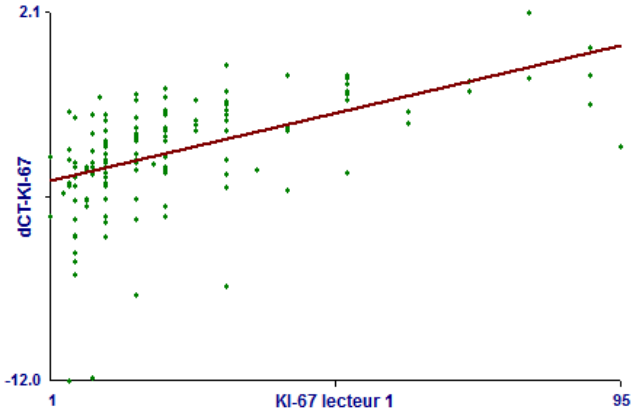


Figure 19 : Équation de régression : Y = 0.05534 * X -4.428 pour Ki67

Pour faire une analyse qualitative, le cut off choisi par la société Cepheid pour un Ki67 positif est un taux ≥20%.

Avec cette valeur, la sensibilité est de 80%, la spécificité de 66,4%, la VPN de 86% et la VPP de 56%. La concordance est de 71%. Nous observons 14 faux négatifs et 44 faux positifs.

Ki67 biomol ***Ki67 IHC***	**Négatif**	**Positif**	**Proportion**
Négatif	86	44	65%
Positif	14	56	35%
Proportion	50%	50%	

Tableau XII : Comparaison résultats Ki67 pièce opératoire entre résultats obtenus en IHC et en biologie moléculaire.

3.3.2. Pour les biopsies

Les résultats obtenus sur les 53 biopsies sont quasiment identiques aux résultats des pièces opératoires. Les quatre biomarqueurs étudiés montrent également des valeurs concordantes significativement en comparant les résultats obtenus par IHC et par biologie moléculaire.

De manière générale les chiffres sont légèrement améliorés sur biopsies par rapport aux pièces opératoires.

Pour RE, nous avons obtenu une sensibilité de 95,7%, une spécificité de 100% et une concordance de 96%.

Pour RP, les résultats sont nettement meilleurs avec une sensibilité de 88,2%, une sensibilité de 100% et une spécificité de 60%.

Sur biopsie, pour Her2 nous obtenons une concordance de 57%. Pour rappel nous n'avions pas dans notre panel de cas de biopsie IHC/FISH amplifiée.

Enfin, pour le Ki67 nous avons obtenu une concordance de 76,5% avec une sensibilité de 93,8% et une spécificité de 63,6%.

3.4. Étude des concordances par couple biopsie/pièce opératoire

- **Récepteurs aux œstrogènes**

- **Immunohistochimie**

En moyenne le taux des RE est de 82,18% pour les pièces opératoires contre 85,98% pour les biopsies.

	Pièce opératoire	Biopsie
Moyenne	82,18	85,98
Écart-type	33,3	29,67

Tableau XIII : Comparaison résultats RE en IHC entre pièce opératoire et biopsie

En considérant les résultats des pièces opératoires comme référence, nous obtenons une sensibilité de 97,7%, une spécificité de 42,9%, une VPN de 75% et une VPP de 91,5%. La concordance est de 90%. Cinq cas sont discordants.

- **Biologie moléculaire**

Avec STRAT4, nous obtenons une concordance de 96%. La sensibilité est de 97,7%, la spécificité de 83,3%, la VPN de 83,3% et la VPP de 97,7%.

RE Biopsie ***RE PO***	**Positif**	**Négatif**	**Proportion**
Positif	43	1	88%
Négatif	1	5	12%
Proportion	88%	12%	

Tableau XIV : Comparaison résultats RE pièce opératoire / biopsie en biologie moléculaire.

- **Récepteurs à la progestérone**

- **Immunohistochimie**

Pour les RP, la moyenne est de 50,1% pour les pièces opératoires contre 57,45% pour les biopsies.

	Pièce opératoire	Biopsie
Moyenne	50,1	57,45
Écart-type	42,07	41,15

Tableau XV : Comparaison résultats RP en IHC entre pièce opératoire et biopsie

La concordance est de 86,3% avec deux faux négatifs et cinq faux positifs. Parmi les sept cas discordants, quatre ont reçu un traitement néo adjuvant.

La sensibilité est calculée à 93,9% et la spécificité à 72,2%.

- **Biologie moléculaire**

On note deux faux positifs et trois faux négatifs. La concordance est de 90% avec une sensibilité de 92,9% et une spécificité de 75%. Pour les biopsies, 41 cas sont classés RP positifs et 9 RP négatifs. Pour les pièces opératoires, 42 cas sont RP positifs et 7 RP négatifs.

RP Biopsie ***RP PO***	**Positif**	**Négatif**	**Proportion**
Positif	39	3	84%
Négatif	2	6	16%
Proportion	82%	18%	

Tableau XVI : Comparaison résultats RP pièce opératoire / biopsie en biologie moléculaire.

- **Her2**

- **Immunohistochimie/FISH**

Dans nos couples biopsie/pièce opératoire on obtient une concordance de 98% avec un seul cas discordant classé équivoque sur la biopsie et positif sur pièce opératoire.

- **Biologie moléculaire**

Les deux facteurs sont liés significativement avec une concordance de 78%, une sensibilité de 81% et une spécificité de 76%. Pour les biopsies 21 cas sont classés Her2 positifs et 29 Her2 négatifs. Pour les pièces opératoires il y a 16 cas positifs et 34 négatifs.

- **Ki67**

- **Immunohistochimie**

Les pièces opératoires ont en moyenne un Ki67 à 15% avec un écart-type à 15,97. Les biopsies montrent un Ki67 à 19,61% avec un écart-type à 22,09.

	Pièce opératoire	Biopsie
Moyenne	15	19,61
Écart-type	15,97	22,09

Tableau XVII : Comparaison résultats Ki67 en IHC entre pièce opératoire et biopsie

16 biopsies ont un ki67 positif et 35 un ki67 négatif contre 13 et 38 pour les pièces opératoires (cut off à 20%). La concordance est de 75%, avec une sensibilité de 61,5% et une spécificité de 78,9%.

- **Biologie moléculaire**

Ici 25 biopsies ont un Ki67 positif et 25 un Ki67 négatif contre 24 et 26 pour les pièces opératoires. Cependant il y a 13 faux négatifs et 14 faux positifs. La concordance est de 46% avec une sensibilité de 45,8% et une spécificité de 46,2%. Le r des rangs de Spearman est à 0,115 avec un p = 0.53. Ces résultats ne sont pas liés significativement.

Ki67 Biopsie ***Ki67 PO***	**Positif**	**Négatif**	**Proportion**
Positif	11	13	48%
Négatif	14	12	52%
Proportion	50%	50%	

Tableau XVIII : Comparaison résultats Ki67 pièce opératoire / biopsie en biologie moléculaire.

3.5. Étude des discordances entre IHC et biologie moléculaire sur pièce opératoire

- **Récepteurs aux œstrogènes.**

Nous avons vu précédemment qu'il y a cinq faux positifs et trois faux négatifs. Les cinq cas classés positifs par GeneXpert ont 0% de cellules tumorales marquées en IHC avec un témoin interne positif. Les trois cas classés négatifs par le logiciel GeneXpert ont des pourcentages en IHC de 10% (pour deux cas) et 70%. Nous sommes revenus sur ces dossiers discordants. Après relecture des lames d'immunohistochimie nous n'avons pas fait de modifications sur nos résultats. Nous ne pouvons pas expliquer ces différences.

- **Récepteurs à la progestérone**

Deux cas ont été classés négatifs par le logiciel GeneXpert alors qu'ils montrent un pourcentage de cellules tumorales marquées en IHC à 25% et 30%.

Quarante-trois cas ont de même été classés positifs alors qu'en IHC ils ont entre 0 et 8% de cellules tumorales marquées.

Il est a noté que le logiciel GeneXpert a été mis au point à partir du protocole STRAT 4 par la société Cepheid aux États-Unis. Là-bas, les valeurs seuils de positivité en IHC sont de 1% de cellules tumorales marquées pour les RE et RP, alors que pour rappel en France le seuil retenu est de 10%. Si l'on respecte leur seuil, sept cas passent de faux positifs à vrai positifs. Cela améliore un peu la concordance (87,9%) et la spécificité (51,7%).

Pour ce biomarqueur, au vu des résultats, nous avons essayé d'optimiser le logiciel GeneXpert en cherchant un meilleur dCt qui permettrait d'améliorer la spécificité et la VPP. A l'aide d'une courbe ROC on voit que, pour un seuil de positivité en IHC à 10%, le dCt optimal est -0,5. Avec ce seuil on obtient une concordance de 88%, une sensibilité de 85,1%, une spécificité de 93,7%, une VPN de 69,4% et une VPP de 97,4%.

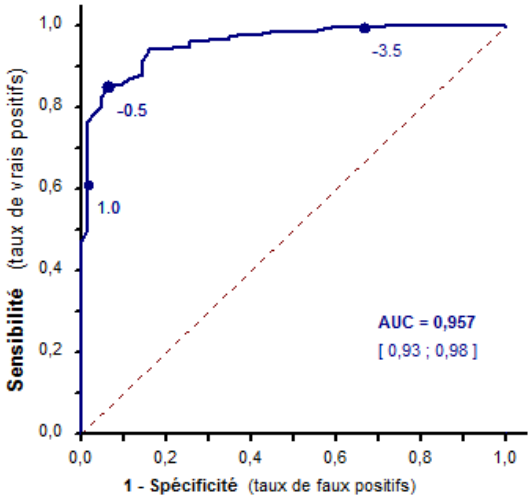


Figure 20 : **courbe ROC pour le calcul dCt optimal pour les RP.**

Maintenant si l'on souhaite coller au seuil de positivité Américain ≥1%, on obtient grâce à la courbe ROC un dCt à -1,4. La société Cepheid avait choisi son dCt a -3,5.

- **Her2**

Pour rappel, pour ce biomarqueur, les cas équivoques après analyse par FISH sont classés négatifs. On a eu 61 faux positifs. Parmi eux il y a 20 scores 0 et 19 scores 1+. Une FISH de contrôle a été réalisée sur ces cas et ne modifie pas le résultat. Les 22 autres cas sont des scores 2+ classés équivoques (5) ou non amplifiés (17) après FISH. Aucun cas ne peut être reclassé après relecture. On reste donc avec une concordance de 68%, une spécificité à 65,7% et une VPP à 25,6%.

Nous avons cherché à obtenir le meilleur seuil de dCt, celui qui permettrait au mieux d'optimiser la discrimination (positif/négatif en IHC-FISH).

A l'aide d'une courbe ROC on a pu objectiver qu'un dCt égal à -0,4 donnait de meilleurs résultats que le dCt choisit pour l'étude à -1. Ce nouveau seuil permet une concordance de 92%, une spécificité à 91,7% et une VPP à 51,3%.

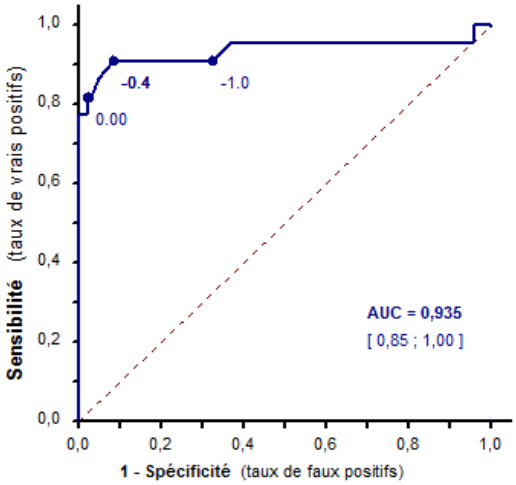


Figure 21 : **courbe ROC pour le calcul dCt optimal pour Her2.**

Ensuite nous avons a placé les cas équivoques avec les cas classés positifs. Les résultats obtenus sont inférieurs aux précédents avec une concordance de 72%, une spécificité à 69,9% et une VPP à 29,8%. Cela est en accord avec les nouvelles recommandations de l'ASCO/CAP 2018 (Annexe 7).[58]

A l'heure actuelle, les anciens cas équivoques (ratio Her2/CEN17 <2 avec un nombre de copie Her2 par noyau entre 4 et 6) sont testés une deuxième fois en IHC/FISH. Si les seconds résultats sont identiques au premier ces cas sont considérés négatifs.[61]

- **Ki67**

Le seuil de positivité en IHC choisi pour ce biomarqueur dans cette étude par la société Cepheid est de 20%. Avec ce seuil nous avons eu 44 faux positifs. 14 cas possèdent un Ki67 entre 1 et 9%. Les 30 autres ont un Ki67 entre 10 et 19%. Après relecture il n'y a pas de modifications des résultats. Cela donne comme vu plus haut une sensibilité de 81,2%, une spécificité de 66,4%, et une VPP de 56%.

Toujours à l'aide d'une courbe ROC nous avons cherché cette fois-ci le meilleur seuil IHC pour optimiser la discrimination positif-négatif et la concordance des deux méthodes. C'est avec un seuil à 10% (positif ≥10%) que l'on obtient les meilleurs résultats. La concordance est alors de 88% avec une sensibilité à 91,3%, une spécificité à 85,2%, une VPP à 85% et une VPN à 92%. (La recherche du dCt optimal n'a pas permis l'amélioration des résultats).

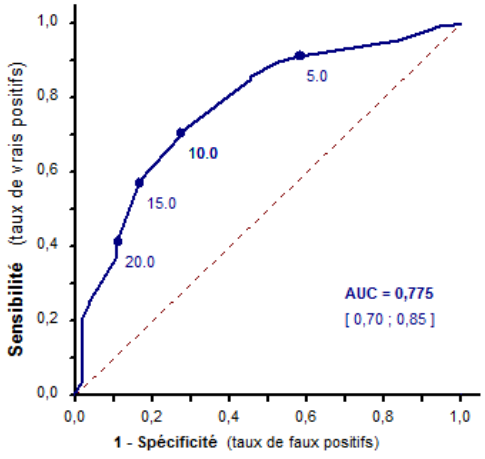


Figure 22 : **courbe ROC pour le calcul du % IHC optimal pour le Ki67.**

IV. DISCUSSION

4.1. Point sur notre étude

Dans cette étude nous avons tout d'abord cherché à comparer les résultats des quatre biomarqueurs d'intérêt du cancer du sein : RE, RP, HER2 et Ki-67 obtenus par méthode classique (immunohistochimie/FISH) et par un système dédié de RT-qPCR (STRAT4) afin de vérifier leur concordance.

Secondairement, nous avons voulu vérifier la concordance immunohistochimique inter-observateur dans un même laboratoire.

Enfin nous avons étudié les concordances entre couple biopsie/pièce opératoire par la méthode classique d'IHC et par RT-qPCR à l'aide du logiciel GeneXpert/STRAT4.

Cette étude a été portée par la volonté de développer des moyens fiables pour l'évaluation de ces quatre biomarqueurs qui ont un impact thérapeutique et pronostique majeur dans le cancer du sein.

4.1.1. Population étudiée

La population étudiée dans notre étude est assez représentative de la population générale. Les patientes sont en moyenne légèrement plus âgées (+2,7 ans) [62]. Pour le type histologique nous avons plus de carcinomes lobulaires (18,5% contre 15% dans la population générale). Les carcinomes étudiés expriment plus souvent les récepteurs hormonaux que la population générale (89% contre 80%), et moins Her2 avec notamment un faible nombre d'équivoque (3,5% des Her2 testés en FISH contre 10%) [63].

Ceci s'explique par un biais d'échantillonnage. Nous avons en effet, à cause de nos critères d'inclusion, sélectionné des cas où le matériel tumoral était important. De ce fait nous avons inclus beaucoup de cas traités par chirurgie première (correspondant souvent à des cancers RH positifs). De même pour les cas traités par chimiothérapie néo adjuvante, nous avons sélectionné ceux avec un résidu tumoral évident (correspondant le plus souvent à des Her2 négatifs, les patientes Her2 positives ayant le plus souvent une réponse histologique complète).

4.1.2. Concordance IHC/FISH inter observateur

Pour l'étude de la concordance des résultats d'immunohistochimie en inter observateur nous avons obtenu de très bons résultats, meilleurs que ceux d'autres études qui ont des taux de discordance allant jusqu'à 20% notamment pour Ki67 et Her2. [54] [64] [65][66]

En effet, il n'y a pas vraiment de consensus d'évaluation pour le Ki67, ni de valeur seuil unanimement reconnue (positif/négatif) [67]. On observe donc à travers les études un bas niveau de reproductibilité inter et intra observateur [68]. Cela génère un doute sur la fiabilité de ce marqueur et de son utilité clinique dans la pratique au quotidien en pathologie mammaire [51]. Pour ces raisons, le Ki67 déterminé par l'IHC n'est pas actuellement inclus dans les lignes directrices des sociétés savantes tels que l'ASCO/CAP, GEFPICS, ou l'ESMO pour l'utilisation clinique courante[69]. Actuellement la recherche d'une harmonisation et d'une standardisation de la méthodologie d'évaluation est donc souhaitable pour utiliser au mieux ce marqueur comme facteur pronostique/prédictif [31][52]. De nombreuses études travaillent sur ce sujet[70][71]. Certains centres tentent même de développer des plateformes de lectures de lames automatisées pour une valeur plus fiable et précise du Ki67 [72][73].

L'AFAQAP a mis au point pour sa part deux méthodes d'analyse que nous avons testées dans notre étude [31][30].

Nous avons obtenu pour les pièces opératoires un Ki67 lié significativement ($p < 0,0000001$) avec un r des rangs de Spearman à 0,802 entre lecteur 1-2 et 0,906 entre lecteur2-3. L'analyse à l'aide des outils AFAQAP n'a pas montré d'amélioration de la concordance inter et intra observateur avec un $r = 0,870$. Il n'y a donc pas d'intérêt pratique en routine à utiliser systématiquement cette méthode qui est chronophage. Néanmoins pour les cas les plus difficiles, hétérogènes, elle reste un outil standardisé précieux. [29]

Pour les autres biomarqueurs, nous avons obtenu une concordance de 98,9% pour les RE, 91,9% pour les RP, et 99% pour Her2.

Pour les biopsies les résultats sont encore meilleurs avec une concordance de 100% pour RP et Her2. Cela s'explique notamment par une plus petite zone à analyser.

Nous pouvons donc en conclure que dans notre service, nous avons une bonne reproductibilité et une bonne maitrise de l'immunohistochimie/FISH sur le plan technique et médical notamment grâce au suivi des recommandations de l'ASCO/CAP, du GEFPICS et aux tests d'assurance qualité réalisés [74] [75][76]. C'est un gage de qualité de notre service de pathologie qui permet une bonne corrélation anatomo-clinique et nous apporte la confiance des cliniciens.

4.1.3. Concordance méthode classique/GeneXpert instrument

Pour ce qui est du test STRAT4 de la société Cepheid, nous avons obtenu à l'aide de GeneXpert un haut niveau de reproductibilité, comparable aux différentes études déjà menées jusque-là. Nous avons eu pour l'ensemble de nos 253 cas (pièces opératoires + biopsies) une concordance IHC-FISH/GeneXpert de 96,8% pour RE, 79,7% pour RP, 67% pour Her2 et 72,1% pour le KI67.

En comparaison, la première étude STRAT4 menée, effectuée de manière rétrospective sur 80 cas diagnostiqués de 1998 à 2011 a montré une concordance de 91,2% pour Her2 en utilisant les recommandations de l'ASCO 2007 (qui généraient moins de cas équivoques que les recommandations de 2013 que nous avons suivies).[57]

Une deuxième étude rétrospective américaine ciblant cette fois, comme nous, les quatre biomarqueurs d'intérêts, a été menée sur 503 dossiers venant de 5 hôpitaux à travers le monde. Elle a montré notamment, en utilisant les mêmes cut-offs et dCt que dans notre étude, des meilleurs taux de concordance (97,8% pour RE, 91% pour RP, 93,3% pour Her2 et 73% pour Ki67).[77]

Nous ne savons pas expliquer les différences de concordances de ces deux études, notamment pour les résultats de RP et Her2. Il s'agit en effet de deux études établies à partir du même protocole (STRAT4) et utilisant le même matériel GeneXpert de Cepheid.

On peut supposer qu'il existe un impact dû au microenvironnement du cancer infiltrant, notamment la présence de carcinome in situ, ou une dilution des cellules tumorales par le stroma et le tissu sain périphérique qui pourrait fausser les résultats de GeneXpert si la macro dissection n'est pas optimale [78] . Dans notre étude nous n'avons pas vérifié, après analyse, si pour les cas discordants Her2 et RP il y avait une forte présence ou non en intra tumoral de

carcinome in situ. Nous n'avons pas non plus regardé le pourcentage de cellule tumorale dans la zone sélectionnée lors de la macro dissection pour ces cas discordants.

Cependant une étude qui a porté sur 80 cas de macro biopsies (60 cas de carcinome infiltrant pur et 20 cas de carcinome associant in situ et infiltrant), a montré l'absence d'impact significatif de la macro dissection sur les résultats de GeneXpert [79]. Ces analyses sont à confirmer sur une plus grande population et sur pièces opératoires. D'autres études portant sur la fiabilité des techniques de RT-qPCR arrivent néanmoins à la même conclusion [68] [80].

4.1.4. Optimisation des dCt

Les seuils de dCt utilisés dans notre étude pour les quatre biomarqueurs ont été préétablis dans le protocole du test Xpert Breast Cancer STRAT4 à partir d'essais préalables réalisés sur de petites bases de données.

Nous avons donc essayé d'optimiser ces dCt à l'aide de courbe ROC afin d'arriver à de meilleurs résultats et de plus hauts niveaux de concordance.

Pour RP, avec un cut-off IHC $\geq$10% (seuil de positivité français), un dCt optimisé à -0,5 permet une concordance de 88% (contre 79,7%). De même pour Her2 un dCt à -0,4 permet d'améliorer la VPP qui est primordiale pour le bon choix du traitement et d'obtenir une concordance de 92% contre 67%. Enfin pour le Ki67, nous avons objectivé qu'un seuil IHC $\geq$10% permet une meilleure discrimination des cas en positif/négatif.

Nous pouvons donc en conclure que la société Cepheid devra revoir ses valeurs de dCt pour les optimiser au mieux, en s'appuyant sur les quelques études menées jusqu'à ce jour, dont la nôtre.[77]

4.1.5. Concordance biopsie/pièce opératoire

Notre étude a également porté sur la comparaison des résultats des couples biopsie/pièce opératoire en IHC/FISH et en biologie moléculaire. Nous avons pu remarquer que pour nos 53 couples les concordances étaient meilleures en IHC pour Her2 (98%/78%) et pour Ki67 (75%/46%). Pour RE et RP à contrario, les concordances étaient meilleures avec l'analyse par biologie moléculaire (96%/90% pour RE et 90%/86,3% pour RP).

Cependant après relecture, 86% des couples discordants en IHC ont des marquages hétérogènes sur pièce opératoire ou sont des dossiers pour lesquels il y a eu un traitement néo adjuvant susceptible de modifier le profil de la tumeur.

4.1.6. Choix du gène de ménage

Comme nous l'avons vu, GeneXpert Instrument fonctionne à l'aide d'un gène de ménage servant de témoin, de régulateur et permettant de calculer le dCt. Le gène de ménage choisi par la société Cepheid est *CYFIP1*. Un gène de ménage fiable est obligatoire pour une mesure précise de la quantification relative de l'expression des ARNm. Ce référent est choisi parmi les gènes cellulaires qui sont exprimés de façon équivalente dans toutes les cellules de tous les échantillons évalués. Cependant, plusieurs études ont montré que la plupart de ces gènes ne sont pas toujours exprimés de façon stable entre les personnes et les différents sous-types de cancer du sein [81]. Certaines études portent sur la recherche du meilleur gène de ménage, le plus stable, pour permettre le meilleur calcul de dCt et des résultats les plus fiables. Les gènes qui sont majoritairement cités sont *PUM1, GAPDH, ACTB, UBB, RPLP37* et *RPL30.* Tous ces

gènes s'expriment de façon constitutionnelle dans les tissus mammaires, et ont des fonctions cellulaires qui ne sont pas co-régulées [56] [82].

Parmi ces études nous n'avons pas retrouvé *CYFIP1* et nous ne savons pas sur quelles données précises il a été sélectionné. Ce point reste donc à éclaircir d'autant plus que de récentes études montrent une variation de l'expression du gène *CYFIP1* dans des maladies mentales (autisme, schizophrénie, syndrome X fragile…) et dans des cancers nasopharyngés.[83] [84]

4.2. Point sur d'autres études de RT-qPCR

Actuellement différentes sociétés développent des tests pour établir les signatures moléculaires des cancers du sein notamment de certains cas RE+, comme nous l'avons vu en introduction [85]. Quelques-uns utilisent comme technique de biologie moléculaire la RT-qPCR [86]. C'est le cas notamment d'Endopredict® et Oncotype DX® qui en apportant un risque relatif de récidive à 10 ans permettent notamment d'homogénéiser les pratiques de prescription de la chimiothérapie.[87]

D'autres se penchent sur l'évaluation du sous-type moléculaire. Par exemple, MammaTyper® (BioNTech Diagnostics, Mayence, Allemagne) qui est un nouveau test diagnostic in vitro. Il quantifie, comme nous, l'expression de l'ARNm des quatre biomarqueurs clés, *ERBB2, ESR1*, *PGR et MKI67* sur la base de la RT-qPCR [68]. Une étude prospective sur 8 jours, internationale, effectuée dans 10 laboratoires a montré une grande reproductibilité dans l'évaluation quantitative inter et intra-laboratoire des marqueurs *ERBB2, ESR1, PGR* et *MKI67*, avec respectivement des κ de 1 ; 0,91 ; 0,94 et 0,94, et surmonte ainsi la variabilité connue de l'IHC [88].

Toutes ces études sur l'analyse des biomarqueurs et signatures moléculaires du sein par RT-qPCR s'accordent donc également à dire qu'il s'agit d'une méthode de biologie moléculaire quantitative, fiable, non subjective, adaptée au matériel en FFPE.

4.3. Point sur l'intérêt de Xpert Breast Cancer STRAT4

La mesure des ARNm qui codent les biomarqueurs protéiques ER, PR, HER2 et Ki67 (*ESR1, PGR*, *ERBBB2* et *MKi67*, respectivement) sur une plateforme de diagnostic automatisée permet d'en faire une méthode reproductible, standardisée, précise [89][68].

STRAT4 permet à l'aide de ses cartouches d'être dans un système clos, pour éviter toutes contaminations. Il s'agit d'une méthode in vitro semi-quantitative, fiable, reproductible, rapide et facile d'utilisation nécessitant moins de 10 min de main d'œuvre pour le lancement d'un appareil avec 4 échantillons patients et 75 min d'analyse [57]. A l'inverse l'IHC/FISH sont des méthodes plus chronophages nécessitant un bon plateau technique, des techniciens entrainés et des médecins expérimentés afin de pouvoir prétendre être une méthode fiable [56]. En moyenne les automates d'IHC prennent 30 lames à la fois soit 7 dossiers (avec RE, RP, Her2, Ki67) pour des programmes de 187min au maximum (Ki67). En pratique dans les laboratoires, les lames d'immunohistochimie sont rendues en 24H et de FISH en 48H.

Dans les pays en voie de développement, notamment sub-sahariens, il est difficile de mettre au point des plateaux techniques performants et fiables avec du personnel qualifié pour l'utilisation d'IHC/FISH. Pourtant l'essor des cancers et notamment du cancer du sein est devenu un problème de santé majeur dans ces pays [90]. Au cours des dernières années, des traitements efficaces comme le tamoxifène ou le trastuzumab sont devenus disponibles pour les femmes atteintes d'un cancer du sein. Malheureusement, l'accès à des technologies

diagnostiques de haute qualité capables d'évaluer les biomarqueurs et le sous-type moléculaire du cancer de manière fiable et précise est difficile. [91]

Par conséquent, compte tenu des bons résultats de concordance du test STRAT4 vu ci-dessus, de sa facilité d'utilisation, et du fait qu'elle soit adaptée pour extraire les acides nucléiques des tissus FFPE, GeneXpert pourrait être considéré comme une solution potentielle au problème de l'accès limité au diagnostic du sous- type moléculaire du cancer du sein qui existe actuellement dans les pays à faibles ressources. D'autant plus que la plate-forme, qui est déjà largement distribuée dans le monde entier avec plus de 17 000 instruments en service dans 182 pays, est également déjà utilisée en biologie dans les pays Africains.[92] En effet, pour détecter le virus EBOLA, virus à ARN, la simplicité d'utilisation de la plate-forme, à l'aide d'autre cartouche, permet d'effectuer rapidement des tests dans une grande variété de laboratoires, y compris des laboratoires éloignés qui ne sont pas en mesure d'effectuer des tests d'amplification d'acide nucléique très complexes.[93]

4.4. Point sur le coût des techniques

Pour avoir une idée du coût de ces différentes techniques, le panel RE, RP, Her2, Ki67 en immunohistochimie revient à 47 euros pour les réactifs (sans compter le coût de main d'œuvre et appareils) et 65 euros pour une FISH, soit 112 euros environ pour un dossier complet. En comparaison une cartouche STRAT4 revient à 150 euros. Mais comme vu ci-dessus, le temps de main d'œuvre (techniciens, médecins, équipements...) est plus élevé pour l'IHC/FISH. Le ratio coût/efficacité de ce test est donc intéressant pour les pays en voie de développement.

V. CONCLUSION

Au cours des dernières décennies, les directives de l'ASCO/CAP ont considérablement contribué à élever le niveau de normalisation des IHC pour HER2, ER et PR. Pourtant, les taux de discordance des marqueurs entre les tests locaux et centraux, souvent signalés dans le cadre d'essais cliniques modernes de grande envergure, révèlent la persistance de limites techniques et interprétatives. Pour le Ki-67 en particulier, les performances analytiques sous-optimales rendent discutable l'utilisation de ce marqueur pour la sélection des patients qui sont candidats à la chimiothérapie malgré la publication de recommandations internationales. D'un point de vue technique, l'application de la RT-qPCR pour évaluer le statut des *ERBB2, ESR1, PGR* et *MKI67* représente une alternative efficace et reproductible pour l'évaluation décentralisée systématique des sous-types moléculaires du cancer du sein. Nous avons dans notre étude apporté la preuve que la quantification objective de l'expression de l'ARNm *ERBB2, ESR1, PGR* et *MKI67* à l'aide de GeneXpert Instrument de la société Cepheid est simple, rapide, sensible et concordant avec les résultats obtenus par méthode classique d'immunohistochimie.

Clermont-Ferrand, le 6/6/19

Pierre CLAVELOU

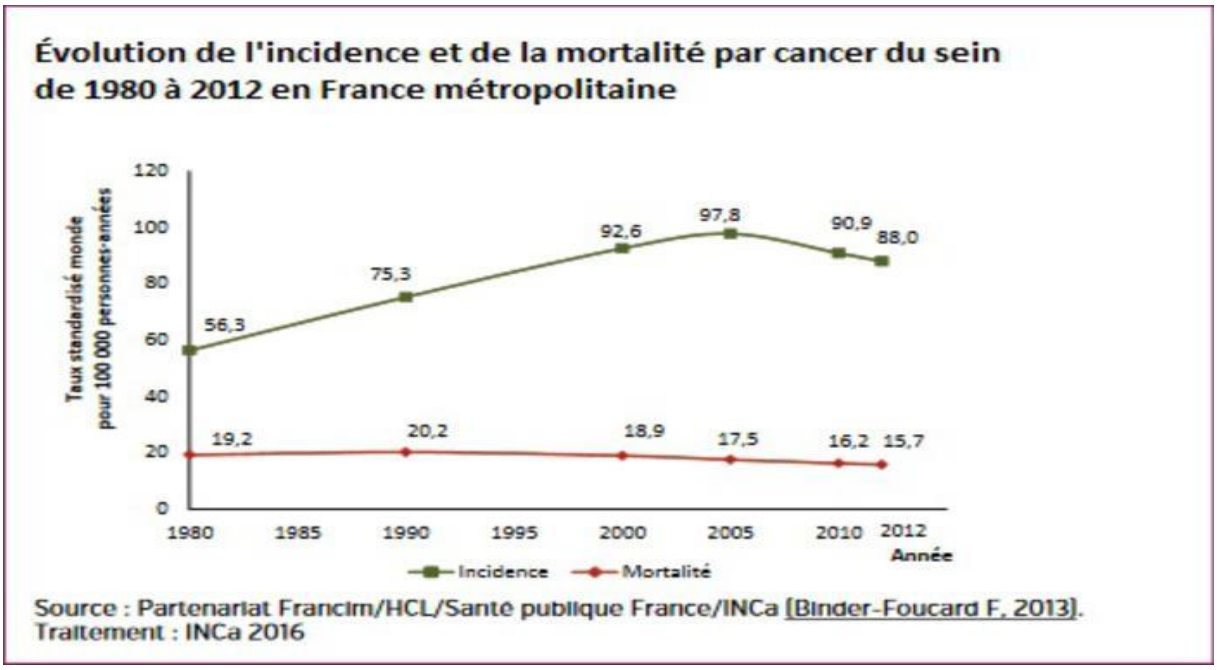
Doyen-Directeur

Clermont-Ferrand, le 29 mai 2019

La Présidente du Jury

Annexes

Annexe 1 : **courbe traçant l'évolution de l'incidence et de la mortalité de 1980 à 2012 en France par cancer mammaire**



Annexe 2 : **classification OMS 2012 des cancers du sein**

EPITHELIAL TUMOURS

Microinvasive carcinoma

Invasive breast carcinoma

Invasive carcinoma of no special type (NST)	8500/3
Pleomorphic carcinoma	8022/3
Carcinoma with osteoclast-like stromal giant cells	8035/3
Carcinoma with choriocarcinomatous features	
Carcinoma with melanotic features	
Invasive lobular carcinoma	8520/3
Classic lobular carcinoma	
Solid lobular carcinoma	
Alveolar lobular carcinoma	
Pleomorphic lobular carcinoma	
Tubulolobular carcinoma	
Mixed lobular carcinoma	
Tubular carcinoma	8211/3
Cribriform carcinoma	8201/3
Mucinous carcinoma	8480/3
Carcinoma with medullary features	
Medullary carcinoma	8510/3
Atypical medullary carcinoma	8513/3
Invasive carcinoma NST with medullary features	8500/3
Carcinoma with apocrine differentiation	
Carcinoma with signet-ring-cell differentiation	
Invasive micropapillary carcinoma	8507/3*
Metaplastic carcinoma of no special type	8575/3
Low-grade adenosquamous carcinoma	8570/3
Fibromatosis-like metaplastic carcinoma	8572/3
Squamous cell carcinoma	8070/3
Spindle cell carcinoma	8032/3
Metaplastic carcinoma with mesenchymal differentiation	
Chondroid differentiation	8571/3
Osseous differentiation	8571/3
Other types of mesenchymal differentiation	8575/3
Mixed metaplastic carcinoma	8575/3
Myoepithelial carcinoma	8982/3

Rare types

Carcinoma with neuroendocrine features	
Neuroendocrine tumour, well-differentiated	8246/3
Neuroendocrine carcinoma, poorly differentiated (small cell carcinoma)	8041/3
Carcinoma with neuroendocrine differentiation	8574/3
Secretory carcinoma	8502/3
Invasive papillary carcinoma	
Acinic cell carcinoma	
Mucoepidermoid carcinoma	
Polymorphous carcinoma	
Oncocytic carcinoma	
Lipid-rich carcinoma	
Glycogen-rich clear cell carcinoma	
Sebaceous carcinoma	
Salivary gland/skin adnexal type tumours	
Cylindroma	
Clear cell hidradenoma	

Epithelial–myoepithelial tumours

Pleomorphic adenoma	
Adenomyoepithelioma	
Adenomyoepithelioma with carcinoma	
Adenoid cystic carcinoma	

Precursor lesions

Ductal carcinoma in situ	
Lobular neoplasia	
Lobular carcinoma in situ	
Classic lobular carcinoma in situ	
Pleomorphic lobular carcinoma in situ	
Atypical lobular hyperplasia	

Intraductal proliferative lesions

Usual ductal hyperplasia	
Columnar cell lesions including flat epithelial atypia	
Atypical ductal hyperplasia	

Papillary lesions

Intraductal papilloma	
Intraductal papilloma with atypical hyperplasia	
Intraductal papilloma with ductal carcinoma in situ	
Intraductal papilloma with lobular carcinoma in situ	
Intraductal papillary carcinoma	
Encapsulated papillary carcinoma	
Encapsulated papillary carcinoma with invasion	
Solid papillary carcinoma	
In situ	
Invasive	

Benign epithelial proliferations

Sclerosing adenosis	
Apocrine adenosis	
Microglandular adenosis	
Radial scar/complex sclerosing lesion	
Adenomas	
Tubular adenoma	8211/0
Lactating adenoma	8204/0
Apocrine adenoma	8401/0
Ductal adenoma	8503/0

MESENCHYMAL TUMOURS

Nodular fasciitis	8828/0*
Myofibroblastoma	8825/0
Desmoid-type fibromatosis	8821/1
Inflammatory myofibroblastic tumour	8825/1
Benign vascular lesions	
Haemangioma	9120/0
Angiomatosis	
Atypical vascular lesions	
Pseudoangiomatous stromal hyperplasia	
Granular cell tumour	9580/0
Benign peripheral nerve-sheath tumours	
Neurofibroma	9540/0
Schwannoma	9560/0
Lipoma	8850/0
Angiolipoma	8861/0
Liposarcoma	8850/3
Angiosarcoma	9120/3
Rhabdomyosarcoma	8900/3
Osteosarcoma	9180/3
Leiomyoma	8890/0
Leiomyosarcoma	8890/3

FIBROEPITHELIAL TUMOURS

Fibroadenoma	9010/0
Phyllodes tumour	9020/1
Benign	9020/0
Borderline	9020/1
Malignant	9020/3
Periductal stromal tumour, low grade	9020/3
Hamartoma	

TUMOURS OF THE NIPPLE

Nipple adenoma	8506/0
Syringomatous tumour	8407/0
Paget disease of the nipple	8540/3

11 Formes fréquentes de carcinome mammaire :

1. Carcinome infiltrant de type non spécifique NST

2. Carcinome lobulaire infiltrant

3. Carcinome tubuleux

4. Carcinome cribriforme

5. Carcinome mucineux

6. Carcinome avec aspects médullaires

7. Carcinome à différenciation apocrine

8. Carcinome avec cellules en bague à châton

9. Carcinome invasive de type micropapillaire

10. Carcinome métaplasique

11. Carcinome adénoîde kystique

11 Formes rares de carcinome mammaire :

1.Carcinome avec différenciation neuroendocrine

2.Carcinome sécrétoire

3.Carcinome papillaire infiltrant

4.Carcinome à cellule acineuse

5.Carcinome mucoépidermoîde

6.Carcinome polymorphe

7.Carcinome oncocytique

8.Carcinome riche en lipide

9.Carcinome à cellules claires (riche en glycogène)

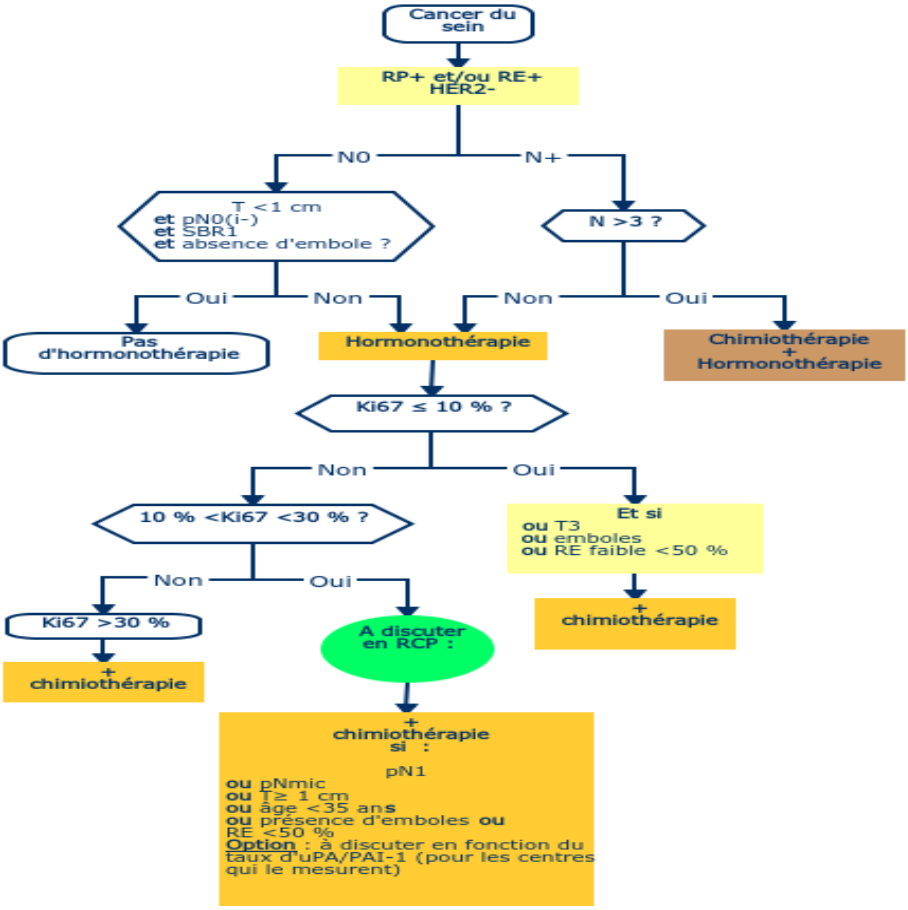
10.Carcinome sébacé

11.Tumeur de type annexes de la peau/ glandes salivaires

Annexe 3 : **classification TNM du cancer du sein OMS 2012**

Catégorie	Critères
Tx	Tumeur primaire non évaluable
T0	Pas de tumeur primaire
Tis (CCIS)	Carcinome in situ de type canalaire
Tis (Paget)	Maladie de Paget seule
T1≤20mm	
T1mi	≤1mm
T1a	>1 et ≤ 5 mm
T1b	>5 et ≤ 10 mm
T1c	>10 et ≤ 20 mm
T2	>20 et ≤ 50 mm
T3	>50
T4	Extension à la paroi thoracique ou peau, peu importe la taille
Nx	Évaluation ganglionnaire régionale non réalisable
N0	Absence de métastase ganglionnaire
N0(i+)	Présence de cellules tumorales isolées $\leq 0{,}2mm$
N1	
N1mi	Micro métastase ($\approx 200\ cellules\ soit\ > 0{,}2\ et\ \leq 2mm$)
N1a	Métastase dans 1 à 3 ganglions axillaires dont au moins une >2mm
N1b	Métastase >0,2 mm dans les ganglions sentinelles mammaires internes
N1c	Association des deux précédents
N2	
N2a	Métastases dans 4 à9 ganglions axillaires dont au moins une >2mm
N2b	Métastase mammaire interne clinique

Annexe 4 : **exemple d'arbre décisionnel thérapeutique pour un cancer du sein de sous type moléculaire Luminal [16]**



Annexe 5 **: différentes étapes la manipulation fournie dans le manuel de la société Cepheid®**

Le pathologiste sélectionne la zone de carcinome mammaire invasif sur la lame colorée en HPS.

1 : macro disséquer dans le bloc de paraffine la zone sélectionnée par le médecin, et effectuer une coupe au microtome à 10 µm d'épaisseur afin de récupérer cette zone.

2 : introduire cette coupe dans un tube de 1,5 millilitre (ml) identifié.

3 : ajouter 1,2 ml de tampon de lyse (permettant la digestion de la coupe de paraffine).

4 : y ajouter 20 microlitres (µL) de protéinase K. Cela permet de digérer les protéines présentes dans l'échantillon et de rendre l'ARN accessible.

5 : agiter le tube pendant 5 secondes grâce à un vortex.

6 : centrifuger brièvement le tube afin d'homogénéiser la solution et que celle-ci soit au fond du tube.

7 : mettre le tube dans un thermomixer chauffé à 80 degrés Celsius (°C) pendant 30 minutes (température d'action de la protéinase K).

8 : homogénéiser la solution présente dans le tube de 1,5 mL grâce à un vortex pendant 5 secondes.

9 : centrifuger brièvement.

10 : transférer la totalité de la solution présente du tube de 1,5 mL dans le tube de 5 mL identifié.

11 : introduire 1,2 mL d'éthanol à 99 % dans le tube de 5 mL.

12 : homogénéiser grâce à un vortex pendant 15 secondes.

13 : identifier la cartouche avec le numéro du cas et du bloc

14 : homogénéiser à nouveau pendant 15 secondes.

15 : ouvrir la cartouche.

16 : transférer 520 µL de cette solution dans la cartouche.

17 : refermer la cartouche et l'insérer dans le thermocycleur.

La cartouche contient différentes chambres réactionnelles dans lesquelles il y a la reverse transcriptase (RT), l'enzyme qui permet de polymériser l'ADN (Taq polymerase), du chlorure de magnésium, les amorces, des nucléotides, du tampon, des sondes quencher fluorochrome pour les 4 cibles recherchées et le gène de ménage « CYFIP » qui permet de contrôler que l'amplification a bien eu lieu.

Le reste de la solution est conservée au réfrigérateur à 4°C.

Ensuite, la cartouche est insérée dans un thermocycleur qui effectue 40 cycles de RT-qPCR. La dénaturation se fait à 95°C, l'hybridation se fait à 68°C, élongation 72°C. L'analyse dans le thermocycleur dure une heure et dix minutes. Sur cet automate, il est possible de passer 4 échantillons en même temps, indépendamment les uns des autres.

Une fois l'analyse terminée, on remplit notre tableur avec les informations concernant la surface du fragment qui a été macro disséquée et le pourcentage de cellules tumorales que contenait ce fragment. Enfin, le tableur et les résultats de l'analyse sont envoyés à la société Cepheid.

Annexe 6 : **matériels et réactifs utiles pour effectuer l'analyse avec GeneXpert Instrument**

Cette technique nécessite plusieurs équipements et consommables :

- Microtome
- Scalpel
- Thermomixer
- Une centrifugeuse de paillasse
- Un vortex
- Une pipette (1000 µL)
- Une pipette (20 µL)
- Alcool a 99°
- RNAse away® (solution de décontamination)

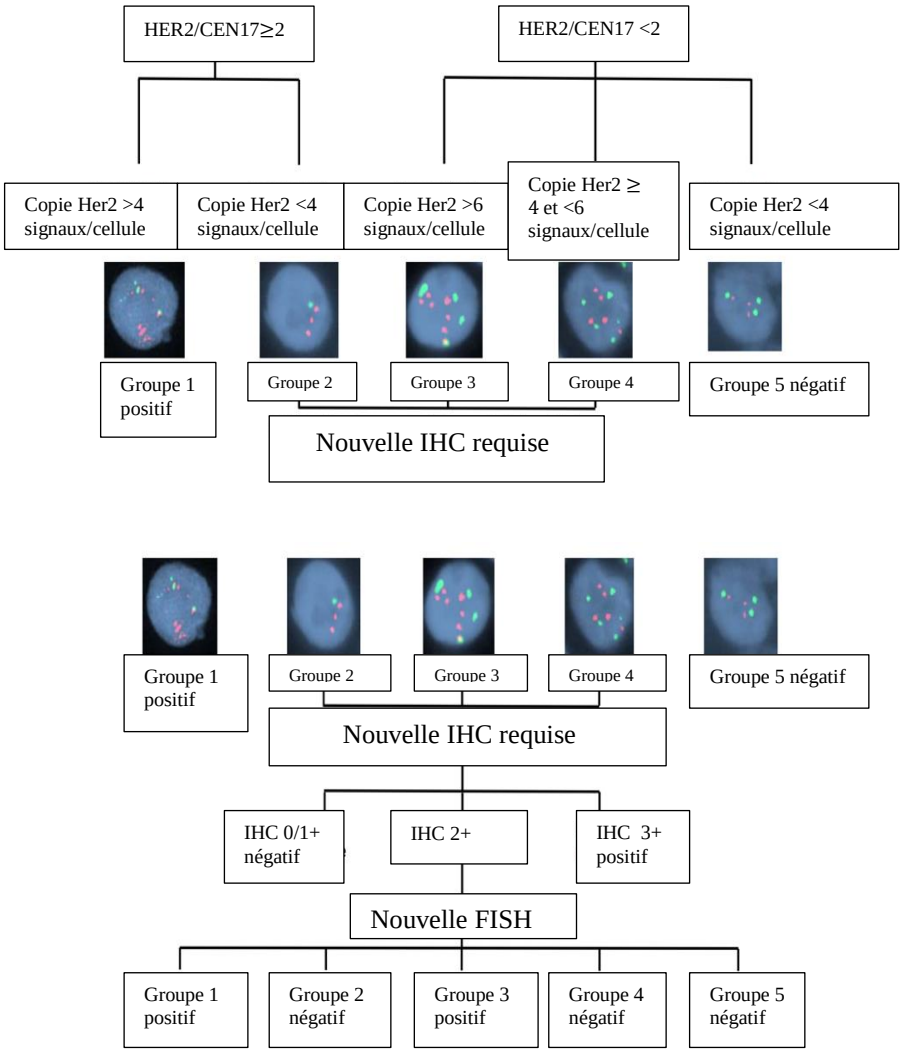
La société Cepheid® fournit :

- Un thermocycleur
- Un ordinateur
- Des kits contenant les cartouches (milieu réactionnel, enzymes, amorces, sonde quencher-fluorochrome, contrôle interne), les tubes de 1,5 ml et de 5 ml, le tampon de lyse et la protéine K.





Annexe 7 : **nouvelles recommandations de l'ASCO 2018 pour l'évaluation du statut HER2 FISH**



Bibliographie

1. Facteurs de risque - Cancer du sein | Institut National Du Cancer [Internet]. [cité 13 juill 2018]. Disponible sur: http://www.e-cancer.fr/Patients-et-proches/Les-cancers/Cancer-du-sein/Facteurs-de-risque

2. Le cancer du sein - Les cancers les plus fréquents | Institut National Du Cancer [Internet]. [cité 13 juill 2018]. Disponible sur: http://www.e-cancer.fr/Professionnels-de-sante/Les-chiffres-du-cancer-en-France/Epidemiologie-des-cancers/Les-cancers-les-plus-frequents/Cancer-du-sein

3. cancers-sein.pdf [Internet]. [cité 13 juill 2018]. Disponible sur: https://lecancer.fr/media/cancers-sein.pdf

4. Facteurs de risque du cancer du sein - Société canadienne du cancer [Internet]. www.cancer.ca. [cité 13 juill 2018]. Disponible sur: http://www.cancer.ca/fr-ca/cancer-information/cancer-type/breast/risks/?region=bc

5. WHO Classification of Tumours of the Breast. Fourth Edition - WHO - OMS - [Internet]. [cité 14 juill 2018]. Disponible sur: http://apps.who.int/bookorders/anglais/detart1.jsp?codlan=1&codcol=70&codcch=4004

6. Sastre-Garau X, Jouve M, Asselain B, Vincent-Salomon A, Beuzeboc P, Dorval T, et al. Infiltrating lobular carcinoma of the breast. Clinicopathologic analysis of 975 cases with reference to data on conservative therapy and metastatic patterns. Cancer. 1 janv 1996;77(1):113‑20.

7. Li CI, Weiss NS, Stanford JL, Daling JR. Hormone replacement therapy in relation to risk of lobular and ductal breast carcinoma in middle-aged women. Cancer. 1 juin 2000;88(11):2570‑7.

8. Li CI, Anderson BO, Porter P, Holt SK, Daling JR, Moe RE. Changing incidence rate of invasive lobular breast carcinoma among older women. Cancer. 1 juin 2000;88(11):2561‑9.

9. Chand P, Garg A, Singla V, Rani N. Evaluation of Immunohistochemical Profile of Breast Cancer for Prognostics and Therapeutic Use. Niger J Surg Off Publ Niger Surg Res Soc. 2018;24(2):100‑6.

10. Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. Histopathology. nov 1991;19(5):403‑10.

11. Le Doussal V, Tubiana-Hulin M, Friedman S, Hacene K, Spyratos F, Brunet M. Prognostic value of histologic grade nuclear components of Scarff-Bloom-Richardson (SBR). An improved score modification based on a multivariate analysis of 1262 invasive ductal breast carcinomas. Cancer. 1 nov 1989;64(9):1914‑21.

12. al HN et. Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets. - PubMed - NCBI [Internet]. [cité 1 oct 2018]. Disponible sur: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Heldring+N%2C+Pike+A%2C+Andersson+S%2C+et+al.+Estrogen+receptors%3A+how+do+they+signal+and+what+are+their+targets.+P

hysiol+Rev+2007+%3B+87+%3A+905%E2%80%93931.

13. Hammond MEH, Hayes DF, Dowsett M, Allred DC, Hagerty KL, Badve S, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer (unabridged version). Arch Pathol Lab Med. juill 2010;134(7):e48-72.

14. Bansal C, Sharma A, Pujani M, Pujani M, Sharma KL, Srivastava A, et al. Correlation of Hormone Receptor and Human Epidermal Growth Factor Receptor-2/neu Expression in Breast Cancer with Various Clinicopathologic Factors. Indian J Med Paediatr Oncol Off J Indian Soc Med Paediatr Oncol. 2017;38(4):483‑9.

15. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG), Davies C, Godwin J, Gray R, Clarke M, Cutter D, et al. Relevance of breast cancer hormone receptors and other factors to the efficacy of adjuvant tamoxifen: patient-level meta-analysis of randomised trials. Lancet Lond Engl. 27 2011;378(9793):771‑84.

16. Référentiel «Sein (principes de prise en charge)» [Internet]. [cité 8 oct 2018]. Disponible sur: http://oncologik.fr/referentiels/interregion/sein-principes-de-prise-en-charge

17. Dehdashti F, Laforest R, Gao F, Aft RL, Dence CS, Zhou D, et al. Assessment of Progesterone Receptors in Breast Carcinoma by PET with 21-18F-Fluoro-16α,17α-[(R)-(1′-α-furylmethylidene) Dioxy]-19-Norpregn-4-Ene-3,20-Dione. J Nucl Med Off Publ Soc Nucl Med. mars 2012;53(3):363‑70.

18. The biology of breast carcinoma - Keen - 2003 - Cancer - Wiley Online Library [Internet]. [cité 22 oct 2018]. Disponible sur: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/cncr.11126

19. Arnould L, Denoux Y, MacGrogan G, Penault-Llorca F, Fiche M, Treilleux I, et al. Agreement between chromogenic in situ hybridisation (CISH) and FISH in the determination of HER2 status in breast cancer. Br J Cancer. 19 mai 2003;88(10):1587‑91.

20. Perez EA, Romond EH, Suman VJ, Jeong J-H, Sledge G, Geyer CE, et al. Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer: planned joint analysis of overall survival from NSABP B-31 and NCCTG N9831. J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol. 20 nov 2014;32(33):3744‑52.

21. Faheem M, Mahmood H, Khurram M, Qasim U, Irfan J. Estrogen receptor, progesterone receptor, and Her 2 Neu positivity and its association with tumour characteristics and menopausal status in a breast cancer cohort from northern Pakistan. Ecancermedicalscience. 2012;6:283.

22. Taneja P, Maglic D, Kai F, Zhu S, Kendig RD, Fry EA, et al. Classical and Novel Prognostic Markers for Breast Cancer and their Clinical Significance. Clin Med Insights Oncol. 20 avr 2010;4:15‑34.

23. Carvajal-Hausdorf DE, Schalper KA, Pusztai L, Psyrri A, Kalogeras KT, Kotoula V, et al. Measurement of Domain-Specific HER2 (ERBB2) Expression May Classify Benefit From Trastuzumab in Breast Cancer. J Natl Cancer Inst. août 2015;107(8).

24. Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-

67. J Immunol Baltim Md 1950. oct 1984;133(4):1710‑5.

25. Penault-Llorca F, Radosevic-Robin N. Ki67 assessment in breast cancer: an update. Pathology (Phila). févr 2017;49(2):166‑71.

26. Kontzoglou K, Palla V, Karaolanis G, Karaiskos I, Alexiou I, Pateras I, et al. Correlation between Ki67 and breast cancer prognosis. Oncology. 2013;84(4):219‑25.

27. Faneyte IF, Schrama JG, Peterse JL, Remijnse PL, Rodenhuis S, van de Vijver MJ. Breast cancer response to neoadjuvant chemotherapy: predictive markers and relation with outcome. Br J Cancer. 10 févr 2003;88(3):406‑12.

28. Ellis MJ, Suman VJ, Hoog J, Goncalves R, Sanati S, Creighton CJ, et al. Ki67 Proliferation Index as a Tool for Chemotherapy Decisions During and After Neoadjuvant Aromatase Inhibitor Treatment of Breast Cancer: Results From the American College of Surgeons Oncology Group Z1031 Trial (Alliance). J Clin Oncol. 1 avr 2017;35(10):1061‑9.

29. Pathmanathan N, Balleine RL. Ki67 and proliferation in breast cancer. J Clin Pathol. juin 2013;66(6):512‑6.

30. Luporsi E, André F, Spyratos F, Martin P-M, Jacquemier J, Penault-Llorca F, et al. Ki-67: level of evidence and methodological considerations for its role in the clinical management of breast cancer: analytical and critical review. Breast Cancer Res Treat. avr 2012;132(3):895‑915.

31. Dowsett M, Nielsen TO, A'Hern R, Bartlett J, Coombes RC, Cuzick J, et al. Assessment of Ki67 in Breast Cancer: Recommendations from the International Ki67 in Breast Cancer Working Group. JNCI J Natl Cancer Inst. 16 nov 2011;103(22):1656‑64.

32. Tashima R, Nishimura R, Osako T, Nishiyama Y, Okumura Y, Nakano M, et al. Evaluation of an Optimal Cut-Off Point for the Ki-67 Index as a Prognostic Factor in Primary Breast Cancer: A Retrospective Study. PLoS ONE [Internet]. 15 juill 2015 [cité 31 mai 2019];10(7). Disponible sur: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4503758/

33. Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. Nature. 17 août 2000;406(6797):747‑52.

34. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. - PubMed - NCBI [Internet]. [cité 8 oct 2018]. Disponible sur: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Gene+expression+patterns+of+breast+carcinomas+distinguish+tumor+subclasses+with+clinical+implications.

35. Prat A, Pineda E, Adamo B, Galván P, Fernández A, Gaba L, et al. Clinical implications of the intrinsic molecular subtypes of breast cancer. The Breast. 1 nov 2015;24:S26‑35.

36. Cheang MCU, Chia SK, Voduc D, Gao D, Leung S, Snider J, et al. Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. J Natl Cancer Inst. 20 mai 2009;101(10):736‑50.

37. Goldhirsch A, Wood WC, Coates AS, Gelber RD, Thürlimann B, Senn H-J, et al. Strategies for subtypes--dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St.

Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol. août 2011;22(8):1736‑47.

38. Cejalvo JM, Pascual T, Fernández-Martínez A, Brasó-Maristany F, Gomis RR, Perou CM, et al. Clinical implications of the non-luminal intrinsic subtypes in hormone receptor-positive breast cancer. Cancer Treat Rev. juin 2018;67:63‑70.

39. Coates AS, Winer EP, Goldhirsch A, Gelber RD, Gnant M, Piccart-Gebhart M, et al. Tailoring therapies--improving the management of early breast cancer: St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2015. Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol. août 2015;26(8):1533‑46.

40. Inic Z, Zegarac M, Inic M, Markovic I, Kozomara Z, Djurisic I, et al. Difference between Luminal A and Luminal B Subtypes According to Ki-67, Tumor Size, and Progesterone Receptor Negativity Providing Prognostic Information. Clin Med Insights Oncol. 2014;8:107‑11.

41. Lavasani MA, Moinfar F. Molecular classification of breast carcinomas with particular emphasis on « basal-like » carcinoma: a critical review. J Biophotonics. avr 2012;5(4):345‑66.

42. Li Z, Hu P, Tu J, Yu N. Luminal B breast cancer: patterns of recurrence and clinical outcome. Oncotarget. 17 août 2016;7(40):65024‑33.

43. Baena Cañada JM, Ramírez Daffós P, Díaz Díaz V, Estalella Mendoza S, Díaz Gómez L, González Calvo E, et al. [Experience with a simplified format of decision making tool adjuvant! Online in breast cancer patients]. Rev Calid Asist Organo Soc Espanola Calid Asist. août 2010;25(4):228‑31.

44. Giuliano AE, Connolly JL, Edge SB, Mittendorf EA, Rugo HS, Solin LJ, et al. Breast Cancer-Major changes in the American Joint Committee on Cancer eighth edition cancer staging manual. CA Cancer J Clin. 08 2017;67(4):290‑303.

45. Tian S, Roepman P, Van't Veer LJ, Bernards R, de Snoo F, Glas AM. Biological functions of the genes in the mammaprint breast cancer profile reflect the hallmarks of cancer. Biomark Insights. 28 nov 2010;5:129‑38.

46. Paik S, Shak S, Tang G, Kim C, Baker J, Cronin M, et al. A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. N Engl J Med. 30 déc 2004;351(27):2817‑26.

47. Sparano JA, Gray RJ, Makower DF, Pritchard KI, Albain KS, Hayes DF, et al. Adjuvant Chemotherapy Guided by a 21-Gene Expression Assay in Breast Cancer. N Engl J Med. 12 juill 2018;379(2):111‑21.

48. Sparano JA, Gray RJ, Makower DF, Pritchard KI, Albain KS, Hayes DF, et al. Prospective Validation of a 21-Gene Expression Assay in Breast Cancer. N Engl J Med. 19 nov 2015;373(21):2005‑14.

49. Haute Autorité de Santé - Utilité clinique des signatures génomiques dans le cancer du sein de stade précoce - Rapport d'évaluation [Internet]. [cité 6 juin 2019]. Disponible sur: https://www.has-sante.fr/portail/jcms/c_2748998/fr/utilite-clinique-des-signatures-

genomiques-dans-le-cancer-du-sein-de-stade-precoce-rapport-d-evaluation

50. Fitzal F, Filipits M, Rudas M, Greil R, Dietze O, Samonigg H, et al. The genomic expression test EndoPredict is a prognostic tool for identifying risk of local recurrence in postmenopausal endocrine receptor-positive, her2neu-negative breast cancer patients randomised within the prospective ABCSG 8 trial. Br J Cancer. 14 avr 2015;112(8):1405‑10.

51. Polley M-YC, Leung SCY, McShane LM, Gao D, Hugh JC, Mastropasqua MG, et al. An international Ki67 reproducibility study. J Natl Cancer Inst. 18 déc 2013;105(24):1897‑906.

52. Leung SCY, Nielsen TO, Zabaglo L, Arun I, Badve SS, Bane AL, et al. Analytical validation of a standardized scoring protocol for Ki67: phase 3 of an international multicenter collaboration. NPJ Breast Cancer. 18 mai 2016;2:16014.

53. Bustreo S, Osella-Abate S, Cassoni P, Donadio M, Airoldi M, Pedani F, et al. Optimal Ki67 cut-off for luminal breast cancer prognostic evaluation: a large case series study with a long-term follow-up. Breast Cancer Res Treat. 2016;157:363‑71.

54. Orlando L, Viale G, Bria E, Lutrino ES, Sperduti I, Carbognin L, et al. Discordance in pathology report after central pathology review: Implications for breast cancer adjuvant treatment. Breast Edinb Scotl. déc 2016;30:151‑5.

55. Lee M, Lee CS, Tan PH. Hormone receptor expression in breast cancer: postanalytical issues. J Clin Pathol. juin 2013;66(6):478‑84.

56. El Hadi H, Abdellaoui-Maane I, Kottwitz D, El Amrani M, Bouchoutrouch N, Qmichou Z, et al. Development and evaluation of a novel RT-qPCR based test for the quantification of HER2 gene expression in breast cancer. Gene. 20 mars 2017;605:114‑22.

57. Wasserman BE, Carvajal-Hausdorf DE, Ho K, Wong W, Wu N, Chu VC, et al. High concordance of a closed-system, RT-qPCR breast cancer assay for HER2 mRNA, compared to clinically determined immunohistochemistry, fluorescence in situ hybridization, and quantitative immunofluorescence. Lab Investig J Tech Methods Pathol. déc 2017;97(12):1521‑6.

58. Wolff AC, Hammond MEH, Allison KH, Harvey BE, Mangu PB, Bartlett JMS, et al. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Clinical Practice Guideline Focused Update. J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol. 30 mai 2018;JCO2018778738.

59. Tse C, Capeau J. Quantification des acides nucléiques par PCR quantitative en temps réel. Ann Biol Clin (Paris). 1 mai 2003;61(3):279‑93.

60. Kwiatkowski F, Girard M, Hacene K, Berlie J. [Sem: a suitable statistical software adaptated for research in oncology]. Bull Cancer (Paris). oct 2000;87(10):715‑21.

61. Gordian-Arroyo AM, Zynger DL, Tozbikian GH. Impact of the 2018 ASCO/CAP HER2 Guideline Focused Update. Am J Clin Pathol. 8 avr 2019;

62. Les chiffres clés du cancer en France [Internet]. Ligue contre le cancer. [cité 30 avr 2019]. Disponible sur: /article/26089_les-chiffres-cles-des-cancers

63. Haute Autorité de Santé - Cancer du sein : modalités spécifiques de dépistage pour les femmes à haut risque [Internet]. [cité 30 avr 2019]. Disponible sur: https://www.has-sante.fr/portail/jcms/c_1740821/en/cancer-du-sein-modalites-specifiques-de-depistage-pour-les-femmes-a-haut-risque

64. Hanna WM, Rüschoff J, Bilous M, Coudry RA, Dowsett M, Osamura RY, et al. HER2 in situ hybridization in breast cancer: clinical implications of polysomy 17 and genetic heterogeneity. Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc. janv 2014;27(1):4‑18.

65. Polley M-YC, Leung SCY, Gao D, Mastropasqua MG, Zabaglo LA, Bartlett JMS, et al. An international study to increase concordance in Ki67 scoring. Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc. juin 2015;28(6):778‑86.

66. Yardley DA, Kaufman PA, Huang W, Krekow L, Savin M, Lawler WE, et al. Quantitative measurement of HER2 expression in breast cancers: comparison with « real-world » routine HER2 testing in a multicenter Collaborative Biomarker Study and correlation with overall survival. Breast Cancer Res BCR. 18 mars 2015;17:41.

67. Denkert C, Budczies J, von Minckwitz G, Wienert S, Loibl S, Klauschen F. Strategies for developing Ki67 as a useful biomarker in breast cancer. Breast Edinb Scotl. nov 2015;24 Suppl 2:S67-72.

68. Laible M, Schlombs K, Kaiser K, Veltrup E, Herlein S, Lakis S, et al. Technical validation of an RT-qPCR in vitro diagnostic test system for the determination of breast cancer molecular subtypes by quantification of ERBB2, ESR1, PGR and MKI67 mRNA levels from formalin-fixed paraffin-embedded breast tumor specimens. BMC Cancer. 07 2016;16:398.

69. Harris LN, Ismaila N, McShane LM, Andre F, Collyar DE, Gonzalez-Angulo AM, et al. Use of Biomarkers to Guide Decisions on Adjuvant Systemic Therapy for Women With Early-Stage Invasive Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline. J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol. 1 avr 2016;34(10):1134‑50.

70. Sinn H-P, Schneeweiss A, Keller M, Schlombs K, Laible M, Seitz J, et al. Comparison of immunohistochemistry with PCR for assessment of ER, PR, and Ki-67 and prediction of pathological complete response in breast cancer. BMC Cancer. 13 2017;17(1):124.

71. Rizzardi AE, Johnson AT, Vogel RI, Pambuccian SE, Henriksen J, Skubitz AP, et al. Quantitative comparison of immunohistochemical staining measured by digital image analysis versus pathologist visual scoring. Diagn Pathol. 20 juin 2012;7:42.

72. Acs B, Pelekanou V, Bai Y, Martinez-Morilla S, Toki M, Leung SCY, et al. Ki67 reproducibility using digital image analysis: an inter-platform and inter-operator study. Lab Investig J Tech Methods Pathol. janv 2019;99(1):107‑17.

73. Rimm DL, Leung SCY, McShane LM, Bai Y, Bane AL, Bartlett JMS, et al. An international multicenter study to evaluate reproducibility of automated scoring for assessment of Ki67 in breast cancer. Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc. janv 2019;32(1):59‑69.

74. Neumeister VM, Anagnostou V, Siddiqui S, England AM, Zarrella ER, Vassilakopoulou M, et al. Quantitative assessment of effect of preanalytic cold ischemic time

on protein expression in breast cancer tissues. J Natl Cancer Inst. 5 déc 2012;104(23):1815‑24.

75. Wolff AC, Hammond MEH, Hicks DG, Dowsett M, McShane LM, Allison KH, et al. Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update. J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol. 1 nov 2013;31(31):3997‑4013.

76. Qian X-L, Wen HY, Yang Y-L, Gu F, Guo X-J, Liu F-F, et al. Assessment of dual-probe Her-2 fluorescent in situ hybridization in breast cancer by the 2013 ASCO/CAP guidelines produces more equivocal results than that by the 2007 ASCO/CAP guidelines. Breast Cancer Res Treat. août 2016;159(1):31‑9.

77. Wu NC, Wong W, Ho KE, Chu VC, Rizo A, Davenport S, et al. Comparison of central laboratory assessments of ER, PR, HER2, and Ki67 by IHC/FISH and the corresponding mRNAs (ESR1, PGR, ERBB2, and MKi67) by RT-qPCR on an automated, broadly deployed diagnostic platform. Breast Cancer Res Treat. 2018;172(2):327‑38.

78. Lehmann-Che J, Amira-Bouhidel F, Turpin E, Antoine M, Soliman H, Legres L, et al. Immunohistochemical and molecular analyses of HER2 status in breast cancers are highly concordant and complementary approaches. Br J Cancer. 24 mai 2011;104(11):1739‑46.

79. Gupta S, Mani NR, Carvajal-Hausdorf DE, Bossuyt V, Ho K, Weidler J, et al. Macrodissection prior to closed system RT-qPCR is not necessary for estrogen receptor and HER2 concordance with IHC/FISH in breast cancer. Lab Investig J Tech Methods Pathol. 1 juin 2018;

80. Kotoula V, Kalogeras KT, Kouvatseas G, Televantou D, Kronenwett R, Wirtz RM, et al. Sample parameters affecting the clinical relevance of RNA biomarkers in translational breast cancer research. Virchows Arch Int J Pathol. févr 2013;462(2):141‑54.

81. Kılıç Y, Çelebiler AÇ, Sakızlı M. Selecting housekeeping genes as references for the normalization of quantitative PCR data in breast cancer. Clin Transl Oncol Off Publ Fed Span Oncol Soc Natl Cancer Inst Mex. févr 2014;16(2):184‑90.

82. Bustin SA, Benes V, Nolan T, Pfaffl MW. Quantitative real-time RT-PCR--a perspective. J Mol Endocrinol. juin 2005;34(3):597‑601.

83. Bachmann SO, Sledziowska M, Cross E, Kalbassi S, Waldron S, Chen F, et al. Behavioral training rescues motor deficits in Cyfip1 haploinsufficiency mouse model of autism spectrum disorders. Transl Psychiatry. 21 janv 2019;9(1):29.

84. Shi X, Chen X, Li WC, Mo LJ, Lin ZY, Li YY, et al. Low expression of Cyfip1 may be a potential biomarker in nasopharyngeal carcinoma. Neoplasma. 2018;65(2):292‑5.

85. Hanna MG, Bleiweiss IJ, Nayak A, Jaffer S. Correlation of Oncotype DX Recurrence Score with Histomorphology and Immunohistochemistry in over 500 Patients. Int J Breast Cancer [Internet]. 2017 [cité 12 avr 2019];2017. Disponible sur: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5266836/

86. Wilson TR, Xiao Y, Spoerke JM, Fridlyand J, Koeppen H, Fuentes E, et al. Development of a robust RNA-based classifier to accurately determine ER, PR, and HER2

status in breast cancer clinical samples. Breast Cancer Res Treat. 2014;148(2):315‑25.

87. Noske A, Loibl S, Darb-Esfahani S, Roller M, Kronenwett R, Müller BM, et al. Comparison of different approaches for assessment of HER2 expression on protein and mRNA level: prediction of chemotherapy response in the neoadjuvant GeparTrio trial (NCT00544765). Breast Cancer Res Treat. févr 2011;126(1):109‑17.

88. Varga Z, Lebeau A, Bu H, Hartmann A, Penault-Llorca F, Guerini-Rocco E, et al. An international reproducibility study validating quantitative determination of ERBB2, ESR1, PGR, and MKI67 mRNA in breast cancer using MammaTyper®. Breast Cancer Res BCR. 11 mai 2017;19(1):55.

89. Du X, Li X-Q, Li L, Xu Y-Y, Feng Y-M. The detection of ESR1/PGR/ERBB2 mRNA levels by RT-QPCR: a better approach for subtyping breast cancer and predicting prognosis. Breast Cancer Res Treat. févr 2013;138(1):59‑67.

90. Akuoko CP, Armah E, Sarpong T, Quansah DY, Amankwaa I, Boateng D. Barriers to early presentation and diagnosis of breast cancer among African women living in sub-Saharan Africa. PLoS ONE [Internet]. 13 févr 2017 [cité 30 mars 2019];12(2). Disponible sur: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5305236/

91. Edge J, Buccimazza I, Cubasch H, Panieri E. The challenges of managing breast cancer in the developing world - a perspective from sub-Saharan Africa. South Afr Med J Suid-Afr Tydskr Vir Geneeskd. mai 2014;104(5):377‑9.

92. Pinsky BA, Sahoo MK, Sandlund J, Kleman M, Kulkarni M, Grufman P, et al. Analytical Performance Characteristics of the Cepheid GeneXpert Ebola Assay for the Detection of Ebola Virus. PLoS ONE [Internet]. 12 nov 2015 [cité 31 mars 2019];10(11). Disponible sur: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4643052/

93. Broadhurst MJ, Kelly JD, Miller A, Semper A, Bailey D, Groppelli E, et al. ReEBOV Antigen Rapid Test kit for point-of-care and laboratory-based testing for Ebola virus disease: a field validation study. Lancet Lond Engl. 29 août 2015;386(9996):867‑74.

SERMENT D'HIPPOCRATE

Au moment d'être admise à exercer la médecine, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité.

Mon premier souci sera de rétablir, de préserver ou de promouvoir la santé dans tous ses éléments, physiques et mentaux, individuels et sociaux.

Je respecterai toutes les personnes, leur autonomie et leur volonté, sans aucune discrimination selon leur sont affaiblies, vulnérables ou menacées dans leur intégrité ou leur dignité. Même sous la contrainte, je ne ferai pas usage de mes connaissances contre les lois de l'humanité.

J'informerai les patients des décisions envisagées, de leurs raisons et de leurs conséquences. Je ne tromperai jamais leur confiance et n'exploiterai pas le pouvoir hérité des circonstances pour forcer les consciences.

Je donnerai mes soins à l'indigent et à quiconque me les demandera. Je ne me laisserai pas influencer par la soif du gain ou la recherche de la gloire.

Admise dans l'intimité des personnes, je tairai les secrets qui me seront confiés. Reçue à l'intérieur des maisons, je respecterai les secrets des foyers et ma conduite ne servira pas à corrompre les mœurs.
Je ferai tout pour soulager les souffrances. Je ne prolongerai pas abusivement les agonies. Je ne provoquerai jamais la mort délibérément.

Je préserverai l'indépendance nécessaire à l'accomplissement de ma mission. Je n'entreprendrai rien qui dé pour assurer au mieux les services qui me seront demandés.

J'apporterai mon aide à mes confrères ainsi qu'à leurs familles dans l'adversité.

Que les hommes et mes confrères m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses ; que je sois déshonorée et méprisée si j'y manque.

Charlyne BEL

SERMENT D'HIPPOCRATE

En présence des Maitres de cette FACULTE et de mes chers CONDISCIPLES, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'Honneur et de la Probité dans l'exercice de la Médecine.

Je donnerai mes soins gratuits à l'indigent et je n'exigerai jamais un salaire au-dessus de mon travail. Admise dans l'intérieur des maisons, mes yeux ne verront pas ce qui s'y passe, ma langue taira les secrets qui me seront confiés et mon état ne servira pas à corrompre les mœurs ni à favoriser le crime.

Respectueuse et reconnaissante envers mes MAÎTRES, je rendrai à leurs enfants l'instruction que j'ai reçue de leurs pères.

Que les HOMMES m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couverte d'OPPROBRE et méprisée de mes confrères si j'y manque.

Charlyne BEL

Comparaison de l'évaluation des récepteurs hormonaux, du Ki67 et de Her2 par le kit STRAT4 (RT-qPCR) et l'immunohistochimie dans le cancer du sein.

RÉSUMÉ

Objet :
Le pronostic et le traitement du cancer du sein sont dépendants de l'évaluation de quatre biomarqueurs lors du diagnostic: les récepteurs aux œstrogènes, les récepteurs à la progestérone, Ki67 etHer2.
Le but de cette étude est de comparer les résultats obtenus par RT-qPCR aux résultats obtenus avec la méthode classique d'immunohistochimie utilisée en routine.
Les objectifs secondaires sont d'évaluer la reproductibilité interobservateurs en lecture d'immunohistochimie et d'évaluer la concordance des résultats entre une biopsie et la pièce opératoire correspondante.

Méthodes :
268 cas de cancer du sein, correspondant à 212 patientes (56 biopsies et 212 pièces opératoires) ont été inclus dans l'étude pour évaluer la concordance entre les méthodes classiques d'IHC/FISH et un dosage quantitatif effectué en temps réel par transcription inverse (RT-qPCR), dans un système clos automatisé de cartouche à usage unique, STRAT4.

Résultats :
La concordance entre les résultats obtenus par RT-qPCR et ceux obtenus par immunohistochimie est, sur pièce opératoire, de 96% pour RE, 77.5% pour RP, 68% pour Her2 et 71% pour Ki67 (passant respectivement à 92% et 88% pour Her2 et Ki67 après recherche du meilleur dCt).
La concordance entre les résultats sur biopsie et ceux de la pièce opératoire correspondante est de 90% pour les RE, 86.3% pour les RP, 98% pour Her2 et 75% pour Ki67.
La concordance interobservateur est de 98.9% pour RE, 91.9% pour RP, et de 99% pour Her2. Pour l'analyse quantitative de Ki67, le r des rangs de Spearman est de 0.802($p<0.0000001$).

Conclusion :
Les résultats des quatre biomarqueurs utilisés dans le cancer du sein obtenus par RT-qPCR à l'aide de STRAT4 sont concordants avec les résultats obtenus par immunohistochimie dans notre collection d'échantillons analysés rétrospectivement. STRAT4 peut être un moyen de fournir rapidement des résultats diagnostiques fiables pour les patientes atteintes d'un cancer du sein notamment dans des pays à faibles ressources, ne disposant pas de plateau technique performant.

MOTS-CLÉS

Cancer du sein, récepteur aux œstrogènes, récepteur à la progestérone, Her2, Ki67, immunohistochimie, RT-qPCR, concordance.