

## Anatomie Pathologique Facteurs prédictifs, apport des signatures génomiques

Dr Delphine Loussouarn  
Anatomie Pathologique, CHU Nantes  
5<sup>ème</sup> journée inter-régionale  
gynécologie et sénologie, 11 mai 2012

Patiente de 40 ans  
Carcinome canalaire infiltrant

- taille histologique : 19 mm
- pas de métastase ganglionnaire (0/6)

- grade histopronostique selon Elston et Ellis : II (infiltration sous forme de travées, différenciation = 3 ; pléiomorphisme nucléaire modéré = 2 ; quinze mitoses pour dix champs au grossissement 400 = 2)
- expression des récepteurs hormonaux : résultat POSITIF
- Pas de surexpression d'HER2 : résultat NEGATIF (1+)

Taille histologique

Envahissement ganglionnaire

Grade histologique

Emboles vasculaires

Récepteurs hormonaux

HER2

- pas d'embolie vasculaire
- composante de carcinome canalaire *in situ* (5%) centrale, d'architecture solide, de bas grade nucléaire, sans nécrose
- marges d'exérèse : non atteintes, carcinome infiltrant situé à plus de 10 mm de toutes les berges.

## Facteurs prédictifs

- **Récepteurs hormonaux** : facteurs prédictifs de réponse à l'hormonothérapie
- **HER2** : facteur prédictif de réponse au Trastuzumab et anti-HER2
- Facteurs prédictifs de réponse à la chimiothérapie : **aucun facteur validé**

## Facteurs prédictifs

- L'expression des RH et de HER2 est déterminée en pratique courante par les pathologistes
- Cette détermination obéit à des **recommandations nationales et internationales** portant sur les techniques et les règles d'interprétation

## Récepteurs hormonaux

- Analyse réalisée sur coupe en paraffine par immunohistochimie
- Refaire la technique sur la pièce opératoire si RH- sur biopsie
- Tester les métastases (variation du taux des RH entre 10 et 20% dans la littérature)

*Recommandations pour l'évaluation immunohistochemique des récepteurs hormonaux sur coupes en paraffine dans les carcinomes mammaires. Mise à jour 1999 ; Ann Pathol 1999*

*Hammond et al. ASCO/CAP Guideline Recommendations for Immunohistochemical Testing of Estrogen and Progesterone Receptors in Breast cancer. J Clin Oncol 2010*

- Absence de consensus **international** sur le seuil de positivité des récepteurs hormonaux

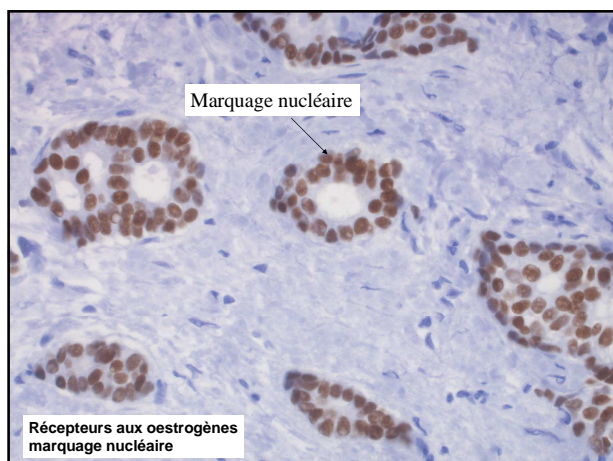
- Seuil de positivité :

En France: 10%

Aux EU: 1%

*Hammond et al. ASCO/CAP Guideline Recommendations for Immunohistochemical Testing of Estrogen and Progesterone Receptors in Breast cancer. J Clin Oncol 2010*

*Recommandations pour l'évaluation immunohistochemique des récepteurs hormonaux sur coupes en paraffine dans les carcinomes mammaires. Mise à jour 1999 ; Ann Pathol 1999*



- **Carcinome canalaire infiltrant**
- **taille histologique : 20 mm**
- **pas de métastase ganglionnaire (0/6)**

- **grade** histopronostique selon Elston et Ellis : II (infiltration sous travées, différenciation = 3 ; pléiomorphisme nucléaire modéré = 2 quinze mitoses pour dix champs au grossissement 400 = 2)

- **expression des récepteurs hormonaux : résultat POSITIF**

*Expression recherchée par immunohistochemie :*

- l'anticorps (Tebu, clone 6F11), dilution 1/100 après restauration antigénique) dirigé contre le récepteur aux oestrogènes marque avec **une intensité forte 70 % des cellules**
- l'anticorps (Novocastra, clone 16), dilution 1/100 après restauration antigénique) dirigé contre le récepteur à la progestérone marque avec **une intensité forte 50 % des cellules**.

**Résultat exprimé en positif ou négatif**  
**Le % et l'intensité du marquage doivent être précisés**



## HER2

- **Tout cancer invasif** sans restriction d'âge, de type histologique, de taille tumorale
- Utilisation de témoins calibrés à chaque série de tests
- Expertise médicale et technique (250 tests annuels pour l'IHC et 100 tests pour HIS)

*Mise à jour des recommandations du GEFPICS pour l'évaluation du statut HER2 dans les cancers du sein en France*  
 Penault-Llorca F et le groupe d'évaluation des facteurs pronostiques par immunohistochimie dans les cancers du sein (GEFPICS). *Ann Pathol* 2010; 30: 357-373.

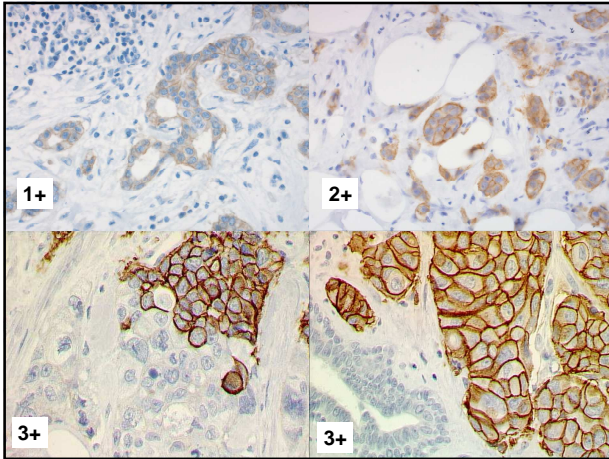
## HER2

- Trois méthodes: IHC, FISH et BrISH adaptées aux tissus formolés et inclus en paraffine
- Pas de place pour les techniques de PCR
- **Grande spécificité** : visualisation du signal dans les cellules carcinomateuses infiltrantes
- **Score** : selon les recommandations

*Mise à jour des recommandations du GEFPICS pour l'évaluation du statut HER2 dans les cancers du sein en France*  
 Penault-Llorca F et le groupe d'évaluation des facteurs pronostiques par immunohistochimie dans les cancers du sein (GEFPICS). *Ann Pathol* 2010; 30: 357-373.

Score	marquage
0	absence de marquage membranaire ou marquage membranaire faible <10%
1+	Marquage membranaire faible et incomplet >10%
2+	marquage membranaire modéré et <b>complet</b> >10% ; marquage complet et intense < 30%
3+	marquage membranaire <b>fort et complet</b> >30%

*Wolf AC et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. J Clin Oncol 2007; 25:118-45*



## Score pour l'hybridation in situ

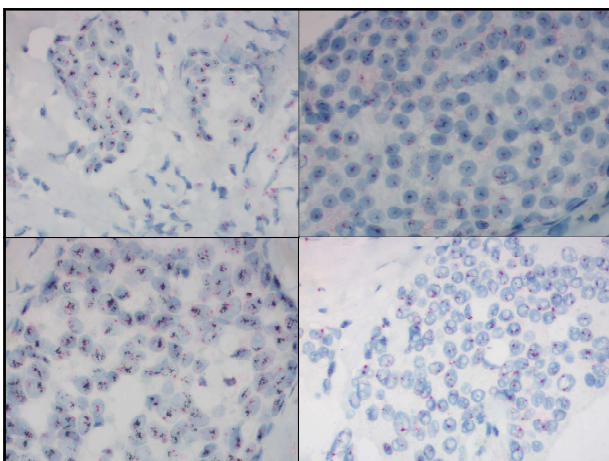
### FISH, CISH ou SISH double sonde

Amplification	ratio > 2,2 ou clusters
Absence d'amplification	ratio < 1,8
<b>Cas borderline</b>	entre 1,8 et 2,2 : recompte sur plus de noyaux. Si confirmé, amplification possible mais non assurée : <b>RCP</b>

### FISH, CISH, SISH monosonde

Amplification	> 6 signaux HER2 par noyau ou clusters
Absence d'amplification	de 1 à 4 signaux HER2 par noyau
Réponse différée	si nombre de signaux HER2 entre 4 et 6: effectuer une technique double sonde

*Wolf AC et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. J Clin Oncol 2007; 25:118-45*



**Patiente de 40 ans**

**Carcinome canalaire infiltrant**

• **taille histologique : 19 mm**

• **pas de métastase ganglionnaire (0/6)**

• **grade histopronostique selon Elston et Ellis : II** (infiltration sous forme de travées, différenciation = 3 ; pléiomorphisme nucléaire modéré = 2 ; quinze mitoses pour dix champs au grossissement 400 = 2)

• **expression des récepteurs hormonaux : résultat POSITIF**

• **pas de forte surexpression d'HER2 : résultat NÉGATIF (1+)**

*surexpression d'HER2 recherchée par immunohistochimie ; formol*

*Tamponné ; anticorps (Dako polyclonal, utilisé à la dilution 1/800<sup>e</sup>) ;*

*marquage membranaire de faible intensité et incomplet dans 30 % des cellules du carcinome infiltrant ; absence de marquage des cellules épithéliales normales ; témoin externe positif conforme.*

**Résultat exprimé en précisant le pourcentage de cellules avec marquage membranaire complet ou non et son intensité.**

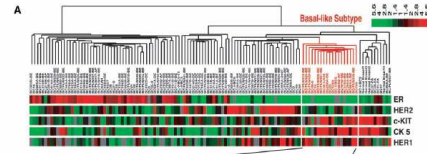
**Patiente de 40 ans**  
**Carcinome canalaire infiltrant**

- **taille histologique : 19 mm**
- **pas de métastase ganglionnaire (0/6)**

- **grade histopronostique selon Elston et Ellis : II** (infiltration sous forme de travées, différenciation = 3 ; pléiomorphisme nucléaire modéré = 2 ; quinze mitoses pour dix champs au grossissement 400 = 2)
- **expression des récepteurs hormonaux : résultat POSITIF**
- **pas de forte surexpression d'HER2 : résultat NÉGATIF (1+)**

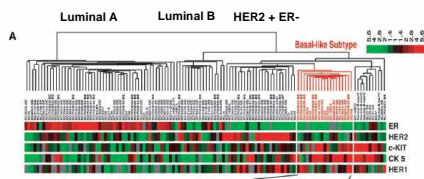
**Hormonothérapie**  
**Chimiothérapie ? Chimiosensibilité ?**  
**Apport des signatures génomiques ?**

- pas d'embolie vasculaire
- **composante de carcinome canalaire *in situ* (5%)** centrale, d'architecture solide, de bas grade nucléaire, sans nécrose
- **marges d'exérèse** : non atteintes, carcinome infiltrant situé à plus de 10 mm de toutes les berges.



▪ **La classification moléculaire intrinsèque de Sorlie et Perou a permis d'individualiser plusieurs sous-types tumoraux sur la base de profils d'expression de groupes de gènes**

▪ **Part croissante aux caractéristiques biologiques de chaque sous-type tumoral au delà du type histologique, du grade et de l'extension**



**4 sous-classes moléculaires luminale A, luminale B, HER2 + et « basal-like » au pronostic différent**  
**Amélioration du profil prédictif des tumeurs par cette classification ?**

Annals of Oncology Advance Access published June 27, 2011

special article

Annals of Oncology  
 doi:10.1093/annonc/mdr304

**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**

A. Goldhirsch<sup>1,\*</sup>, W. C. Wood<sup>2</sup>, A. S. Coates<sup>3</sup>, R. D. Gelber<sup>4</sup>, B. Thürlimann<sup>5</sup>, H.-J. Senn<sup>6</sup> & Panel members<sup>7</sup>

<sup>1</sup>International Breast Cancer Study Group, Department of Medicine, European Institute of Oncology, Milan, Italy; <sup>2</sup>Department of Surgery, Emory University School of Medicine, N. E. Atlanta, USA; <sup>3</sup>International Breast Cancer Study Group and University of Sydney, Sydney, Australia; <sup>4</sup>International Breast Cancer Study Group Statistical Center, Department of Biostatistics and Computational Biology, Dana-Farber Cancer Institute, Harvard Medical School, Boston, USA; <sup>5</sup>Breast Center, Kantonsspital St Gallen, St Gallen; <sup>6</sup>Tumor and Breast Center Zolliwil, St Gallen, Switzerland

Received 21 April 2011; accepted 23 May 2011

**Consensus de St Gallen 2011 : prise en charge thérapeutique basée sur les sous-types moléculaires**

**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**

A. Goldhirsch<sup>1</sup>\*, W. C. Wood<sup>2</sup>, A. S. Coates<sup>3</sup>, R. D. Gelber<sup>4</sup>, B. Thürlimann<sup>5</sup>, H.-J. Senn<sup>6</sup> & Panel members<sup>†</sup>

International Breast Cancer Study Group, Department of Medicine, European Institute of Oncology, Milan, Italy; <sup>†</sup>Department of Surgery, Emory University School of Medicine, N. E. Atlanta, USA; <sup>2</sup>International Breast Cancer Study Group and University of Sydney, Sydney, Australia; <sup>3</sup>International Breast Cancer Study Group, Statistical Center, Department of Biostatistics and Computational Biology, Dana-Farber Cancer Institute, Harvard Medical School, Boston, USA; <sup>4</sup>Breast Center, Kantonsspital St Gallen, St Gallen; <sup>5</sup>Tumor and Breast Center ZHUF, St Gallen, Switzerland

Received 21 April 2011; accepted 23 May 2011

**Sous-types moléculaires :  
détermination en pratique courante par l'expression des RH,  
HER2 et Ki67 en immunohistochimie**

## Tumeur HER2 +

- Le type HER2 + est défini comme un carcinome HER2 3+ ou HIS + et ER-
- Conséquences thérapeutiques : CT + T
- pT1b : Herceptin<sup>1</sup>
- Le TTT des pT1aN0 doit être discuté au cas par cas en RCP

<sup>1</sup>- Carlson et al. *J Natl Compr Can Netw* 2009

## Tumeurs « basal-like »

- Les carcinomes « basal-like » sont définis comme un carcinome triple négatif avec une expression de CK5/6 et/ou EGFR en IHC<sup>1</sup>
- le plus souvent de grade III
- Conséquences thérapeutiques : CT après avoir éliminé un sous-type histologique rare ; importance de la morphologie +++

<sup>1</sup>- Nielsen et al. *Clin Cancer Res* 2004

## Tumeurs « basal-like » : groupe hétérogène

- Les carcinomes médullaires<sup>1</sup>
- Les carcinomes métaplasiques<sup>2</sup>
- **Des sous-types rares** : les carcinomes adénoïdes kystiques et les carcinomes sécrétants juvéniles avec un pronostic favorable ; traitement locorégional uniquement<sup>3</sup>

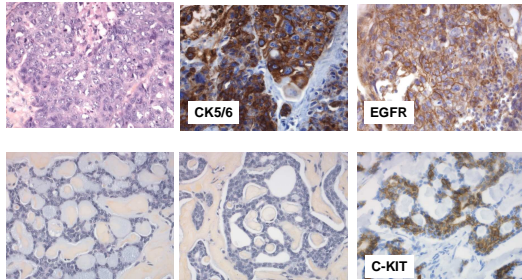
<sup>1</sup>- Vincent-Salomon et al. *Breast Cancer Res* 2009

<sup>2</sup>- Weigelt et al. *Cancer Res Treat* 2009

<sup>3</sup>- Azoulay et al. *Mod Pathol* 2005, Lae et al. *Mod Pathol* 2009



### Tumeurs « basal-like » : plusieurs tumeurs au pronostic et à la prise en charge différents

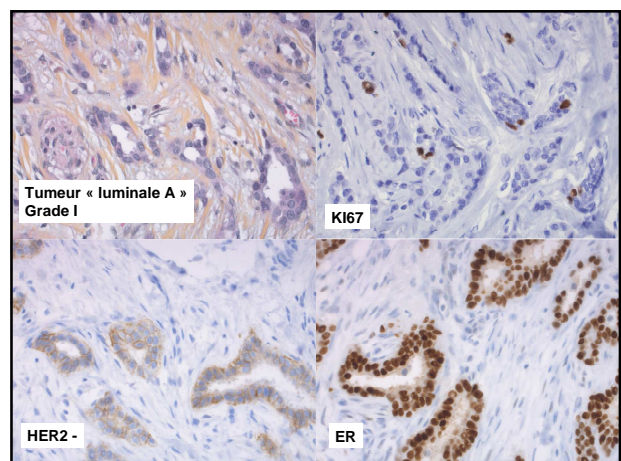


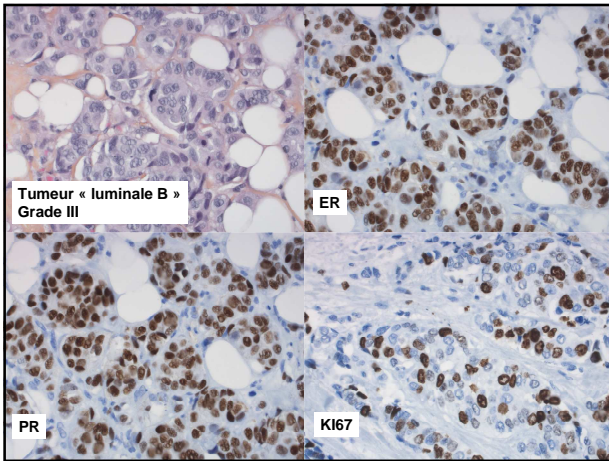
## Tumeur luminale A

- Le type **luminal A** est défini comme un carcinome exprimant ER, avec un index de prolifération faible (*KI67* < 14% *St Gallen 2011*)
- Grade I ou II
- Conséquences thérapeutiques (*St Gallen 2011*) :
  - Hormonothérapie seule**
  - Chimiothérapie > 3N+**

## Tumeur luminale B

- Le **type luminal B** est défini comme un carcinome exprimant ER, avec un fort index de prolifération
- de **grade II ou III**
- Deux sous-groupes **HER2 +** et **HER2 -**
- Conséquences thérapeutiques pour les tumeurs **luminales B HER2 -** (*St Gallen 2011*) :  
*+/- chimiothérapie ; mais absence de consensus*





## Index de prolifération KI67

- Marqueur des cellules en cycle (sauf G0)
- Marqueur corrélé avec l'index mitotique donc le grade histologique

## Intérêt clinique

- Permet de différencier les tumeurs ER+ HER2 - luminales A et B (*traitement St Gallen 2011*)
- Permet de préciser le pronostic des grades II qui sont problématiques dans la reproductibilité diagnostique et le traitement

## Avantages

- Immunohistochimie sur coupes en paraffine
- Utilisable en routine dans les services d'Anatomie Pathologique
- Peu onéreux
- Visualisation directe du marquage dans les cellules carcinomateuses infiltrantes



## Limites

- Absence de standardisation des techniques d'immunohistochimie
- Absence de standardisation de la lecture par le pathologiste

## Limites

- **Absence de consensus sur le seuil**
- Le seuil varie suivant les études entre 10% <sup>1</sup> 14% <sup>2</sup> 20%
- Le seuil de 14% est préconisé par la conférence de consensus de St Gallen
- En France, le seuil de 20% est le plus fréquemment utilisé en pratique courante

<sup>1</sup>- Aleskandarany et al. *Breast Cancer Res Treat* 2011

<sup>2</sup>- Cheang et al. *J Natl Cancer Inst* 2009

DOI: 10.1093/ajcp/293  
Advance Access publication on September 29, 2011.

© The Author 2011. Published by Oxford University Press. All rights reserved.  
For Permissions, please e-mail: journals.permissions@oup.com.

### COMMENTARY

#### **Assessment of Ki67 in Breast Cancer: Recommendations from the International Ki67 in Breast Cancer Working Group**

Mitch Dowsett, Torsten O. Nielsen, Roger A'Hern, John Bartlett, R. Charles Coombes, Jack Cuzick, Matthew Ellis, N. Lynn Henry, Judith C. Hugh, Tracy Lively, Lisa McShane, Soon Paik, Frederique Penault-Llorca, Ljudmila Prudkin, Meredith Regan, Janine Salter, Christos Sotiriou, Ian E. Smith, Giuseppe Viale, Jo Anne Żujewski, Daniel F. Hayes

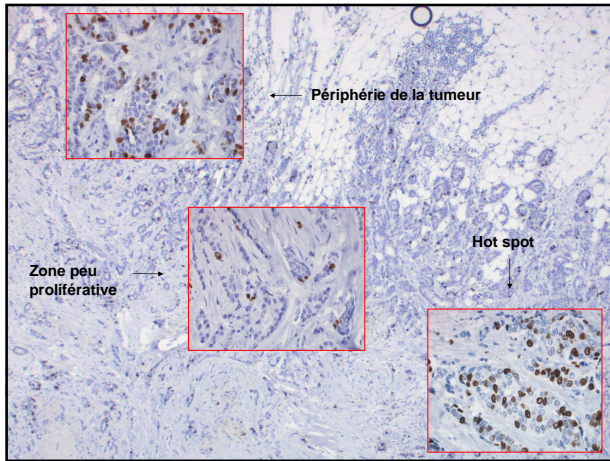
Manuscript received March 14, 2011; revised September 1, 2011; accepted September 2, 2011.

**Correspondence to:** Mitch Dowsett, BSc, PhD, Department of Biochemistry, Royal Marsden Hospital and Breakthrough Breast Cancer Centre, Fulham Rd, London SW3 6JJ, UK (e-mail: mitch.dowsett@icr.ac.uk).

#### **Recommandations pour l'évaluation du Ki67 sur les étapes pré-analytiques, analytiques et sur les règles d'interprétation**

- Pré-analytique : guidelines déjà établis pour les récepteurs hormonaux <sup>1</sup>
- Anticorps monoclonal MIB1 considéré comme un « gold standard » par le groupe de travail
- Problématique de la lecture et du score

<sup>1</sup>- Hammond et al. *ASCO/CAP Guideline Recommendations for Immunohistochemical Testing of Estrogen and Progesterone Receptors in Breast cancer. J Clin Oncol* 2010



#### Recommendations for Ki67 assessment in breast cancer Dowset et al

##### Analytical

- Known positive and negative controls should be included in all batches; positive nuclei of nonmalignant cells and with mitotic figures provide evidence of the quality of an individual section.
- Antigen retrieval procedures are required. The best evidence supports the use of heat-induced retrieval most frequently by microwave processing.
- The MIB1 antibody is currently endorsed for Ki67.

##### Interpretation and scoring

- In full sections, at least three high-power (x40 objective) fields should be selected to represent the spectrum of staining seen on initial overview of the whole section.
- For the purpose of prognostic evaluation, the invasive edge of the tumor should be scored.
- If pharmacodynamic comparisons must be between core cuts and sections from the excision, assessment of the tumor should be across the whole tumor.
- If there are clear hot spots, data from these should be included in the overall score.
- Only nuclear staining is considered positive. Staining intensity is not relevant.
- Scoring should involve the counting of at least 500 malignant invasive cells (and preferably at least 1000 cells) unless a protocol clearly states reasons for fewer being acceptable.
- Image analysis methods for Ki67 remain to be proven for use in clinical practice.

##### Data handling

- The Ki67 score or index should be expressed as the percentage of positively staining cells among the total number of invasive cells in the area scored.
- Statistical analysis should take account of the log-normal distribution generally followed by Ki67 measurement.
- The most appropriate endpoint in comparative studies of treatment efficacy or response is the percentage suppression of Ki67-positive cells.
- The most appropriate endpoint for assessing residual risk of recurrence is the on-treatment proportion of Ki67-positive cells.
- Cut points for prognosis, prediction, and monitoring should only be applied if the results from local practice have

## Signatures génomiques

- Trois signatures moléculaires commercialisées
- MammaPrint
- Oncotype Dx
- MapQuant Dx ou grade génomique
- MammaPrint et OncotypeDx ont fait l'objet d'un rapport dans le cadre d'un partenariat entre INCa et la SFSPM (rapport publié sur le site de l'INCa)

## Mammaprint

- Signature génomique d' Amsterdam<sup>1</sup>
- Analyse par puce à ADN de l'expression de 70 gènes
- Stratification des patientes en faible et haut risque de récurrence
- Tissue tumoral congelé

<sup>1</sup>-Van de Vijver et al. N Engl J Med 2002

- 2008: labellisation par la FDA comme test pronostique pour des patientes âgées de moins de 61 ans dont la tumeur est < 5cm et pN0
- En cours de validation clinique dans un essai prospectif européen MINDACT ( comparaison avec Adjuvant ! Online pour sélectionner les patientes pN0 et pN+ <3 susceptibles de recevoir ou non une CT adjuvante)
- Validité pronostique: **niveau de preuve bas LOEIII** (rapport INCa 2009)

Mais :

- Informations pronostiques pour les tumeurs ER+ pN0
- 10 à 20% des tumeurs HER2 + présentent une signature MammaPrint de bon pronostic<sup>1</sup>

1- Knauer et al. Cancer Res 2009

## Oncotype DX

- Test de RT- PCR quantitative de **21 gènes** : 16 gènes associés au cancer (famille des RH, de HER2, de la prolifération, invasion) + 5 gènes de référence
- Tissu formolé et inclus en paraffine
- Patientes ER+ pN0 recevant du Tamoxifène en adjuvant
- Classification selon 3 niveaux de risque de rechute (risque faible, intermédiaire, élevé)

### Prolifération KI67

Survivin  
Cyclin B1  
MYBL2

### HER2

GRB7  
HER2

GSTM1

### Estrogen ER PGR

BCL2  
SCUBE2

### Invasion

MMP11 (stromolysin 3)  
CTSL2 (cathepsin L2)

CD68

BAG1

References  
ACTB (actin)  
GAPDH  
RPLPO  
GUS  
TFRC

## Oncotype Dx

- Signature validée par deux essais cliniques rétrospectifs
- Validité pronostique et valeur prédictive : **niveau de preuve LOEII (rapport 2009 INCa)** ; recommandé par l'ASCO
- En cours de validation clinique dans un essai prospectif nord-américain TAILORx : les patientes à « faible risque » pourraient ne pas recevoir de CT

Mais :

- Limité aux tumeurs ER+ traitées par Tamoxifène
- Pas d'études de validation contre les techniques de référence (immunohistochimie) : mieux que ER, HER2, KI67 déterminés par le pathologiste ?

## MapQuant Dx ou grade génomique

- Plus de la moitié des cancers sont de grade histologique II avec des problématiques de reproductibilité et de traitement
- Approche moléculaire de Sotiriou <sup>1</sup> basée sur des gènes de prolifération (97 gènes)

1- Sotiriou et al. J Natl cancer Inst 2006

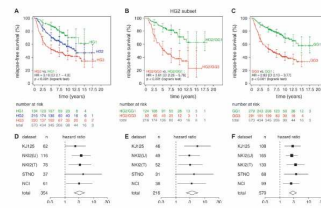


Fig. 1. Kaplan-Meier survival curves for different breast cancer subtypes. (A-C) Overall survival curves for different breast cancer subtypes. (D-F) Forest plots showing the prognostic value of the 97-gene signature compared to traditional markers (ER, HER2, Ki67) for different breast cancer subtypes.

- Sépare les tumeurs de grades II en bas et haut grade moléculaire

De nombreuses études ont montré l'intérêt du grade génomique

**Mais:**

- Persistance d'une zone intermédiaire (la ségrégation est progressive)
- Absence de données sur la comparaison GG avec les paramètres histologiques : mieux que grade histopronostique, compte mitotique et KI67 déterminés par le pathologiste?

## Conclusions- 1

- RH et HER2 déterminés par le pathologiste sont actuellement les seuls facteurs prédictifs **validés** en 2011
- Techniques avec visualisation directe du signal
- **Nécessité d'autres biomarqueurs**, en particulier pour mieux définir les indications et la réponse à la chimiothérapie

## Conclusions- 2

- KI67 est important pour :
  - l' individualisation des sous-classes moléculaires intrinsèques
  - préciser les grades II et les indications de chimiothérapie
- **Nécessité d'une standardisation de la technique et de la lecture pour une utilisation fiable en routine: recommandations du groupe de travail**

## Conclusions- 3

- Les signatures génomiques commerciales peuvent apporter des informations pronostiques **complémentaires** pour des cancers ER + HER2 - pN0 grade II
- **Mais absence** de données disponibles sur la comparaison des signatures génomiques/facteurs histologiques classiques (grade, mitoses, KI67, ER, HER2)
- ARN extraits de fragments tumoraux
- **En cours de validation** par des essais prospectifs

## Conclusions- 4

- Nécessité de **tests moléculaires prédictifs** à l'intérieur d' une population donnée
- Quelle patiente va réellement répondre et bénéficier du traitement ?
- Combinaison de paramètres évalués par des techniques d'IHC et/ou HIS, utilisables en pratique courante