

GROUPE HOSPITALIER SAINT- LOUIS – LARIBOISIERE – F. WIDAL

Contacts :

Pr P. BERTHEAU, SERVICE DE PATHOLOGIE Hôpital Saint Louis, 1 av C. Vellefaux-75475 Paris–T : 01 42 49 99 33 / F : 01 42 49 49 22
Dr J. LEHMANN-CHE, SERVICE DE BIOCHIMIE Hôpital Saint Louis, 1 av C. Vellefaux-75475 Paris–T : 01 42 49 93 85 / F : 01 42 49 92 47

**BON DE DEMANDE D'EXAMEN POUR ANALYSE DE HER2
PAR SUREXPRESSIION (IHC) OU AMPLIFICATION (Q-PCR OU SISH)**

PATIENT	<input type="checkbox"/> Monsieur	<input type="checkbox"/> Madame
Nom :	Née :	
Prénom :	Date de naissance :	

PATHOLOGISTE DEMANDEUR

NOM :

ADRESSE :

EXAMEN DEMANDE :

COCHER : IHC / / Q-PCR / / SISH / /

JUSTIFICATION DE LA DEMANDE

DATE DE LA DEMANDE :

MATERIEL TRANSMIS

FIXATEUR UTILISE :** DUREE DE FIXATION :

Diagnostic anatomo-pathologique : (ou double compte-rendu)

Référence Laboratoire : Date du prélèvement :

Nature (coupes, blocs, lames....) :

** PAS DE BOUIN

CONCERNANT LE BLOC SELECTIONNE POUR ANALYSE

% de noyaux de cellules tumorales :

% de noyaux de cellules non tumorales :

% superficie de plages acellulaires

nécrose :

fibrose :

% de composante in situ :

Pathologiste validant l'analyse morphologique :

CLINICIEN REFERENT (coordonnées précises)

Nom :

Adresse :

FICHE D'INFORMATIONS PRATIQUES

HOPITAL SAINT-LOUIS

1, AVENUE CLAUDE VELLEFAUX, 75475 PARIS CEDEX 10
STANDARD : 01 42 49 49 49 INTERNATIONAL : 33 1 42 49 49 49

SERVICE DE BIOCHIMIE (Pr H. DE THE) - CONTACT : DR J. LEHMANN-CHE - TEL ACCUEIL : 01 42 49 93 85 / FAX : 01 42 49 92 47

SERVICE DE PATHOLOGIE (Pr A. JANIN) - CONTACT : Pr P. BERTHEAU - TEL SECRETARIAT : 01 42 49 99 33 / FAX : 01 42 49 49 22

Informations pratiques concernant la recherche d'une surexpression de HER2 (par IHC) ou d'une amplification de HER-2 (par PCR ou SISH) dans les cancers du sein à l'hôpital Saint Louis

Pour quels patients :

Patients atteints de cancer du sein invasif, quel que soit le stade.

Des informations complémentaires sont disponibles sur la fiche médicale « Sein / Adénocarcinome
- HER2/surexpressions -HER2/amplifications » de l'AP-HP.

Dans quels buts :

Identifier les patients atteints de carcinome mammaire invasif éligibles pour un traitement par anticorps anti-HER2 (trastuzumab) ou inhibiteur de la kinase de HER2 (lapatinib).

Seuls les patientes/patients dont la tumeur présente une surexpression de la protéine HER2 ou une amplification du gène HER2 (ERBB2) peuvent bénéficier de ces traitements ciblés.

Sur quels prélèvements :

Tumeur primitive ou localisation métastatique fixée (préférentiellement formol, le liquide de Bouin est formellement exclu) et incluse en paraffine.

Pour l'analyse moléculaire quantitative in vitro (Q-PCR), le prélèvement doit comporter **plus de 30%** de cellules tumorales (par rapport au nombre total de cellules du prélèvement). Cette donnée chiffrée doit être indiquée dans la fiche de prescription pour une interprétation pertinente des résultats.

Où adresser sa demande :

Votre demande sera traitée à l'hôpital St Louis.

➔ Le prélèvement sera initialement réceptionné, validé et préparé par le laboratoire d'anatomie pathologique :

Référent : Pr P. Bertheau,

Laboratoire : Service d'anatomie pathologique
Hôpital Saint Louis
1 av Claude Vellefaux
75 475 Paris cedex 01
Réception : 01 42 49 41 35

→ des coupes de tissus seront analysées par immunohistochimie (si cette analyse n'a pas déjà été faite) puis si nécessaire (si IHC 2+) par SISH (hybridation in situ à l'argent) au laboratoire d'anatomie pathologique

→ si l'IHC est cotée 2+, d'autres coupes seront adressées pour analyse moléculaire quantitative au laboratoire d'oncologie moléculaire qui réalise l'extraction de l'ADN, l'analyse moléculaire et son interprétation :

Référents : Dr J. Lehmann-Che (2 9858) jacqueline.lehmann-che@sls.aphp.fr
ou Dr Hany Soliman (2 4390) hany.soliman@sls.aphp.fr

Laboratoire : Service de Biochimie
Hôpital Saint Louis
1 av Claude Vellefaux
75 475 Paris cedex 01
Réception : 01 42 49 93 85/ fax 01 42 49 92 47

Que faut-il envoyer :

→ au laboratoire d'anatomie pathologique :

- le bloc tumoral le plus riche en cellules tumorales (par rapport aux cellules totales de l'échantillon)
- le compte rendu d'anatomo pathologie correspondant au prélèvement
- le Bon de demande d'examen (téléchargeable sur le site) dûment rempli, comportant notamment les **coordonnées complètes des correspondants** pour leur assurer une bonne transmission des résultats.

→ au laboratoire d'oncologie moléculaire:

- une copie de la fiche de prescription.

Quel est le délai de rendu de l'analyse ?

A partir de la réception du prélèvement en anatomie pathologique, un délai maximum de **10 jours** est à prévoir. Le résultat est adressé aux correspondants qui seront mentionnés dans le Bon de demande d'examen. Le résultat est co-signé par les référents anatomo pathologistes et biologistes moléculaires.

En cas de situation d'urgence, la mention **URGENT** sur le Bon de demande d'examen permet de réduire le délai de rendu au maximum.

Le bloc tumoral vous sera réadressé secondairement.

Quelles techniques utilisons-nous ?

→ au service d'anatomie pathologique :

- pour l'immunohistochimie : nous appliquons le protocole décrit dans la fiche médicale « Sein / Adénocarcinome - HER2/surexpressions -HER2/amplifications » de l'AP-HP, en utilisant en priorité l'anticorps monoclonal CB11, ou si besoin l'anticorps polyclonal A0485 ou l'anticorps monoclonal 4B5.

- pour la SISH : 2 coupes sont réalisées pour étude par SISH (hybridation in situ à l'argent) avec une sonde HER2 et une sonde centromérique du chromosome 17. Nous appliquons le protocole décrit dans la fiche médicale « Sein / Adénocarcinome - HER2/surexpressions -HER2/amplifications » de l'AP-HP.

- pour la Q-PCR : une coupe colorée par l'HES permet une sélection de la zone la plus richement tumorale (la richesse tumorale pourra être augmentée par macrodissection).

- 5 coupes de 10µ sont réalisées et transmises au laboratoire d'oncologie moléculaire.

→ au service d'oncologie moléculaire :

- l'extraction de l'ADN à partir des coupes tissulaires est réalisée.

- l'analyse systématique se fait en duplicate, en **Q-PCR** sur LC480 (Roche) ou Taqman 7500 (Applied), la technique quantifie HER-2, des gènes reflétant le nombre de copies de chromosome 17 et des gènes permettant d'apprécier la diploïdie. Le résultat est rendu en ratio HER-2/chr 17 et évalue la polysomie ou la monosomie du chromosome 17. Cette technique quantitative a été évaluée, comparée aux techniques morphologiques (IHC, FISH et SISH) et validée dans le cadre d'un STIC national.

FICHE MEDICALE

Pathologie	Analyse
Sein / Adénocarcinome	HER2(ERBB2) / surexpression - <i>HER2(ERBB2)</i> / amplification

But : Accès à ou poursuite d'une thérapie ciblée

Identifier les patients atteints de carcinome mammaire invasif éligibles pour un traitement par anticorps anti-HER2 (trastuzumab pertuzumab) trastuzumab emtansine ou inhibiteur de la kinase de HER2 (lapatinib)

Seuls les patientes/patients dont la tumeur présente une surexpression de la protéine HER2 ou une amplification du gène HER2 (ERBB2) peuvent bénéficier de ces traitements ciblés.

Indications

Analyse nécessaire : pour tous les cancers du sein invasifs, quel que soit leur stade, le traitement pouvant être prescrit en situation adjuvante (Romond 2005) et métastatique (Slamon 2001)

Analyse recommandée : sans objet

Analyse exploratoire : sans objet

Recommandations générales concernant les prélèvements

ATTENTION : ces informations restent générales et le demandeur d'analyses doit se référer aux « Bon de demande et Fiche d'informations pratiques » avant d'envoyer son échantillon.

- **Nature des prélèvements tumoraux :**
 - pièce opératoire ou biopsie de la tumeur primitive
 - biopsie de métastase souhaitable dans le cas d'un traitement en phase métastatique (pour rechercher un sous-clone différent de la tumeur primitive).
- **Type du prélèvement :**
 - Bloc de paraffine avec tissu fixé au mieux en formol tamponné pendant au moins 6 h pour une biopsie et de 24 h à 48 h pour une pièce opératoire. D'autres fixateurs sont compatibles (AFA). L'envoi de lames non colorées fraîchement coupées (3-4 μ m) représentatives et stockées à température ambiante (pour l'IHC) ou au froid (4 °) (pour l'HIS) est possible pour les techniques morphologiques.
 - convient pour l'IHC, et les techniques d'hybridation *in situ* : FISH, SISH et CISH, ainsi que pour (et) les études moléculaires sur l'ADN.
 - congelé (envoi en carboglace)
 - convient pour les études moléculaires sur l'ARN
- **Analyses avant envoi :**
 - Contrôle histologique morphologique préalable avant envoi pour s'assurer de la cellularité de l'échantillon tumoral, et de la présence d'un contingent infiltrant
 - En cas d'analyses moléculaires, le pourcentage de cellules tumorales doit être spécifié dans la demande ainsi qu'une estimation du pourcentage de carcinome *in situ*, le cas échéant.

Principales techniques utilisées et validées

ATTENTION : ces informations restent générales et chaque site d'analyse peut utiliser des techniques qui lui sont spécifiques (cf Fiche d'informations pratiques).

1. **En première intention** : détection immunohistochimique de la surexpression de la protéine HER2 avec anticorps validés dans le cadre de kits approuvés par la FDA (Herceptest (Dako) avec Ac polyclonal A485 et Pathway (Ventana-Roche) avec l'Ac monoclonal 4B5, ou grâce à des techniques calibrées utilisant des anticorps disponibles hors kit dont les plus fréquents sont : A485 et 4B5, ou Ac monoclonal NCL-CB11 (Novocastra), Ac monoclonal SP3 (Microm). Interprétation effectuée sur le contingent invasif uniquement selon les recommandations de l'ASCO (Wolff remise à jour de novembre 2013) avec un résultat sous forme de score:
 - a. **Score 3+** considéré comme positif: >10% de cellules tumorales avec marquage membranaire périphérique total en cadre, d'intensité forte,
 - b. **Score 2+** considéré comme ambigu:
 - ≤10 % de cellules tumorales avec marquage membranaire périphérique total, d'intensité forte
 - > 10% de cellules tumorales avec marquage membranaire incomplet et/ou d'intensité faible/ modéré,
 - c. **Score 1+** considéré comme négatif : marquage membranaire incomplet d'intensité faible dans plus de 10 % des cellules,
 - d. **Score 0** considéré comme négatif: aucun marquage ou marquage membranaire incomplet d'intensité faible dans ≤10 % des cellules.
2. **En cas de résultat ambigu** de l'IHC (score 2+), le statut HER2 doit être vérifié par une seconde technique sur le même prélèvement, en règle générale l'HIS ou par IHC ou HIS si un autre prélèvement est disponible (Wolff 2013) :
 - a. La technique d'hybridation *in situ* évalue l'amplification du gène HER2 au mieux par technique double sonde en comparaison du centromère du chromosome 17. La FISH est une hybridation *in situ* fluorescente, la CISH est une hybridation *in situ* chromogénique et la SISH est une hybridation *in situ* métallographique (silver) (Papouchado 2010). Interprétation effectuée sur le contingent invasif uniquement en comptant au moins 20 cellules mais en balayant l'ensemble de la lame à la recherche d'une hétérogénéité et en effectuant une moyenne du nombre de spots observés sur des noyaux non superposés. Résultats donnés selon les recommandations de l'ASCO (Wolff 2013) :
 - i. **cas amplifié** si :
 1. sonde HER2 seule : nombre moyen de copies HER2 ≥ 6 /cell
 2. sondes doubles : sonde HER2 et centromérique sur chr 17
 - a. ratio HER2/CEP17 ≥ 2 et nombre moyen de copies HER2 ≥ 4 /cell ou <4/cell
 - b. ratio HER2/CEP17 <2 mais nombre moyen de copies HER2 ≥ 6 /cellule sur au moins 20 cellules comptées
 - ii. **cas non amplifié** :
 1. sonde HER2 seule : nombre moyen de copies HER2 <4/cell
 2. sondes doubles : sonde HER2 et centromérique sur chr 17
 - a. ratio HER2/CEP17 <2 et nombre moyen de copies HER2 ≥ 4 /cell mais <6/cellule

iii. **cas demeurant équivoque :**

1. sonde HER2 seule : nombre moyen de copies HER2 ≥ 4 et $< 6/\text{cell}$
2. sondes doubles : sonde HER2 et centromérique sur chr 17
ratio HER2/CEP17 < 2 et nombre moyen de copies HER2 $< 4/\text{cell}$

iv. Ces cas doivent faire l'objet d'une estimation sur un nombre supérieur de cellules ou sur une lame différente, en comparaison avec la morphologie. Si le cas reste équivoque, la décision de traiter peut être prise en RCP.

v. Dans de rares cas (epithélioma glandulaire, carcinomes micropapillaires) avec une IHC 1+ (coloration intense mais incomplète (basolatérale ou en forme de U) et qui comportent une amplification de HER2. L'ACP doit réclamer le test réflexe. (cf supra).

Expertise recommandée du centre : 250 cas/an pour l'évaluation immunohistochimique, 100 cas /an pour l'évaluation par hybridation in situ avec procédure d'assurance qualité.

- b. Dans certains centres, la technique complémentaire peut être une technique moléculaire par PCR quantitative à la recherche d'une amplification du gène HER2 (Q-PCR) (Bergqvist 2007 ; Jacquemier 2013) ou d'une surexpression du transcrit du gène HER2 (Q-RT-PCR) (Barberis 2008).

Délai moyen de rendu de résultat

7-14 jours

Informations complémentaires

Contexte scientifique :

Le gène HER2 (ERBB2) est situé sur le bras long du chromosome 17 (17q12-21) et code pour un récepteur membranaire de la famille du récepteur de l'EGF ayant une activité tyrosine kinase lorsqu'il se dimérise. Il active alors des cascades de phosphorylations intracellulaires, induisant la prolifération, la survie, et la mobilité cellulaire et stimulant l'angiogénèse. La protéine HER2 (ERBB2) est surexprimée dans 15 à 20% des cancers du sein, presque toujours en raison d'une amplification du gène HER2 (multiplication du nombre de copies de ce gène). La corrélation entre la surexpression de HER2(ERBB2) au niveau membranaire et l'amplification au niveau génomique est excellente. La qualité de la détermination du statut HER2(ERBB2) est donc essentielle pour la bonne prise en charge des patients ayant un cancer du sein.

Références (sur les indications et les techniques)

1. Barberis M et al
Quantitative PCR and HER2 testing in breast cancer: a technical and cost-effectiveness analysis.
Am J Clin Pathol. 2008 Apr;129(4):563-70.
2. Bergqvist J, et al
Quantitative real-time PCR analysis and microarray-based RNA expression of HER2 in relation to outcome.
Ann Oncol. 2007 May; 18(5):845-50.
3. Jacquemier J, et al
SISH/CISH or qPCR as alternative techniques to FISH for determination of HER2 amplification status on breast tumors core needle biopsies: a multicenter experience based on 840 cases.
BMC Cancer. 2013 Jul 22;13:351

4. Papouchado BG et al.
Silver in situ hybridization (SISH) for determination of HER2 gene status in breast carcinoma: comparison with FISH and assessment of interobserver reproducibility.
Am J Surg Pathol. 2010 ;34(6):767-76.
5. Romond EH et al
Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer.
N Engl J Med. 2005; 20;353(16):1673-84.
6. Slamon DJ et al
Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2.
Division of Hematology and Oncology, UCLA School of Medicine, Los Angeles, Calif 90095-1678, USA. dslamon@mednet.ucla.edu
N Engl J Med. 2001; 15;344(11):783-92.
7. Wolff 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(1):118-45.
8. Wolff AC 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. 2013 Nov 1;31(31):3997-4013
9. Yarden Y
Biology of HER2 and its importance in breast cancer
Oncology 2001, 61 Suppl 2:1-13

Auteurs	
• Rédacteurs V2 : P. Bertheau, J. Lehmann-Che, M. Marty	le 28/5/2014
• Relecteurs : M. Antoine, C. Copie, C. Guettier	le 30/05/2014
• Validation Comité de Coordination	le 02/06/2014