

Direction de l'évaluation des technologies et
des modes d'intervention en santé (DETMIS)

Centre hospitalier de l'Université de Montréal

**HYBRIDATION *IN SITU* ARGENTIQUE
(DUAL-COLOR SISH) DANS LA DÉTECTION
DE L'AMPLIFICATION GÉNIQUE DE HER2
DANS LES CANCERS GASTRIQUES
À UN STADE AVANCÉ**

Préparé par

Raouf Hassen-Khodja

Luigi Lepanto

Novembre 2012



Le contenu de cette publication a été rédigé et édité par la Direction de l'évaluation des technologies et des modes d'intervention en santé (DETMIS) du Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM). Ce document est également offert en format PDF sur le site Web du CHUM.

Auteurs : Raouf Hassen-Khodja, M.D., M. Sc.
Luigi Lepanto, MD, MSc, FRCP (C)

Révision linguistique : Johanne Piché

Pour se renseigner sur cette publication ou sur toute autre activité de la DETMIS, s'adresser à :

Direction de l'évaluation des technologies et des modes d'intervention en santé
Centre hospitalier de l'Université de Montréal
190, boul. René-Lévesque Est, porte 210
Montréal (Québec) H2X 3A7
Téléphone : (514) 890-8000, poste 36132
Télécopieur : (514) 412-7460
Courriel : detmis.chum@ssss.gouv.qc.ca

Comment citer ce document :

«Direction de l'évaluation des technologies et des modes d'intervention en santé (DETMIS). Centre hospitalier de l'Université de Montréal. Hybridation *in situ* argentique (Dual-color SISH) dans la détection de l'amplification génique de HER2 dans les cancers gastriques avancés. Préparé par Raouf Hassen-Khodja et Luigi Lepanto. Novembre 2012. »

La reproduction totale ou partielle de ce document est autorisée à condition que la source soit mentionnée.

MISSION

La Direction de l'évaluation des technologies et des modes d'intervention en santé (DETMIS) a vu le jour au CHUM en 2005 dans une unité conjointe avec celle du CUSM et fonctionne de façon autonome depuis 2008. La DETMIS a pour mission de conseiller les décideurs du CHUM dans leurs choix de technologie et de modes d'intervention en santé, en basant sa méthodologie sur les données probantes, les pratiques les plus efficaces dans le domaine de la santé et l'état des connaissances actuelles.

En outre, en conformité avec la mission du Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM), la DETMIS travaille activement à former des professionnels en évaluation des technologies et des modes d'intervention en santé, ainsi qu'à diffuser les connaissances acquises au cours de ses évaluations, tant au sein de la communauté du CHUM qu'à l'extérieur, contribuant ainsi à l'implantation d'une culture d'évaluation et d'innovation.

Le premier mandat de la DETMIS est de produire une évaluation objective des données probantes concernant l'efficacité, la sécurité et les coûts d'une technologie ou d'un mode d'intervention afin de permettre aux gestionnaires de décider de leur adoption ou de leur utilisation au CHUM, en tenant compte des priorités et des ressources disponibles.

REMERCIEMENTS

La Direction de l'évaluation des technologies et des modes d'intervention en santé désire remercier les lecteurs suivants pour leurs précieux commentaires sur ce rapport :

Geneviève Soucy, M.D., FRCPC, FCAP, FASCP
Département d'anatomo-pathologie

Myriam Giguère
Direction des services hospitaliers du CHUM

André Lacroix, M.D.
Direction des affaires internationales

François Lespérance, M.D.
Direction des affaires médicales et académiques

Divulgence de conflits d'intérêts

Aucun conflit à signaler

SOMMAIRE EXÉCUTIF

Les résultats récents qui confirment l'efficacité de certains régimes spécifiques de chimiothérapie chez les patients atteints d'un cancer gastrique métastatique avec surexpression de HER2 exigent la mise en œuvre d'une stratégie diagnostique rapide et efficace.

Certains types de cancers gastriques, associés à une surexpression des récepteurs HER2, répondent plus efficacement à la chimiothérapie lorsqu'elle était associée au trastuzumab. Après la mise au point de la technique d'hybridation *in situ* par fluorescence qui a permis une détection efficace de l'amplification du gène HER2, l'apport des tests d'HIS chromogéniques et leurs avantages ouvrent de nouvelles perspectives dans le diagnostic des cancers gastriques. La technique FISH est considérée comme une méthode sensible et précise, voire le «gold standard» pour l'évaluation du statut de HER2. La technique SISH fait partie des techniques d'hybridation *in situ* que l'on regroupe sous l'acronyme BriSH (Bright HIS), ou l'utilisation de l'argent comme révélateur chromogène confère au signal une coloration noirâtre, importante et précise. Le taux de concordance entre ces 2 techniques (FISH et SISH) varie de 94 % à 98 %.

L'intérêt de la Dual-color SISH est de mettre en évidence le gène HER2 et le centromère du chromosome 17 tout en conservant les caractéristiques histomorphologiques de la préparation. La localisation de la tumeur et l'interprétation des signaux sont beaucoup plus faciles et plus rapides avec la procédure automatisée de la SISH. En outre, l'automatisation de cette technique bicolore (Dual color SISH ou dc-SISH) et l'utilisation d'un logiciel spécifique permettent d'effectuer des dosages de HER2 et de CEP 17 sur les lames et, lorsque le nombre minimum de cellules sélectionnées est atteint, de calculer le rapport HER2/CEP 17.

Dans le contexte d'un diagnostic fiable et rapide lié à la détection de l'amplification du gène HER2 dans les cas de cancer gastrique à un stade avancé, les données actuellement disponibles plaident en faveur de l'utilisation d'une technique d'hybridation *in situ* chromogénique (microscope à fond clair). La technique Dual-color SISH et en particulier l'automatisation de cette procédure comporte un intérêt certain pour les laboratoires de pathologies ; cependant, les évaluations comparatives et économiques restent encore limitées. La DÉTMIS suggère qu'un registre soit maintenu afin d'obtenir des données permettant de compléter une évaluation économique. Vu le nombre limité de patients concernés par cette technologie, la centralisation de ce test dans un laboratoire spécialisé est souhaitable. Le CHUM pourrait se positionner pour devenir un centre de référence.

GLOSSAIRE

Amplicon : Séquence nucléotidique spécifique, encadrée d'amorces à ses deux extrémités, qui est le produit résultant d'un processus d'amplification génique.

HER2 : est une protéine transmembranaire qui forme des homodimères ou hétérodimères avec les autres récepteurs de la famille des EGF (facteur de croissance épithélial - Epithelial Growth Factors).

HER2/neu ou erb-B2 : Proto-oncogène situé sur le bras long du chromosome 17 (chr 17q21). Il code pour un récepteur protéinique transmembranaire appartenant à la famille des facteurs de croissance épidermiques ou EGFR (famille des récepteurs à activité tyrosine-kinase).

Microscope confocal : Microscope à fluorescence dont le faisceau lumineux est généré par un laser. Les signaux transmis sont captés et numérisés. Cette technique permet de localiser précisément le marquage et d'en quantifier l'intensité.

Microscope électronique : Microscope qui permet d'obtenir des agrandissements très importants (jusqu'à 200 000 fois) à partir de coupes ultrafines (moins de 100 nm) effectuées sur des prélèvements inclus en résine et d'en étudier les organites cellulaires. Cette technique peut être couplée à des techniques d'immunohistochimie.

Microscope à fluorescence : Microscope photonique muni de deux sources de lumières et de filtres et de miroirs dichroïques permettant de visualiser la fluorescence émise par les marqueurs fluorescents introduits dans un échantillon.

ToGA (étude) : Étude de phase III randomisée évaluant l'efficacité d'Herceptin chez des patients atteints d'un cancer gastrique ou d'un cancer de la jonction gastro-œsophagienne dit HER2-positif, qualifié d'inopérable à un stade avancé, de récurrent ou de métastatique

Trastuzumab (Herceptin) : Anticorps recombinant monoclonal dirigé contre la protéine HER2.

ABRÉVIATIONS ET ACRONYMES

Ac :	Anticorps
AMM :	Autorisation de mise sur le marché
ASCO :	American Society of Clinical Oncology
BCSS :	Breast Cancer Scoring System
BriSH :	Bright in Situ Hybridization
CAP :	College of American Pathologists
CEP 17 :	Chromosome 17 centromere
CHUM :	Centre hospitalier de l'Université de Montréal
CISH :	Chromogenic In Situ Hybridization
DETMIS :	Direction de l'évaluation des technologies et des modes d'intervention en santé
DMA :	Double Chromosome Amplification
EGFR :	Epidermic Growth Factor Receptor (récepteur de facteur de croissance épidermique)
ELISA :	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (essai par immunoadsorbant lié à une enzyme)
EMA :	European Medicines Agency
FDA:	Food and Drug Administration
GCSS :	Gastric Cancer Scoring System
IHC :	Immunohistochimie
JOG :	Jonction gastro-oesophagienne
HIS :	Hybridation in situ
SISH :	Silver in situ Hybridization
MO :	Microscope optique
PCR :	Polymerase Chain Reaction
PRINS :	Primed in situ hybridization

TABLE DES MATIÈRES

MISSION.....	3
REMERCIEMENTS.....	4
SOMMAIRE EXÉCUTIF.....	5
GLOSSAIRE.....	6
ABRÉVIATIONS ET ACRONYMES.....	7
TABLE DES MATIÈRES.....	8
1 INTRODUCTION.....	9
2 CONTEXTE D'ÉTUDE : DONNÉES ÉPIDÉMIOLOGIQUES ET RAPPEL PHYSIO-PATHOLOGIQUE.....	10
2.1 Données épidémiologiques.....	10
2.2 Rappel physiopathologique : Anomalies structurelles et génétiques.....	10
3 TECHNIQUES D'HYBRIDATION IN SITU.....	12
3.1 Technique Fish.....	12
3.2 Technique CISH.....	12
3.3 SISH.....	13
4 MÉTHODOLOGIE.....	16
4.1 Critères de sélection.....	16
4.2 Stratégie de recherche.....	16
4.3 Résultats de la recherche.....	17
5 RÉSULTATS DES ÉTUDES.....	18
6 DISCUSSION GÉNÉRALE.....	27
7 CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS.....	29
7.1 Recommandations.....	29
BIBLIOGRAPHIE.....	30
ANNEXE A - TABLEAUX DESCRIPTIFS DES ÉTUDES.....	36
ANNEXE B - BREF DESCRIPTIF DE L'ÉTUDE TOGA.....	44

1 INTRODUCTION

L'évaluation des technologies et la recherche continue de nouvelles stratégies entrent dans le cadre d'une prise en charge optimale des malades. Celle-ci nécessite une vigilance et une mise à jour régulière du choix des techniques diagnostiques afin d'utiliser les technologies les plus appropriées.

Le cancer gastrique est le quatrième cancer le plus fréquent dans le monde. La Société canadienne du cancer et l'Institut national du cancer du Canada estiment que 770 nouveaux cas de cancer gastrique ont été diagnostiqués au Québec en 2011 (2 900 cas au Canada), et que plus de 500 décès ont été enregistrés. Chez les patients atteints d'un cancer gastrique, la survie observée après 10 ans se situe entre 15 et 20 %.

Sa localisation, son évolution, le plus souvent asymptomatique, et son pronostic nécessitent des tests diagnostiques rapides et fiables. Le traitement des cancers a connu une évolution importante avec la mise au point d'anticorps monoclonaux (Herceptin). Cependant, le pronostic clinique et l'efficacité de ces traitements dépendent en grande partie des caractéristiques histochimiques et géniques de la tumeur maligne ainsi que de la sensibilité et de la spécificité des tests diagnostiques visant à mettre en évidence ces caractéristiques. L'hybridation *in situ* fait partie des méthodes qui ont l'avantage de permettre la visualisation directe d'un signal spécifique au niveau cellulaire.

Depuis l'apport de la biothérapie, l'utilisation de cette technologie permet, dans de nombreux cas (évaluation du statut, amplifié ou non, de l'HER2 par exemple), d'offrir un traitement spécifique ciblé aux patients atteints d'un cancer gastrique à un stade avancé, selon les résultats des tests effectués. En effet, après la publication des données sur l'efficacité du trastuzumab dans les cas de cancer du sein caractérisés par une amplification du gène HER2, les résultats de l'étude ToGa¹ ont montré que certains types de cancers gastriques, associés à une surexpression des récepteurs HER2 détectée, répondaient plus efficacement à la chimiothérapie lorsqu'elle était associée au trastuzumab.

Après la mise au point de la technique d'hybridation *in situ* par fluorescence qui a permis une détection efficace de l'amplification du gène HER2, l'apport des tests d'ISH chromogéniques et leurs avantages (utilisation de microscope à fond clair, possibilité de double coloration, standardisation par l'automatisation de la technique et visualisation parallèle de la morphologie de l'échantillon testé) semblent ouvrir de nouvelles perspectives dans le diagnostic des cancers gastriques.

C'est dans ce cadre que le département de pathologie de l'Hôpital Saint-Luc a confié à la DÉTMIS à la mission de procéder à l'évaluation de la technique d'hybridation *in situ* argentique de type Dual color SISH dans la détection du gène HER2 dans le diagnostic du cancer gastrique métastatique.

¹ Étude de l'effet du trastuzumab dans le cancer gastrique métastatique

2 CONTEXTE D'ÉTUDE : DONNÉES ÉPIDÉMIOLOGIQUES ET RAPPEL PHYSIOPATHOLOGIQUE

2.1 Données épidémiologiques

Le cancer gastrique figure parmi les cancers les plus fréquents. Plus d'un million de nouveaux cas sont détectés par an pour lesquels la survie globale médiane inférieure à un an et plus est de 800 000 décès par an dans le monde. Au Québec, l'incidence est d'environ 800 nouveaux cas par an, avec une légère prédominance chez l'homme (490 cas²).

Le diagnostic de la maladie est souvent tardif et difficile à poser en raison d'une symptomatologie pauvre ou non spécifique. La majorité des cancers gastriques se situent au niveau de l'antrum gastrique et sont de type adénocarcinome. Le pronostic de la maladie dépend de nombreux facteurs dont la localisation ainsi que le stade de la maladie défini par l'extension tumorale locale et la présence de métastases ganglionnaires ou de métastases à distance. Le traitement du cancer gastrique associe en règle générale la chirurgie à la chimiothérapie.

À partir des différents résultats d'études sur le cancer du sein, la détermination de l'expression des protéines membranaires et le statut génomique d'HER2 sont actuellement reconnus comme des éléments importants dans la prédiction du traitement associant le trastuzumab (type répondant ou non répondant)³. En effet, depuis l'apparition de la biothérapie et des résultats prometteurs de l'étude ToGa indiquant une survie supérieure à un an pour les malades atteints d'un cancer gastrique métastatique avec surexpression d'HER2 (test positif), un pronostic plus optimiste peut être envisagé. À la lumière de ces résultats, le cancer de l'estomac HER2-positif est devenu une nouvelle indication pour les anticorps monoclonaux utilisés en biothérapie et dirigés contre HER2.

2.2 Rappel physiopathologique : Anomalies structurelles et génétiques

Dans de nombreux carcinomes (cancer du sein, cancer gastrique, etc.), on observe une surexpression du récepteur d'un facteur de croissance épidermique⁴ (*Human epidermal growth factor receptor 2*). Ce récepteur est une glycoprotéine membranaire constituée de 1 255 acides aminés appartenant à la famille des récepteurs à activité tyrosine-kinase. Ce récepteur est codé par un proto-oncogène HER2 situé sur le bras long du chromosome 17 (Ch. 17q21). Les mutations de ce récepteur HER2 dans les cellules non somatiques sont associées à plusieurs formes de cancer et, en particulier, à ceux du sein et de l'estomac.

Cette surexpression protéique ou l'amplification génique de HER2 a été détectée dans 4 % à 28 % des cancers gastriques ou de la jonction gastro-œsophagienne (JOG). La plupart des études ont montré que les cancers gastriques surexprimant HER2 étaient de plus mauvais pronostic.

Méthodes de détection de la surexpression protéique et/ou l'amplification de HER2

Pour notre évaluation, seules les techniques FISH, CISH et SISH seront prises en considération. Les caractéristiques des différentes de détection de la surexpression de HER2 sont résumées au tableau 1.

² Statistiques canadiennes sur le cancer 2011. Les auteurs mentionnent la sous-estimation des cas de certains cancers pour les années ayant servi à produire les estimations de 2011

³ Direction québécoise du cancer, Détection du marqueur Her2 dans le cadre du traitement du cancer gastrique et du cancer de la jonction gastro-œsophagienne, novembre 2011

⁴ Facteur de croissance épidermique découvert par Stanley Cohen de l'Université Vanderbilt avec Rita Levi-Montalcini.

- L'immunohistochimie (IHC) est une technique semi-quantitative qui consiste à révéler par coloration la protéine surexprimée à la surface des cellules. Elle permet d'évaluer le niveau d'expression du récepteur HER2 (score de l'IHC en annexes). C'est une technique de visualisation directe de l'antigène cellulaire par un anticorps spécifique le plus souvent marqué par une réaction enzymatique colorée. Cette technique autorise une analyse de la structure morphologique qui reste conservée. Elle est de réalisation simple et peu coûteuse. Le score standardisé d'IHC utilisé dans les cas de cancer gastrique est différent de celui recommandé dans les cas de cancer du sein, compte tenu de l'hétérogénéité du marquage de HER2 et du marquage incomplet en forme de U retrouvés dans les cancers gastriques. Les tumeurs IHC2+ doivent être testées par HIS [Thompson et coll., 2010].
- La technique d'hybridation *in situ* (HIS) détecte une amplification génique. C'est une méthode indirecte de détection de la cible. Son principe repose sur l'hybridation de l'ADN tumorale avec une sonde fluorescente (*Fluorescent hybridation in situ ou FISH*) ou liée à un chromogène reconnaissant un segment d'ADN spécifique et étudiée en utilisant un microscope à fond clair (*Bright Hybridation in Situ ou BriHS ; Chromogenic hybridation in situ ou CISH et, Silver hybridation in situ ou SISH*). La complexité de la procédure varie en fonction de la technique utilisée. [Fiche et coll., 2001]

D'autres méthodes permettent de doser des antigènes spécifiques tissulaires ou sériques à l'aide d'anticorps monoclonaux : la méthode ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*), une technique approuvée par la *Food and Drug Administrations (FDA)* pour les cancers du sein métastatiques, et la PRINS (*Primed in situ labelling or hybridization ou synthèse in situ amorcée*), une technique basée sur le principe de la PCR (réaction en chaîne de la polymérase) qui utilise des amorces oligonucléotidiques spécifiques des domaines centromériques d'ADN répétitifs de chaque chromosome. [Koch et coll., 2009; Tharapel et coll., 2006]

HER2 et sensibilité au traitement au trastuzumab

La mise en évidence de l'amplification du gène HER2 par HIS dans les adénocarcinomes gastriques ou de la JOG a été rapportée par de nombreux auteurs. Le pourcentage de positivité varie de 8 % à 27 % pour la FISH et de 12 % à 17 % pour la CISH. [Barros-Silva et coll., 2009; Bouché et coll., 2010; Kim et coll., 2007; Marx et coll., 2009 ; Yano et coll., 2006]

En outre, les résultats d'études rapportés depuis 2000 confirment l'impact négatif de la présence d'une surexpression de 'HER2 sur le pronostic vital chez les patients atteints d'un cancer gastrique. [Gravalos et coll., 2008; Park et coll., 2006; Tanner et coll., 2000; Yan et coll., 2010; Zhang et coll., 2010] Toutefois, dans de rares études comme celle de Grabsch et ses collaborateurs, les auteurs concluent que l'expression de HER2 n'est pas liée au pronostic du cancer gastrique du patient et que seul un type histologique (intestinal) peut potentiellement répondre au ciblage thérapeutique de HER2 par le trastuzumab. Toutefois, les auteurs admettent que l'importante hétérogénéité de l'expression de HER2 dans les cancers gastriques serait à l'origine de résultats faussement négatifs [Grabsh et coll., 2010].

3 TECHNIQUES D'HYBRIDATION *IN SITU*

Contrairement à l'IHC, l'hybridation *in situ* est une technique de détection indirecte qui vise les acides nucléiques. Son principe repose sur la propriété qu'a la structure en double hélice de l'ADN à se scinder en brins monocaténaux lorsqu'elle est soumise à certaines conditions et à se reformer une fois replacée dans des conditions physiologiques. L'intérêt de la HIS est de pouvoir détecter et de localiser des séquences d'acides nucléiques spécifiques dans des coupes histologiques et des préparations cellulaires ou chromosomiques en utilisant une sonde fluorescente (technique FISH) ou un chromogène (techniques CISH, SISH).

La technique d'hybridation *in situ* est réservée à des centres spécialisés, car l'interprétation des signaux nucléaires d'une hybridation est longue et demande une expertise ; des variations dans les techniques d'analyse ou d'interprétation peuvent être à l'origine de divergences de résultats.

3.1 Technique Fish

Dans le cas d'hybridation *in situ* par fluorescence (technique FISH), une sonde associée à une molécule fluorescente est appariée à une séquence complémentaire. Le marquage de la sonde se fait soit directement par des fluorochromes ou par l'incorporation de nucléotides marqués. La détection et la localisation de la sonde se font par visualisation directe de nucléotides fluorescents ou par immunofluorescence indirecte à l'aide d'anticorps conjugués à des fluorochromes dirigés contre la biotine ou la digoxigénine.

Cette technique est utilisée sur des préparations tissulaires, cellulaires ou chromosomiques. La révélation est effectuée au moyen d'un microscope à fluorescence. Lors de cette procédure, plusieurs sondes avec des fluorophores différents peuvent être utilisées et détectées simultanément. Certains tests utilisent une sonde HER2 seule, alors que d'autres incluent la sonde centromérique du chromosome 17. Cette dernière a l'avantage de permettre l'évaluation des éventuelles variations du nombre de chromosomes comme dans le cas de polysomies. La technique FISH est considérée comme une méthode sensible et précise, voire le «gold standard» pour l'évaluation du statut de HER2 [Wolf et coll., 2007]. Toutefois, l'interprétation des résultats nécessite une bonne expérience de la technique : la présence de signaux non spécifiques (autofluorescence, fixation de sondes de manière non spécifiques) peut interférer dans l'interprétation des résultats.

Parmi les inconvénients qui sont associés à cette technique figure la difficulté d'évaluer les caractéristiques morphologiques d'une préparation et de la perte progressive de la fluorescence. L'utilisation de la numérisation des images et de logiciels spéciaux a permis d'améliorer la lecture et l'archivage des données. L'inconvénient de cette procédure réside dans la disponibilité d'un microscope à fluorescence et donc du coût de la technique (près de dix fois le coût d'une IHC).

Concordance entre la FISH et l'IHC

La surexpression de HER2 détectée par IHC est fortement corrélée à l'amplification du gène détectée par la technique FISH ; les résultats d'études rapportent jusqu'à 98 % de concordance [Couturier et coll., 2000]. Chez les 3 280 prélèvements soumis aux deux tests dans le cadre de l'étude ToGa, le taux de concordance entre les techniques IHC et FISH a été de 87,2 %. Il faut noter que l'hétérogénéité des cancers gastriques a conduit à utiliser un système d'évaluation (score) différent de celui utilisé dans les cas de cancer du sein.

3.2 Technique CISH

L'intérêt de la technique d'hybridation *in situ* chromogénique (CISH) réside dans l'utilisation de précipités chromogènes (comme pour l'IHC) et, contrairement à la technique FISH, leur visualisation en microscopie optique à fond clair. C'est une méthode spécifique, sensible et facilement applicable pour la détection de l'amplification du gène HER2. Il s'agit d'une technique de détection reconnue et agréée dans le diagnostic et la classification du carcinome mammaire (HER2 positif). En effet, après la première étude sur la technique CISH effectuée par Tanner et ses collaborateurs [Tanner et coll., 2000], de nombreuses autres études ont souligné

la concordance des résultats entre les techniques FISH et CISH qui varient de 85 % à 100 %. [Dandachi et coll., 2002; Gong et coll., 2005 ; Gupta et coll., 2003; Hauser-Kronberger et coll., 2004; Kumamoto et coll., 2001; Zhao et coll., 2002].

Dans une étude qui a évalué un prototype (DAKO) permettant l'application d'un type de CISH particulier (double coloration) sur une gamme de copies de gènes dont HER2/CEN-17, les auteurs ont rapporté une concordance de 100 % entre les deux techniques d'HIS [Hoff et coll., 2002].

En résumé, la technique CISH offre certains avantages sur l'IHC et la technique FISH :

- La préparation pour le test est plus facile et plus rapide pour la CISH, comparativement à la FISH ; [Wolf et coll., 2007
- La possibilité de compter le nombre de copies du gène ;
- Le temps nécessaire au dosage par la CISH plus court que pour la FISH [Bhargava et coll., 2005] ;
- La conservation des caractéristiques histopathologiques des tissus ;
- La persistance du signal dans le temps et la possibilité d'archiver les échantillons pendant une longue période ;
- L'utilisation d'un matériel moins coûteux : le coût global du test est inférieur à celui de la technique FISH [Cayre et coll., 2007].

Toutefois, il faut souligner que certains éléments dont l'hétérogénéité et la coloration de la préparation tissulaire ou cellulaire peuvent être à l'origine de difficultés diagnostiques [Gong et coll., 2009].

3.3 SISH

Tout comme la technique CISH, la technique SISH fait partie des techniques d'hybridation *in situ* que l'on regroupe sous l'acronyme BrISH (Bright HIS), ou l'utilisation de l'argent comme révélateur chromogène confère au signal une coloration noirâtre, importante et précise.

La SISH est plus rapide à réaliser que la FISH et ne nécessite qu'un microscope optique classique ce qui la rend particulièrement adaptée à une utilisation courante dans les laboratoires de pathologie. La technique automatisée pour détecter les signaux chromogènes permet d'améliorer l'efficacité, de diminuer les risques d'erreurs dus à la manipulation et de permettre l'analyse d'un plus grand nombre de tests. Cette technique est déjà utilisée dans la détection et la détermination du statut du gène HER2 dans le cancer du sein. Cette technique semble être aussi efficace que la FISH avec une concordance supérieure à 96 % Capizzi et coll., 2008; Dandashi et coll., 2002; Papouchado et coll., 2010; Powell et coll., 2007].

L'intérêt de la *Dual-color SISH* est de mettre en évidence le gène HER2 et le centromère du chromosome 17 tout en conservant les caractéristiques histomorphologiques de la préparation. La localisation de la tumeur et l'interprétation des signaux sont beaucoup plus faciles et plus rapides avec la procédure automatisée de la SISH [Tubbs et coll. 2007. En outre, l'automatisation de cette technique bicolore (*Dual color SISH* ou *dc-SISH*) et l'utilisation d'un logiciel spécifique permettent d'effectuer des dosages de HER2 et de CEP 17 sur les lames et, lorsque le nombre minimum de cellules sélectionnées est atteint, de calculer le rapport HER2/CEP 17 [Powell et coll., 2010].

La rapidité de réponse peut permettre le dépistage rapide chez des milliers des patients afin de déterminer la valeur prédictive au-delà de laquelle un bénéfice clinique peut être attendu chez les patients porteurs de cancer gastrique et candidats à la biothérapie. Cependant, une interprétation adéquate des résultats de la technique repose sur une formation appropriée des praticiens [Barlett et coll., 2009; Carbone et coll., 2008 ; Dietel et coll., 2007; Francis et coll., 2009; Garcia Caballero et coll., 2009 ; Mayr et coll., 2009; Nitta et coll., 2008; Papouchado et coll., 2010; Pedersen et coll., 2009; Sousha et coll., 2009; Yoo et coll., 2010].

Contrairement à l'IHC ou l'évaluation de la surexpression de HER2 varie selon le type de cancer (cancer gastrique ou cancer du sein), les recommandations pour la détermination du statut génique de HER2 par la SISH sont similaires pour les deux types de cancers.

Selon les recommandations de l'ASCO [Wolf et coll., 2007] :

- Amplification : présence de > 6 copies de HER2 par noyau (en l'absence de sonde centromérique du chromosome 17) ou un rapport nombre de copies HER2 /CEP 17 (sonde centromérique sur chromosome 17) > 2,2.
- Absence d'amplification : présence de < 4 copies de HER2 par noyau ou un rapport HER2 / CEP 17 < 1,8.
- Test équivoque : présence de copies de gène HER2 > 4 mais < 6 ou rapport HER2/CEP 17 > 1,8, mais < 2,2.

Concordance de SISH avec la FISH

Un certain nombre de résultats d'études comparant la SISH à la FISH quant à la détection du statut génique de HER2 dans le cancer du sein ont montré des taux de concordance qui étaient de 94 % à 98 % [13;59], des résultats considérés comme conformes par l'ASCO / CAP (plus 95 % de concordance : amplifié /non amplifié). En outre, Wolff et ses collaborateurs ont rapporté des taux de concordance interobservateur élevés (92,8 % - 95,2 %), démontrant que la SISH est une technique relativement facile à interpréter et tout aussi fiable que la FISH [Wolf et coll., 2007].

Après l'utilisation des techniques d'hybridation *in situ* dans le cas de la sensibilité des cancers du sein au trastuzumab, celles-ci ont été utilisées dans une étude multicentrique regroupant des patients ayant un cancer gastrique ou un cancer de la jonction gastro-œsophagienne HER2 positif à un stade avancé (récurrent, métastatique ou inopérable). Cette étude (étude ToGa, voir l'annexe) a permis, à partir des résultats de 3 280 patients, de mettre en évidence une concordance de 87,2 % entre les techniques IHC et FISH. Cette valeur a été obtenue après une modification du score d'évaluation de HER2 utilisé pour le cancer du sein en raison d'une plus grande hétérogénéité et de la complexité histologique des tumeurs gastriques. Pour l'interprétation, il est important de repérer les zones tumorales et de réaliser le comptage des signaux. Comme les tumeurs gastriques peuvent être très hétérogènes, il convient d'évaluer la totalité de la préparation. Pour ces deux raisons, dans le cas d'un cancer gastrique, les techniques d'HIS avec sondes non fluorescentes semblent les plus adaptées à la pratique de routine. Lorsque le ratio (nombre de copies HER2 /CEP 17) est compris entre 1,8 et 2,2, il est suggéré de compter plus de noyaux (au moins 20 de plus) dans d'autres zones tumorales et/ou sur d'autres coupes.

En outre, une étude de cohorte, incluant des patients de l'étude ToGA, a montré une excellente concordance entre la SISH et la FISH, de l'ordre de 95,3 % (241/253) [Vladish et coll., 2007]. Selon les auteurs de cette étude, la SISH permet de repérer plus aisément les zones amplifiées dans les tumeurs hétérogènes comme c'est le cas dans les cancers gastriques. Depuis la modification de l'AMM effectuée en août 2010, la SISH a été intégrée dans les tests HER2 pour le cancer gastrique⁵.

⁵ http://www.ema.europa.eu/docs/fr_FR/document_library/EPAR__Product_Information/human/000278/WC500074922.pdf

Tableau 1. Caractéristiques des différentes techniques de détection de la surexpression de HER2 [5]

	IHC	FISH	CISH	SISH
Coût	Bas	+++	+	++
Durée de la technique	2 - 3 heures	10 - 16 heures	10 - 16 heures	6 à 12 heures
Microscope	MO à fond clair 20 - 40 x	Fluo 60 - 100 x	MO à fond clair 40 x	MO à fond clair
Formation	+	+++	++	+
Préservation de la morphologie	Bonne	Limitée	Bonne	Bonne
Contrôle interne	Non	Oui	Oui	Oui
Cible		Gène	Gène	Gène
Influence de l'hétérogénéité sur les résultats	Non	Oui	Non	Non
Détection de séquences uniques intragéniques		Bonne détection	Bonne détection	Bonne détection
Maintien de l'intégrité structurale des chromosomes		Très bonne	Très bonne	Très bonne
Rapport signal/bruit de fond		Dépendant de l'échantillon et de la spécificité de la sonde	Bon	Bon
Combinaison avec d'autres techniques d'IHC		Possible		
Automatisation		Disponible	Oui	Oui
Archivage		Par numérisation	Oui	Oui

4 MÉTHODOLOGIE

4.1 Critères de sélection

La recherche documentaire a porté sur l'examen des différentes études publiées sur les techniques d'hybridation *in situ* et de Dual-color SISH, particulièrement celles utilisées dans le diagnostic du cancer gastrique métastatique pour la détection de l'amplification du gène HER2.

Notre recherche bibliographique a englobé l'ensemble des publications (rapports d'agences d'ÉTMIS, études, lignes directrices et autres données) traitant du sujet. En outre, nous avons inclus dans nos références un certain nombre de publications utiles pour la compréhension des différents tests diagnostiques utilisés en anatomopathologie dans la détection du statut d'un gène.

La rareté des études a nécessité d'inclure toutes les études se rapportant à l'utilisation de la Dual-color SISH pour la détection de l'amplification du gène HER2 dans les cas de cancer gastrique.

4.2 Stratégie de recherche

Moyens

- Moteurs de recherche Internet usuels ;
- Sites Internet des agences d'évaluation ;
- Medline ;
- Autres : CINAHL, Cochrane Library, Embase, Trials, en cours.

Langues

- Anglais ;
- Français ;
- Résumés anglais d'études publiées dans d'autres langues.

Mots-clés utilisés

Les mots-clés utilisés dans les banques de données PubMed, Cochrane et Internet pour la recension des publications sont :

- HER2
- Amplification
- 1 et 2
- Gastric cancer
- Gastric adenocarcinoma
- 1 et 4 ou 5
- Hybridization *in situ*
- FISH ou Fluorescence in situ hybridization
- CISH ou Chromogenic in situ hybridization
- SISH ou Silver in situ hybridization
- 4 ou 5 et 10

- 6 et 10
- 8 ou 9 ou 10 et sensitivity
- 8 ou 9 ou 10 et specificity
- Comparative Study ou étude comparative
- 8 ou 9 ou 10 et 15
- 1 et 4 ou 5 et 15

4.3 Résultats de la recherche

Depuis l'étude ToGa sur l'efficacité du trastuzumab dans le traitement des cancers gastriques présentant une surexpression du récepteur membranaire HER2, on note un intérêt accru pour cette technologie. Cependant, l'utilisation et l'acceptation relativement récente de la technique utilisée pour la détection de l'amplification du gène HER2 dans le cas de cancer gastrique métastatique est à l'origine du nombre limité d'études disponibles. En effet, seulement sept études publiées entre 2009 et 2012 (Boers et ses collaborateurs 2011 ; Garcia-Garcia et ses collaborateurs, 2011 ; Lee et ses collaborateurs, 2011 ; Park et ses collaborateurs, 2011 ; Fox et ses collaborateurs, 2012 ; Fassan et ses collaborateurs, 2012 et Gómez-Martin et ses collaborateurs, 2012) et une présentation de Hsieh et ses collaborateurs (2012 non encore publiée) effectuée lors de la 100e conférence de l'USCAP⁶ ont été répertoriées

⁶ United States and Canadian Academy of Pathology

5 RÉSULTATS DES ÉTUDES

L'étude rétrospective de Boers et ses collaborateurs visait à comparer la surexpression de HER2 membranaire par immunohistochimie à l'aide de différents types d'anticorps (polyclonal⁷ et monoclonal⁸) d'une part et à évaluer d'autre part, la concordance des résultats de l'étude de l'amplification de HER2 génique par deux techniques d'hybridation *in situ* : FISH et SISH (SISH à une seule sonde par lame) [Boers et coll., 2011].

Les résultats de l'étude des 146 cas examinés montrent une bonne concordance entre IHC (SP3 et 4B5) et les deux méthodes d'HIS : 22 cas étaient amplifiés avec la SISH dont 6 étaient négatifs (score = 0 ; 1+) : cinq avec SP3 et un avec 4B5. Sur les 42 cas pour lesquels la technique FISH a été effectuée, les résultats étaient similaires à ceux obtenus par SISH : 22 cas ont été amplifiés.

En outre, les auteurs rapportent une plus grande corrélation entre l'IHC effectuée avec l'anticorps 4B5 et l'HIS. Toutefois, certains inconvénients de coloration sont soulignés avec le 4B5 (voir tableau descriptif). Les auteurs ajoutent que l'hétérogénéité des résultats à l'immunohistochimie et les zones de réactivité sont étroitement corrélées à l'amplification de HER2.

Les auteurs soulignent que seuls les scores 1+ et 2+ obtenus avec SP3 et un score de 3+ avec 4B5 ou 2+ avec une coloration de plus de 50 % de la tumeur peuvent être prédictifs d'une positivité lors de l'hybridation *in situ*. Ils notent que l'évaluation du signal de HER2/Chr 17 dans les biopsies multiples a été beaucoup plus rapide et plus facile avec la SISH qu'avec l'hybridation *in situ* par fluorescence. Les auteurs concluent que la technique SISH est facile d'utilisation et efficace dans la détection de l'amplification génique de HER2 dans les cellules tumorales gastriques.

Dans l'étude rapportée par Garcia et ses collaborateurs, les prélèvements de 166 adénocarcinomes gastriques obtenus à partir de différentes institutions espagnols ont été examinés [Garcia et ses collaborateurs, 2011]. Cinquante échantillons (30,1 %) provenaient des biopsies endoscopiques et 116 (69,9 %) de résections chirurgicales dont 15 (9 %) provenaient de métastases. Les tests ont été effectués dans deux laboratoires différents et des résultats pour le test FISH ont été obtenus pour seulement 61 % des échantillons. Vingt-neuf des 166 prélèvements étudiés étaient amplifiés au moyen de la technique FISH (17,5 %), alors que 35 cas sur 166 ont été positifs avec la Dual-color SISH. Les six cas discordants étaient dc-SISH positif et FISH négatif (sensibilité de 1, spécificité de 0,956, concordance de 0,964, kappa = 0,884). Après relecture des lames utilisées pour la technique FISH, les auteurs notent que cette discordance était due à la présence d'une polysomie : l'amplification par la technique PCR *en temps réel* a confirmé la négativité du prélèvement.

Dans ce groupe, la valeur du rapport HER/CEP 17 se situait entre 2,06 et 2,50. Les auteurs indiquent que l'augmentation du seuil (*cutoff*) d'amplification à une valeur égale ou supérieure à 3 (≥ 3) permettait d'établir une parfaite concordance des tests (sensibilité de 1, spécificité de 1, concordance de 1, kappa = 1). Pour tous les autres cas concordants avec la dc-SISH, le rapport était > 3 .

Lors de cette étude, les résultats ont montré que l'amplification de HER2 était plus fréquente dans les cancers gastriques de type intestinal que dans les autres types histologiques⁹ (86 % versus 14 %, $p < 0,0001$) et que l'hétérogénéité tumorale est retrouvée dans plus de la moitié des échantillons (52 %).

En résumé, les auteurs relèvent l'excellente concordance entre les techniques et l'absence de faux négatifs à l'aide de la technique Dual-color SISH et soulignent que les quelques résultats discordants avec la FISH étaient causés par la présence d'une polysomie. Les auteurs ajoutent que cet inconvénient peut être évité en élevant le seuil de positivité pour l'amplification (≥ 3) et qu'il est important d'avoir un consensus définissant le cadre technique et d'interprétation.

⁷ Hercep Test

⁸ Pathway

⁹ Classification de Lauren

L'étude de Lee et ses collaborateurs publiée en 2011 avait comme objectif d'évaluer le statut des récepteurs membranaires (HER2) et l'hétérogénéité cellulaire dans les carcinomes et les dysplasies gastriques [Lee et coll., 2011]. L'étude immunohistochimique a été effectuée sur 178 prélèvements à l'aide de l'anticorps CERB2 (Dako) et analysée sur un équipement standard de type Ventana XT. Le score de la surexpression de HER2 est basé sur les critères établis par Hoffman et ses collaborateurs [Hoffman et ses coll., 2008]. Pour leur étude, les auteurs concluent à l'hétérogénéité de HER2 (pour les prélèvements de gastrectomie) si < 66 % de la tumeur présente des clones HER2-positifs.

L'étude de l'amplification génique a été effectuée par Dual-color SISH (System automatisé Ventana INFORM HER2) sur les seuls cas ayant eu un score de 1+ à l'IHC. Au final, la SISH a été réalisée sur 61 biopsies et 36 prélèvements de gastrectomie. En appliquant les lignes directrices de l'*European Medicines Agency (EMA)*, une positivité des tests dc-SISH a été observée dans 20,2 % des carcinomes et 12,9 % de dysplasies de haut grade alors qu'une hétérogénéité de HER2 a été rapportée dans respectivement 50 % et 33 % de ces cas.

Les auteurs ont noté une concordance élevée entre IHC et dc-SISH : sur les 97 prélèvements étudiés (biopsies et résections chirurgicales), 77 cas sur 80 étaient concordants (47/49 IHC- et 30/31 IHC+ (96,2 %) et seulement 6 des 17 tests classés équivoques (IHC2+) montraient une amplification de HER2 (35,3 %).

Des résultats de l'IHC faussement négatifs ont été rapportés dans 19,4 % des cas avec HER2 amplifié au moyen de la dc-SISH (voir le tableau descriptif des études). Les auteurs concluent que leurs résultats et ceux déjà publiés par d'autres auteurs étaient similaires et que les résultats obtenus par la technique dc-SISH présentaient une grande concordance avec la technique d'IHC.

Ils concluent que le HER2 et sa surexpression est assez spécifique pour être considérée comme un biomarqueur potentiel dans le diagnostic de la dysplasie.

Un des premiers objectifs de l'étude de Park et ses collaborateurs était la comparaison des systèmes de notation en IHC (BCSS et GCSS) utilisés pour l'évaluation de l'expression de HER2 [44]. En effet, depuis l'étude ToGa, un système de notation propre au cancer gastrique est suggéré. Dans l'étude rétrospective de Park et ses collaborateurs, le statut de HER2 a été évalué dans 1 091 cas en utilisant deux échantillons différents prélevés sur chaque cas. Des anticorps polyclonaux (HercepTest) et des anticorps monoclonaux (Pathway) ont été utilisés pour l'IHC. L'amplification génique a été évaluée par une technique de dual-color SISH automatisée et corrélée avec les résultats obtenus avec la FISH dans 590 cas. Les résultats ont montré une concordance élevée de l'IHC pour les deux types d'anticorps ($\kappa = 0,785$). Une corrélation élevée a aussi été observée dans le cas de l'amplification génique obtenue par la Dual-color SISH et la FISH ($\kappa = 0,918$).

En considérant le Dual-color SISH comme étant la norme, la comparaison de la sensibilité et de la spécificité de l'IHC entre la grille d'évaluation selon le *Breast Cancer Scoring System (BCSS)* et celle selon le *Gastric Cancer Scoring System (GCSS)* suivant les techniques HercepTest ou Pathway a montré que la grille selon le GCSS était significativement plus sensible pour la détection de la positivité de la dc-SISH pour les deux types d'anticorps (Ac polyclonal $p = 0,003$; Ac monoclonal, $p = .001$), mais que la spécificité était plus élevée dans le cas de la grille selon le BCSS (Ac polyclonal, $p = 0,004$; Ac monoclonal, $p = 0,001$).

La comparaison de la survie globale entre les cas GCSS-positifs/BCSS-négatifs et les cas GCSS-négatifs/BCSS-négatifs, n'a montré aucune différence statistique (HercepTest, $p = 0,777$; Pathway, $p = 0,764$; les données n'ont pas été présentées).

En ce qui concerne la technique Dual-color SISH, les auteurs concluent que les résultats présentent une concordance élevée avec ceux obtenus avec la FISH. En outre, et au vu d'une plus grande sensibilité du système BCSS, les auteurs soulignent la nécessité de l'utiliser dans l'évaluation du score de l'expression de HER2 dans le cancer gastrique.

Une étude multicentrique a été menée dans neuf laboratoires (dont 1 laboratoire de référence pour la FISH et 8 laboratoires pour la CISH/SISH) sur 15 spécimens d'adénocarcinome gastrique et de la jonction gastro-œsophagienne. Des foyers de tumeur ont été sélectionnés et une analyse par *Tissue microarray (TMA)* a été

réalisée. Les lames non colorées de ce bloc de TMA ont été envoyées à différents laboratoires et les résultats de différents niveaux de corrélation interlaboratoire ont été rapportés :

- Comparaison des résultats des tests d'IHC de HER2 selon la méthode utilisée par l'étude ToGA ;
- Comparaison des résultats des tests CISH et SISH ;
- Comparaison des résultats des tests FISH (laboratoire de référence) par rapport à ceux obtenus par CISH et SISH ;
- Et entre les résultats obtenus par IHC et ISH selon la méthode utilisée par ToGA.

Pour l'IHC, Fox et ses collaborateurs rapportent une bonne concordance des résultats des tests lorsqu'on prend IHC 3+ comme positif ($\kappa = 0,76$; SE = 0,018; accord global 92 %) [Fox et coll., 2012]. En appliquant la grille d'évaluation utilisée dans l'étude ToGA, les auteurs observent une bonne, voire très bonne, corrélation entre l'IHC (lorsqu'on considère la valeur 3+ comme positif) et les tests FISH ($\kappa = 0,85$; SE = 0,030) ou les tests CISH et SISH (lors du comptage des copies d'HER2 : $\kappa = 0,83$; SE = 0,010). Cependant, l'utilisation du rapport HER2/chr 17 avec un seuil de positivité (*cutoff*) $\geq 2,0$ ou $\geq 2,2$ affaiblit cette corrélation, et une hétérogénéité statistiquement significative est observée lors de la comparaison avec la technique SISH.

La comparaison des résultats des tests CISH et SISH montre une bonne, voire une très bonne, concordance interlaboratoire quand on considère le test positif si on retrouve plus de 6 copies d'HER2 ($\kappa = 0,68$ [SE = 0,050] à $0,86$ [SE = 0,020]). Cette corrélation interlaboratoire reste inchangée (pour la CISH) ou est réduite (pour la SISH) lorsque le seuil de positivité (*cutoff*) du rapport HER2/chr 17 utilisé est $\geq 2,0$ ou $\geq 2,2$ ($\kappa = 0,59$ [SE = 0,027] à $0,70$ [SE = 0,027]).

Dans le cas de la comparaison du score obtenu par la FISH (laboratoire de référence) à ceux calculés par la CISH et la SISH, les auteurs rapportent une très bonne corrélation ($\kappa = 0,88$ [SE = 0,040] à $0,91$ [SE = 0,020]). Celle-ci est moins marquée lorsque le seuil de positivité (*cutoff*) du rapport HER2/chr 17 utilisé est de $\geq 2,0$ ou $\geq 2,2$ ($\kappa = 0,84$ [SE = 0,037] à $0,86$ [SE = 0,053]). Une hétérogénéité statistiquement significative est observée lors de la comparaison des résultats de la technique SISH avec ceux de la technique FISH (voir les résultats complets en annexes).

En résumé, Fox et ses collaborateurs soulignent que les résultats d'IHC positifs (IHC 3+) obtenus par des histopathologistes expérimentés lors de l'évaluation du statut d'HER2 dans les carcinomes gastriques, restent prédictifs de résultats positifs avec une technique d'hybridation *in situ*. En outre, la bonne corrélation interlaboratoire dans la détection du nombre de copies HER2 par un test utilisant une seule sonde suggère que la CISH/SISH représente la méthode d'IHS optimale de détermination du statut d'HER2 dans le cancer de l'estomac et le cancer de la jonction gastro-œsophagienne.

Dans l'étude rétrospective de Fassan et ses collaborateurs, deux techniques ont permis d'évaluer la surexpression ou l'amplification de HER2 : par IHC en utilisant deux différents anti-HER2 (anticorps : 4B5 et CB11) et la surexpression du gène par dc-SISH [15]. Deux cent soixante-quinze échantillons de biopsie dont 100 effectués à partir de tumeurs cancéreuses de l'estomac et 25 issus de prélèvements de muqueuses dyspeptiques utilisés pour comparaison (groupe contrôle). Le reste des prélèvements étudiés proviennent de tumeurs cancéreuses ou de muqueuses dyspeptiques œsophagiennes.

Une surexpression de HER2 (2+ et 3+) a été observée dans les néoplasies intraépithéliales et les adénocarcinomes. Les auteurs notent que cette surexpression s'accroît avec le grade de la tumeur intraépithéliale confirmant ainsi l'effet de la dysrégulation précoce de la protéine HER2 sur la transformation néoplasique des muqueuses. Les tumeurs intraépithéliales de haut grade présentent une surexpression de HER2 et une amplification de HER2 (2+ et 3+ dans 15 % à 20 % des cas). Voir les détails au tableau 2.

Les auteurs soulignent qu'il n'existe pas d'écarts statistiquement significatifs entre les différents protocoles (utilisation des anticorps : 4B5 et CB11) d'ICC (95,3 % ; $k = 0,78$; $p < 0,001$) et que l'on retrouve une bonne corrélation entre l'ICC et la dc-SISH avec 97,5 % ; $k = 0,89$; $p < 0,001$ avec l'anticorps 4B5 et 98,5 % ; $k = 0,9$; $p < 0,001$ avec CB11).

En conclusion, les résultats de l'étude de Fassan viennent confirmer le rôle de HER2 dans l'acquisition par la muqueuse gastrique du phénotype néoplasique et, compte tenu de l'hétérogénéité de l'expression de l'HER2 dans les tumeurs intraépithéliales gastriques, la dc-SISH fournirait des informations plus fiables sur le statut de HER2 dans les cellulaires gastriques ciblées par la thérapie génique.

Pour leur part Gómez-Martin et ses collaborateurs ont étudié la surexpression de la protéine HER2 et la fréquence de l'amplification du gène HER2 chez des patients atteints d'un cancer gastrique à un stade avancé non traité [Gómez-Martin et ses coll., 2012]. L'objectif principal cette étude était d'évaluer l'association des modifications phénotypiques avec les caractéristiques anatomopathologiques des patients et leur survie. Les auteurs ont étudié 148 échantillons histologiques prélevés entre janvier 2007 et décembre 2009. Ces prélèvements ont été effectués par biopsie endoscopiques (40) ou par chirurgie (108 dont 12 extra gastriques) avant que les patients n'aient subi de chimiothérapie. Voir les détails au tableau 2. Une absence de surexpression de HER2 a été notée dans 122 cas et une ICC positive (3+) a été retrouvée dans 15 cas (10,1 %). Une amplification du gène HER2 recherchée par FISH et dc-SISH a été rapportée respectivement dans 27 cas (HER2/CEP17 = 5,81 de 2,1-12,3 : IC à 95 % 4,64 à 6,98) et 32 cas (HER2/CEP17 = 6,87 de 2,1-16,7 : IC à 95 % 5,51 à 8,23). Les résultats montrent que le type histologique intestinal peut être considéré comme un facteur pronostic favorable (HR : 0,68 ; IC à 95 % 0,46 à 0,99 ; $p = 0,044$). Pour l'IHC (IHC3+ vs IHC ≤ 2 : HR : 0,47, IC à 95 % 0,24 à 0,94 ; $p = 0,032$), FISH (ratio ≥ 2 vs ratio < 2 : HR : 0,58, IC à 95 % 0,34 à 0,99 ; $p = 0,046$) et dc-SISH (ratio ≥ 2 vs ratio < 2 : HR : 0,58, IC à 95 % 0,36 à 0,93 ; $p = 0,023$).

L'analyse de la survie globale montre des différences significatives (Kaplan-Meier $p = 0,0003$) entre les quatre sous-groupes de patients stratifiés en fonction à la fois de leur type histologique (Lauren) et des résultats des tests (IHC ou FISH, ne dc-SISH). Ce résultat est confirmé par l'analyse de régression de Cox ($p = 0,0005$).

Les auteurs concluent que la mise en évidence d'une amplification du gène HER2 par HIS (FISH ou dc-SISH) est associée à un taux de survie plus élevé et que cette amplification pourrait être considérée comme une stratégie de sélection optimale pour les candidats à traiter avec des thérapies anti-HER2.

Tableau 2 : Tableau sommaire des études

AUTEUR	DEVIS	OBJECTIFS ET DESCRIPTION DU PROTOCOLE	RÉSULTATS															
Garcia-Garcia E 2011 [21]	Rétrospective	<p>Comparaison de la FISH avec la technique dual-color SISH automatisée</p> <p>166 adénocarcinomes gastriques de plusieurs centres</p> <p>50 biopsies endoscopiques (30,1 %)</p> <p>116 résections chirurgicales</p>	<p><u>FISH</u></p> <ul style="list-style-type: none"> 166 prélèvements dont 17,5 % ont été amplifiés (positifs) L'amplification est hétérogène dans 52 % des cas Le ratio médian est, suivant l'observateur, égal à 5 et à 5,25 Il existe une association statistiquement significative entre le sous-type histologique intestinal (86 % <i>versus</i> 14 %, ($p < 0,0001$)) <p><u>Dual-color SISH</u></p> <ul style="list-style-type: none"> 166 prélèvements dont 21 % ont été amplifiés (positifs) L'amplification est hétérogène dans 29 % des cas Le ratio médian est, suivant l'observateur, égal à 5,65 et à 5,75 <p><u>Corrélation entre FISH et SISH</u></p> <ul style="list-style-type: none"> Corrélation dans 96,4 % des cas Six cas positifs au dc-SISH étaient négatifs avec la FISH (sensibilité de 1, spécificité de 0,956, concordance de 0,964, $\kappa = 0,884$) Les cas discordants étaient polysomiques et ont été confirmés négatifs par amplification par PCR en temps réel Les rapports HER/CEP17 pour ce groupe sont compris entre 2,06 et 2,50 (l'utilisation d'un <i>cutoff</i> ≥ 3 permet d'obtenir une parfaite concordance (sensibilité de 1, spécificité de 1, concordance de 1, $\kappa = 1$) Tous les ratios des cas dc-SISH concordants étaient > 3 (médianes de 8,1 et 6,02) Ces résultats sont compatibles avec les études précédentes des rapports de ISH HER2 sur fond clair utilisant une seule coloration 															
Boers et coll. 2011 [6]	Rétrospective (1999-2007)	<p>178 patients consécutifs 146 adénocarcinomes</p> <p>IHC : Deux types d'anticorps 4B5 (SP3)</p> <p>FISH : sondes pour HER2 et le chromosome 17 (Chr 17) et calcul du rapport HER2/ Chr 17</p> <p>SISH : cette étude n'a pas utilisé le dual-color SISH mais plutôt un SISH à une seule sonde, sur deux lames séparées pour les sondes HER2 et Chr 17</p>	<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>Sensibilité</th> <th>Spécificité</th> <th>VPP</th> <th>VPN</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>SP3</td> <td>77,3 %</td> <td>100 %</td> <td>100 %</td> <td>96,1 %</td> </tr> <tr> <td>4B5</td> <td>95,5 %</td> <td>98,4 %</td> <td>91,3 %</td> <td>99,2 %</td> </tr> </tbody> </table> <p><u>Hétérogénéité</u> : les zones d'amplification de HER2 sont étroitement liées à l'immunoréactivité de HER2</p> <p>En dehors du score d'IHC, le pourcentage de coloration de la tumeur pour un anticorps ne permet pas de prévoir le statut de HER2. La seule généralisation qui pourrait être faite est que les cas les plus amplifiés ont un score de 2+ ou 3+ avec SP3, et 3 + (un pourcentage) ou 2 + ($> 50\%$ de la tumeur avec 4B5)</p> <p>Polysomie présente dans 28 cas (19,2 %)</p> <p>L'évaluation de la polysomie doit être effectuée afin d'exclure les faux positifs</p>		Sensibilité	Spécificité	VPP	VPN	SP3	77,3 %	100 %	100 %	96,1 %	4B5	95,5 %	98,4 %	91,3 %	99,2 %
	Sensibilité	Spécificité	VPP	VPN														
SP3	77,3 %	100 %	100 %	96,1 %														
4B5	95,5 %	98,4 %	91,3 %	99,2 %														

Tableau : Tableau sommaire des études (suite)

AUTEUR	DEVIS	OBJECTIFS ET DESCRIPTION DU PROTOCOLE	RÉSULTATS																																																																												
Lee et coll. 2011 [35]	Rétrospective (2000-2009)	<ul style="list-style-type: none"> Évaluation du statut de HER2 et de l'hétérogénéité des cancers gastriques par IHC et SISH Étude de la corrélation du statut de HER2 entre résections et biopsies de cancer gastrique Échantillons de tumeurs (JGO) archivés et traités dont le type histologique a été évalué 118 biopsies et 114 sections de gastrectomies (incluant 54 cas appariés de biopsies et de résections gastriques) Total : 178 patients 	<ul style="list-style-type: none"> Corrélation des IHC et SISH étudiées dans 97 sections de biopsie et une gastrectomie L'amplification obtenue par SISH correspond aux sections ayant montré une surexpression de HER2 à l'IHC Hétérogénéité Dans 6 cas (50 %), l'hétérogénéité de la coloration est significative L'hétérogénéité a été mise en évidence dans les cas de biopsie HER2-positif, par une réactivité HER2 non uniforme entre les fragments de tumeur Concordance entre gastrectomies et biopsies de 74,1 %. Les faux négatifs (biopsies) sont associés à des tumeurs contenant une faible proportion de clones HER2 positifs 																																																																												
Park et coll. 2011 [44]	Rétrospective 01/2000 - 04/2007	<ul style="list-style-type: none"> 1091 adénocarcinomes gastriques primaires sans chimiothérapie ou radiothérapie IHC : avec anticorps monoclonal 4B5 Échelles utilisées : Gastric Cancer Scoring System (GCSS) et le Breast Cancer Scoring System (BCSS) FISH SISH : HER2 DNA et sonde chromosome 17 (CEP17) 	<p><i>Tableau de concordance entre FISH et Dual-color SISH</i></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>FISH</th> <th colspan="2">Dual-color SISH</th> <th>Total</th> </tr> <tr> <td></td> <th>Négatif</th> <th>Positif</th> <td></td> </tr> </thead> <tbody> <tr> <th>Négatif</th> <td>513 (99)</td> <td>4 (5,7)</td> <td>517</td> </tr> <tr> <th>Positif</th> <td>5 (1)</td> <td>66 (94,3)</td> <td>71</td> </tr> <tr> <th>Total</th> <td>518</td> <td>70</td> <td>588</td> </tr> </tbody> </table> <p><i>Tableau de concordance entre IHC et Dual-color SISH</i></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="2">Dual-color SISH</th> <th colspan="4">Score IHC : Utilisation de l'échelle GCSS</th> <th rowspan="2">Total</th> </tr> <tr> <th>0</th> <th>1+</th> <th>2+</th> <th>3+</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <th>Négatif</th> <td>764 (97,2)</td> <td>121 (88,3)</td> <td>34 (66,7)</td> <td>0 (0)</td> <td>919</td> </tr> <tr> <th>Positif</th> <td>22 (2,8)^a</td> <td>16 (11,7)</td> <td>17 (33,3)</td> <td>68 (100)</td> <td>123</td> </tr> <tr> <th>Total</th> <td>786</td> <td>137</td> <td>51</td> <td>68</td> <td>1042</td> </tr> </tbody> </table> <table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="2">Dual-color SISH</th> <th colspan="4">Score IHC : Utilisation de l'échelle BCSS</th> <th rowspan="2">Total</th> </tr> <tr> <th>0</th> <th>1+</th> <th>2+</th> <th>3+</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <th>Négatif</th> <td>764 (97,2)</td> <td>147 (78,2)</td> <td>8 (32,0)</td> <td>0 (0)</td> <td>919</td> </tr> <tr> <th>Positif</th> <td>22 (2,8)</td> <td>41 (21,8)</td> <td>17 (68,0)</td> <td>43 (100)</td> <td>123</td> </tr> <tr> <th>Total</th> <td>786</td> <td>188</td> <td>25</td> <td>43</td> <td>1042</td> </tr> </tbody> </table> <p>En gras, les cas de discordances entre IHC et Dual-color SISH</p> <p>La sensibilité avec GCSS était significativement plus élevée que celle obtenue avec l'échelle BCSS pour les deux types d'anticorps (respectivement $p = 0,003$ et $p < 0,001$)</p> <p>La spécificité de BCSS était plus élevée que celle obtenue avec GCSS pour les deux anticorps ($p = 0,004$ et $p < 0,001$). Toutefois, les spécificités étaient $> 96\%$ dans les 2 systèmes de notation et pour les 2 types d'anticorps utilisés</p>	FISH	Dual-color SISH		Total		Négatif	Positif		Négatif	513 (99)	4 (5,7)	517	Positif	5 (1)	66 (94,3)	71	Total	518	70	588	Dual-color SISH	Score IHC : Utilisation de l'échelle GCSS				Total	0	1+	2+	3+	Négatif	764 (97,2)	121 (88,3)	34 (66,7)	0 (0)	919	Positif	22 (2,8)^a	16 (11,7)	17 (33,3)	68 (100)	123	Total	786	137	51	68	1042	Dual-color SISH	Score IHC : Utilisation de l'échelle BCSS				Total	0	1+	2+	3+	Négatif	764 (97,2)	147 (78,2)	8 (32,0)	0 (0)	919	Positif	22 (2,8)	41 (21,8)	17 (68,0)	43 (100)	123	Total	786	188	25	43	1042
FISH	Dual-color SISH		Total																																																																												
	Négatif	Positif																																																																													
Négatif	513 (99)	4 (5,7)	517																																																																												
Positif	5 (1)	66 (94,3)	71																																																																												
Total	518	70	588																																																																												
Dual-color SISH	Score IHC : Utilisation de l'échelle GCSS				Total																																																																										
	0	1+	2+	3+																																																																											
Négatif	764 (97,2)	121 (88,3)	34 (66,7)	0 (0)	919																																																																										
Positif	22 (2,8)^a	16 (11,7)	17 (33,3)	68 (100)	123																																																																										
Total	786	137	51	68	1042																																																																										
Dual-color SISH	Score IHC : Utilisation de l'échelle BCSS				Total																																																																										
	0	1+	2+	3+																																																																											
Négatif	764 (97,2)	147 (78,2)	8 (32,0)	0 (0)	919																																																																										
Positif	22 (2,8)	41 (21,8)	17 (68,0)	43 (100)	123																																																																										
Total	786	188	25	43	1042																																																																										

Tableau : Tableau sommaire des études (suite)

AUTEUR	DEVIS	OBJECTIFS ET DESCRIPTION DU PROTOCOLE	RÉSULTATS
Fox et coll. 2012 [16]	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Prospective ▪ Comparative ▪ Multicentrique ▪ Évaluation de la concordance interlaboratoire des tests de détection du statut de HER2 dans le cancer gastrique et le cancer de la jonction gastro-œsophagienne. (primitifs et secondaires) 	<p>Neuf (09) laboratoires de références (dont un laboratoire de référence pour la FISH)</p> <p>15 adénocarcinomes (estomac et JGO)</p> <p>Différents types d'anticorps ont été utilisés pour l'IHC : A0485 de Dako = 4 ; 4B5 de Ventana = 4 et SP3 de Pierce biotech=1</p> <p>Un second système de notation a été utilisé et comparé à celui utilisé lors de l'étude ToGA (Intensity scoring method*)</p> <p>Au total :</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ IHC évaluée par la méthode ToGA dans tous les laboratoires ▪ CISH évaluée dans tous les laboratoires ▪ SISH évaluée dans tous les laboratoires ▪ CISH et SISH combinées dans tous les laboratoires ▪ Comparaison des résultats : laboratoire de référence (LR) FISH <i>versus</i> CISH ▪ Comparaison des résultats : laboratoire de référence FISH <i>versus</i> SISH ▪ Laboratoire de référence FISH <i>versus</i> CISH et SISH combinées 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Corrélation interlaboratoire IHC HER2 selon la méthode utilisée par l'étude ToGA ($\kappa = 0,46$; SE = 0,010 ; accord global 68 %) ▪ Corrélation interlaboratoire sur le score HER2 par CISH / SISH : ($\kappa = 0,68$ [SE = 0,050] à 0,86 [SE = 0,020]). Cette corrélation interlaboratoire reste inchangée (CISH) ou réduite (SISH) lorsque le seuil de positivité (<i>cutoff</i>) du rapport HER2/chr 17 utilisé est $\geq 2,0$ ou $\geq 2,2$. ($\kappa = 0,59$ [SE = 0,027] à 0,70 [SE = 0,027]) ▪ Très bonne corrélation entre le score HER2 établi par FISH (laboratoire de référence) par rapport à ceux établis par CISH / SISH : ($\kappa = 0,88$ [SE = 0,040] à 0,91 [SE = 0,020]). Elle diminue lorsque le seuil de positivité (<i>cutoff</i>) du rapport HER2/chr 17 utilisé est $\geq 2,0$ ou $\geq 2,2$ ($\kappa = 0,84$ [SE = 0,037] à 0,86 [SE = 0,053]) ▪ Une hétérogénéité statistiquement significative est observée lors de la comparaison des SISH avec la méthode FISH ▪ Corrélation interlaboratoire entre les résultats obtenus par IHC et ISH selon la méthode utilisée par ToGA : <p>La corrélation est bonne ou très bonne lorsqu'on considère des tests positifs à l'IHC (3+) et les tests FISH ($\kappa = 0,85$; SE = 0,030) ou CISH / SISH ($\kappa = 0,83$; SE = 0,010) en utilisant le comptage des copies HER2</p> <p>L'utilisation d'un seuil de positivité (<i>cutoff</i>) du rapport HER2/chr 17 $\geq 2,0$ ou ≥ 2 affaiblit cette corrélation et une hétérogénéité statistiquement significative est observée lors de la comparaison avec la technique SISH. Ces effets sont encore plus marqués lorsqu'on considère la positivité de l'IHC à 2+/3+ (IHC et CISH / SISH [$\kappa = 0,73$; SE = 0,010] ou FISH [$\kappa = 0,78$; SE = 0,030])</p> <p>Une bonne concordance des résultats entre les 2 types d'échelle de calcul (ToGA et méthode de notation en fonction de l'intensité) quand IHC3+ est considéré comme positif ($\kappa = 0,65$; SE = 0,010). Une hétérogénéité statistiquement significative est observée</p>

* Rüschoff J, Dietel M, Baretton G, et al. HER2 diagnostics in gastric cancer-guideline validation and development of standardized immunohistochemical testing. Virchows Arch. 2010;457:299-307

Tableau 2 : Tableau sommaire des études (suite)

AUTEUR	DEVIS	OBJECTIFS ET DESCRIPTION DU PROTOCOLE	RÉSULTATS												
Gómez-Martin et coll. 2012 [22]	Évaluation comparative du statut de 'HER2 chez des patients présentant un cancer gastrique à un stade avancé. Étude rétrospective.	<p>Évaluer la fréquence de l'amplification du gène HER2 ou une surexpression sur les prélèvements histologiques provenant de patients atteints d'un cancer gastrique à un stade avancé</p> <p>Évaluer l'association de l'amplification de HER2 avec les caractéristiques cliniques des patients et leur survie</p> <p>Analyse statistique : Kaplan-Meier Cox</p>	<p><i>SUREXPRESSION DE HER2 PAR IHC :</i> Score de 0 : 122 patients avec un (82,4 %)/1+ : 5 patients (3,4 %)/2+ : 6 (4,1%)/3+ : 15 (10,1%) Cas considérés comme IHC positifs</p> <p><i>AMPLIFICATION DE HER2</i></p> <table border="0"> <tr> <td></td> <td>FISH</td> <td>dc-SISH</td> </tr> <tr> <td>Nombre de cas</td> <td>27</td> <td>32</td> </tr> <tr> <td>ratio moyen</td> <td>5,81 de 2,1 à 12.3.</td> <td>6,87 de 2,1 à 16.7</td> </tr> <tr> <td>HER2/CEP17</td> <td>(IC à 95 % 4,64 à 6,98)</td> <td>(IC à 95 % 5,51 à 8,23)</td> </tr> </table> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Pas de différence statistiquement significative de la surexpression de la protéine ou de l'amplification de HER2 selon le sexe et l'âge. Une diminution du nombre d'amplification (dc-SISH) a été obtenue chez les patients atteints de carcinome péritonéal ($p = 0,0218$) ▪ Association statistiquement significative entre un type histologique intestinal et une amplification positive (FISH ou dc-SISH) ($p < 0,0001$) ▪ Six des 34 cas amplifiés par dc-SISH ont été négatifs par la technique FISH (tous étaient IHC 0/1+). Dans les 2 cas au cours duquel une RT-PCR a pu être effectuée, l'amplification de HER2/neu a été confirmée <p><i>Survie médiane sans progression (SSP)</i> de 6,14 mois (IC à 95 % de 5,19 à 7,23 mois)</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Une différence statistiquement significative a été observée en fonction de la présence ou non d'amplification <p><i>Survie globale médiane (SG)</i> de 11,37 mois (IC à 95 % de 9,00 à 13,83 mois) pour toute la population</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ La survie globale moyenne était significativement plus longue dans le groupe de patients pour lequel une surexpression de HER2 ou une amplification est rapportée et, ce, quelle que soit la technique utilisée. <p>Survie globale médiane pour le sous-groupe de patients atteints de type intestinal GC (14,5 mois; IC à 95 % : de 12,02 à 21,16) significativement supérieur à celui observé dans le groupe présentant une tumeur autre que de type intestinale (7,36 mois, IC à 95 % de 6,24 à 10,31) (log-Rank $p = 0,0011$).</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ La présence de type histologique intestinal semble constituer un facteur pronostic favorable (vs type non intestinal : HR : 0,68; IC à 95 % 0,46 à 0,99; $p = 0,044$) <p>L'analyse de la survie globale montre des différences significatives entre les quatre sous-groupes de patients stratifiés en fonction à la fois de leur type histologique (Lauren) et les résultats des tests (IHC ou FISH, ne dc- SISH) selon le modèle Kaplan Meier ($p = 0,0003$, test log-Rank). L'analyse de régression par modèle de Cox a montré des résultats similaires ($p = 0,0005$) (figure 2)</p>		FISH	dc-SISH	Nombre de cas	27	32	ratio moyen	5,81 de 2,1 à 12.3.	6,87 de 2,1 à 16.7	HER2/CEP17	(IC à 95 % 4,64 à 6,98)	(IC à 95 % 5,51 à 8,23)
	FISH	dc-SISH													
Nombre de cas	27	32													
ratio moyen	5,81 de 2,1 à 12.3.	6,87 de 2,1 à 16.7													
HER2/CEP17	(IC à 95 % 4,64 à 6,98)	(IC à 95 % 5,51 à 8,23)													

AUTEUR	DEVIS	OBJECTIFS ET DESCRIPTION DU PROTOCOLE	RÉSULTATS
Fassan et coll. 2012 15	Étude comparative, rétrospective	<p>275 prélèvements :</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ 100 biopsies de tumeurs gastriques et 25 de muqueuse gastrique témoin ▪ 125 biopsies de l'œsophage de Barrett et 25 de muqueuse œsophagien témoin <p>IHC <i>Immunohistochimie</i></p> <p>Dans chaque cas, une IHC a été réalisée par l'application de deux anticorps 4B5 (Ac de lapin) et CB11 (Ac de lapin)</p> <p>Protocoles d'immunomarquage commerciaux, selon les recommandations des fabricants : n score de 3+ est considéré comme positif.</p> <p><i>Dc-SISH</i></p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ HER2 et la sonde énumération chromosome 17 (SCEP) ont été testés sur la même lame ▪ La coloration automatisée de référence XT plate-forme XT (Ventana Medical Systems) ▪ Le protocole standard ▪ Les résultats ont été évalués sur un système Cyres (Zeiss, Jena, Allemagne) composé d'un microscope optique classique connecté à un moniteur ▪ HER2 : résultats en simples points noirs, des copies simples du chromosome 17 du SCEP sont présentés sous forme de points rouges ▪ HER2/CEP ≥ ou quand il y avait des preuves de grappes de signaux HER2 <p>Analyse statistique</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Test de Kruskal-Wallis ▪ Le coefficient k est utilisé pour vérifier le niveau d'accord entre les résultats obtenus par les différents anticorps utilisés (4B5 en comparaison de CB11), et le statut HER2 défini par IHC ou établie SISH. Les valeurs de k, allant de 0,61 à 0,80 indiquent une bonne corrélation. La valeur de $p < 0,05$ a été considérée comme statistiquement significative ▪ L'analyse statistique a été réalisée avec le logiciel Stata (Stata Corporation, College Station, TX, USA) 	<p>IHC</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Corrélation observée. Un très bon accord a été observé dans les 275 échantillons analysés entre la coloration obtenue à l'aide de 4B5 et lors de l'utilisation de CB11 (95,3 % ; $k = 0,78$; $p < 0,001$), avec des divergences dans seulement 13/275 des cas ▪ Une surexpression de HER2 (2+ et 3+) est également retrouvée dans les 2 types de tissus gastriques et œsophagiens. Le taux de cette surexpression est augmenté de façon significative avec le degré de dédifférenciation des lésions (du bas grade au haut grade), $p < 0,001$ (Kruskal-Wallis) pour les deux anticorps <p>Amplification de HER2</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Estomac : 1 cas de tumeurs intra-épithéliales (TIE) de bas grade; 4 cas TIE de haut grade et 8 cas d'adénocarcinome ▪ Pour les tumeurs œsophagiennes, 2 cas de TIE de bas grade; 5 cas de TIE de haut grade et 7 cas d'adénocarcinome de Barrett ▪ Le taux d'amplification de HER2 a augmenté de façon significative de la tumeur de bas grade, à la tumeur de haut grade, à l'adénocarcinome. ($p < 0,001$ Kruskal-Wallis) ▪ Il y a une excellente concordance entre les résultats de dc-SISH et la surexpression (2+ et 3+) de HER2 pour les deux anticorps : 4B5 (97,8 %; $k = 0,89$, $p < 0,001$) et CB11 (98,5 %; $k = 0,91$, $p < 0,001$) <p>Tous les prélèvements 3+ (pour les 2 anticorps) présentaient une amplification HER2</p>

6 DISCUSSION GÉNÉRALE

L'évaluation de l'hybridation *in situ*, en particulier la Dual-color SISH, vise à mesurer l'efficacité de certaines stratégies diagnostiques dans le cadre de choix thérapeutique spécifique. Dans le contexte de notre étude, il faut souligner que la plupart des études ont montré que :

- Dans les cancers gastriques, les cellules tumorales présentant une surexpression de HER2 étaient associées à un moins bon pronostic
- Le trastuzumab est efficace chez des patientes atteintes d'un cancer du sein précoce ou métastatique HER2+
- Les résultats de l'étude ToGA (essai randomisé international) ont montré qu'un traitement associant le trastuzumab à la chimiothérapie (capécitabine ou au 5-FU et au cisplatine) était efficace dans le traitement du cancer gastrique exprimant une surexpression de HER2 [Bang et coll., 2010]^{10 11}
- Dans l'objectif d'atteindre des performances diagnostiques optimales dans cette maladie, l'efficacité et la disponibilité des tests sont essentielles.

Dans le cas de la mise en évidence de l'amplification et de l'expression des récepteurs membranaires, les résultats de la majorité des études montrent une corrélation importante entre les résultats de l'immunohistochimie et de l'hybridation *in situ*. Pour cette procédure, il existe différentes techniques comportant chacune des avantages et des facteurs limitant.

Toutefois, l'hétérogénéité tumorale dans les cancers gastriques (≥ 30 % des cas contre < 5 % dans les cancers du sein) [Dietel et coll., 2007 ; Gaiser et coll., 2009 ; Hoffman et coll., 2008 ; Moelans et coll., 2010, la localisation tumorale (dans l'étude ToGA, les tumeurs de la JOG ont des taux de surexpression de HER2 plus élevés que ceux des tumeurs de l'antra gastrique : 33 % vs 21 %) et le type histopathologique (la surexpression de HER2 est moins fréquente dans les tumeurs de type diffus, à cellules en bagues) [Bang et coll., 2010] sont à l'origine d'une certaine variabilité (laboratoire et examinateur) en particulier à l'immunohistochimie [Dowsett et coll., 2007 ; Rhodes et coll., 2002].

Il en est de même pour le type d'anticorps utilisé [Kumamoto et coll., 2001]. Par exemple, pour l'anticorps polyclonal de lapin AO485 (Dako), on observe une sensibilité de 91 % et une spécificité de 98 % [Nitta et coll., 2008] alors que pour l'anticorps monoclonal de souris CB11 (Ventana MS), on observe des taux respectifs de 72 % et de 100 % [Ahmed et coll., 2010]. Selon les recommandations issues des différentes études, on s'entend pour dire que les résultats IHC positifs (2+ et 3+) doivent être testés par la technique FISH ou la technique SISH et réalisés dans des laboratoires expérimentés participant à des contrôles de qualité externes [44 ; 45 Penault-Lorca et coll., 2011 ; Powell et coll., 2007].

La technique SISH est une méthode de plus en plus acceptée dans l'évaluation complémentaire à l'immunohistochimie du statut HER2 dans le cancer gastrique. Cependant, même si la majorité des études confirment la fiabilité de la SISH, avec comme preuve le pourcentage de corrélation des résultats obtenus avec ceux de la FISH (84 % à 100 %), et cela quel que soit le choix de critères utilisés (exemple : fabricants, ACS/CAP), le nombre de résultats rapportés sur la SISH reste encore limité. Les résultats d'études publiés et repris dans notre rapport montrent le potentiel certain de cette technique dans le diagnostic des cancers gastriques à un stade avancé.

¹⁰ le trastuzumab a obtenu le 19 janvier 2010 une extension de l'autorisation de mise sur le marché (AMM) en Europe dans le traitement de l'adénocarcinome métastatique de l'estomac ou de la JOG qui présentent une surexpression de HER2 chez les patients n'ayant pas été précédemment traités pour leur maladie métastatique [Bulletin du Cancer. volume 97, numéro 12, 1429-40, décembre 2010, Synthèse]

¹¹ Direction québécoise du cancer, Détection du marqueur Her2 dans le cadre du traitement du cancer gastrique et de la jonction gastro-œsophagienne, novembre 2011

La corrélation avec les tests immunohistochimiques, le développement de tests à double coloration (Dual-color) et son automatisation [Park et coll., 2006] augmentent l'intérêt de la SISH dans les tests de détection courants en laboratoire. Les quelques résultats discordants notés avec l'hybridation *in situ* fluorescente étaient en lien, le plus souvent, avec des polysomies [9]. L'élévation du *cutoff* pour l'amplification (≥ 3) permet d'atteindre une concordance de 100 % entre les techniques FISH et SISH. En outre, un rapport réalisé sur l'évaluation de l'impact d'une procédure entièrement automatisée de la SISH est arrivé à la conclusion que le comptage du chromosome 17 est la principale source de divergence entre les techniques SISH et FISH dans le cancer du sein.

La rareté de données sur les coûts ne permet pas d'établir une étude économique (coût/efficacité) sur ce type de technique. Cependant, à partir de données colligées sur les coûts estimés par test, il apparaît que le Dual-color SISH a un prix unitaire plus élevé que celui de la CISH.

Tableau : Estimation des coûts* des différents tests d'identification du statut de HER2 (récepteur et gène)

Données extraites de l'étude de Moelans et coll. 2011 [Moelans et coll., 2011]

CIBLE	TEST	CONSOMMABLES	ÉQUIPEMENT NÉCESSAIRE
Protéine	ELISA	21 US\$ / test	Lecteur ELISA
	IHC (exemple : HercepTest)	63 US\$ / lame	MO
ADN	FISH	119 - 183 US\$ / lame	Microscope à fluorescence
	CISH	41 - 98 US\$ / lame	MO
	SISH	140 US\$ / lame	MO Autostainer (Ventana)

7 CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS

Les résultats récents qui confirment l'efficacité du trastuzumab associé à la chimiothérapie chez les patients atteints d'un cancer gastrique métastatique avec surexpression de HER2 invitent les professionnels à la mise en œuvre d'une stratégie diagnostique rapide et efficace. Elle devrait être fondée évidemment sur les données du cancer gastrique tout en prenant en considération l'expérience de l'utilisation de ces techniques et les connaissances acquises lors de l'évaluation du statut HER2 dans le cancer du sein.

L'hybridation *in situ* est un élément essentiel dans la démarche diagnostique et dans la détection de la surexpression et de l'amplification de HER2 dans le cancer gastrique. Il est cependant important de noter l'effet des techniques d'interprétation des tests et en particulier de l'utilisation des systèmes de notation appropriés (GCSS). Malgré les résultats d'études limitées, l'hybridation *in situ* chromogénique et la technique Dual-color SISH automatisée apparaissent comme des méthodes sensibles, efficaces et plus simples d'utilisation que la technique d'ISH à fluorescence. Cependant, et afin d'assurer l'obtention de résultats précis et validés, ces techniques doivent être utilisées dans un laboratoire disposant d'un personnel formé et expérimenté.

7.1 Recommandations

Dans le contexte d'un diagnostic fiable et rapide lié à la détection de l'amplification du gène HER2 dans les cas de cancer gastrique à un stade avancé, les données actuellement disponibles plaident en faveur de l'utilisation d'une technique d'hybridation *in situ* chromogénique (microscope à fond clair).

La technique Dual-color SISH et en particulier l'automatisation de cette procédure comporte un intérêt certain pour les laboratoires de pathologies; cependant, les évaluations comparatives et économiques restent encore limitées.

La DÉTMIS suggère qu'un registre soit maintenu afin d'obtenir des données permettant de compléter une évaluation économique. Vu le nombre limité de patients concernés par cette technologie, la centralisation de ce test dans un laboratoire spécialisé est souhaitable. Le CHUM pourrait se positionner pour devenir un centre de référence.

BIBLIOGRAPHIE

Ahmed SS, Iqbal J, Thike AA, Lim AS, Lim TH, Tien SL, Tan PH. *HER2/neu revisited : quality and interpretive issues*. J Clin Pathol. 2011 Feb ; 64 (2) : 120-4. Epub 2010 Dec 3.

Bang YJ, Van Cutsem E, Feyereislova A, Chung HC, Shen L, Sawaki A, Lordick F, Ohtsu A, Omuro Y, Satoh T, Aprile G, Kulikov E, Hill J, Lehle M, Rüschoff J, Kang YK; *ToGA Trial Investigators*. *Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER2-positive advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ToGA) : a phase 3, open-label, randomised controlled trial*. Lancet. 2010 Aug 28 ; 376 (9742) : 687-97. Epub 2010 Aug 19.

Barros-Silva JD, Leitao D, Afonso L et al. *Association of ERBB2 gene status with histopathological parameters and disease specific survival in gastric carcinoma patients*. Br. J. Cancer 2009 ; 100 ; 487-493.

Bartlett JM, Campbell FM, Ibrahim M, Wencyk P, Ellis I, Kay E, Connolly Y, O'Grady A, Di Palma S, Starczynski J, Morgan JM, Jasani B, Miller K. *Chromogenic in situ hybridization: a multicenter study comparing silver in situ hybridization with FISH*. Am J Clin Pathol. 2009 Oct ; 132 (4) : 514-20.

Bhargava R, Lal P, Chen B. *Chromogenic in situ hybridization for the detection of HER-2/neu gene amplification in breast cancer with an emphasis on tumors with borderline and low-level amplification: does it measure up to fluorescence in situ hybridization ?* Am J Clin Pathol. 2005 ; 123 : 237-243.

Boers J E, Meeuwissen H & Methorst N. *HER2 status in gastro-oesophageal adenocarcinomas assessed by two rabbit monoclonal antibodies (SP3 and 4B5) and two in situ hybridization methods (FISH and SISH)*. (2011) Histopathology 58, 383-394.

Bouché, O, Penault-Llorca, F. *HER2 et cancer de l'estomac : une nouvelle cible thérapeutique pour le trastuzumab*. Bulletin du Cancer. Volume 97 • N° 12 • décembre 2010.

Capizzi E, Gruppioni E, Grigioni AD et al. *Real time RT-PCR approach for the evaluation of ERBB2 overexpression in breast cancer archival samples: a comparative study with FISH, SISH, and immunohistochemistry*. Diagn. Mol. Pathol. 2008 ; 17 ; 220-226.

Carbone A, Botti G, Gloghini A et al. *Delineation of HER2 gene status in breast carcinoma by silver in situ hybridization is reproducible among laboratories and pathologists*. J. Mol. Diagn. 2008 ; 10 ; 527-536.

Cayre A, Mishellany F, Lagarde N, et al. *Comparison of different commercial kits for HER2 testing in breast cancer: looking for the accurate cutoff for amplification*. Breast Cancer Res. 2007 ; 9:R64. Doi: 10.1186/bcr1770.

Couturier J, Vincent-Salomon A, Nicolas A, Beuzeboc P, Mouret E, Zafrani B, Sastre-Garau X. *Strong correlation between results of fluorescent in situ hybridization and immunohistochemistry for the assessment of the ERBB2 (HER-2/neu) gene status in breast carcinoma*. Mod Pathol. 2000 Nov ; 13 (11) : 1238-43.

Dandachi N, Dietze O, Hauser-Kronberger C. *Chromogenic in situ hybridization: a novel approach to a practical and sensitive method for the detection of HER2 oncogene in archival human breast carcinoma*. Lab Invest. 2002 Aug ; 82 (8) : 1007-14.

Dietel M, Ellis IO, Ho"fler H et al. *Comparison of automated silver enhanced in situ hybridization (SISH) and fluorescence ISH (FISH) for the validation of HER2 gene status in breast carcinoma according to the guidelines of the American Society of Clinical Oncology and the College of American Pathologists*. Virchows Arch. 2007 ; 451 ; 19-25.

Dowsett M, Hanna WM, Kockx M, et al. *Standardization of HER2 testing: results of an international proficiency-testing ring study*. Mod Pathol 2007 ; 20 : 584-91.

Fassan, M., Mastracci, L., Grillo, F., Zagonel, V., Bruno, S., Battaglia, G., Pitto, F., Nitti, D., Celiento, T., Zaninotto, G., Fiocca, R. and Rugge, M. *Early HER2 dysregulation in gastric and oesophageal carcinogenesis* *Histopathology*. *Histopathology*. 2012 Mar 15. Doi : 10.1111/j.1365-2559.2012.04272.x.

Fiche M. *Hybridation in situ avec sonde fluorescente : développements actuels et perspectives en pathologie*. *Ann Pathol* 2001 ; 21 ; 383-5.

Fox SB, Kumarasinghe MP, Armes JE, Bilous M, Cummings MC, Farshid G, Fitzpatrick N, Francis GD, McCloud PI, Raymond W, Morey A. *Gastric HER2 Testing Study (GaTHER) : an evaluation of gastric/gastroesophageal junction cancer testing accuracy in Australia*. *Am J Surg Pathol*. 2012 Apr ; 36 (4) : 577-82.

Francis GD, Jones MA, Beadle GF, Stein SR. *Bright-field in situ hybridization for HER2 gene amplification in breast cancer using tissue microarrays: correlation between chromogenic (CISH) and automated silver-enhanced (SISH) methods with patient outcome*. *Diagn. Mol. Pathol*. 2009 ; 18 ; 88-95.

Gaiser T, Waha A, Moessler F et al. *Comparison of automated silver enhanced in situ hybridization and fluorescence in situ hybridization for evaluation of epidermal growth factor receptor status in human glioblastomas*. *Mod. Pathol*. 2009 ; 22 ; 1263-1271.

García-Caballero T, Grabau D, Green AR et al. *Determination of HER2 amplification in primary breast cancer using dual-color chromogenic in situ hybridization is comparable to fluorescence in situ hybridization : a European multicentre study involving 168 specimens*. *Histopathology* 2010 ; 56 ; 472-480.

García-García E, Gómez-Martín C, Angulo B, Conde E, Suárez-Gauthier A, Adrados M, Perna C, Rodríguez-Peralto JL, Hidalgo M, López-Ríos F. *Hybridization for human epidermal growth factor receptor 2 testing in gastric carcinoma: a comparison of fluorescence in-situ hybridization with a novel fully automated dual-colour silver in-situ hybridization method*. *Histopathology*. 2011 Jul ; 59 (1) : 8-17.

Carlos Gómez-Martin, Elena Garralda, M José Echarri, Anabel Ballesteros, Alberto Arcediano, José Luis Rodríguez-Peralto, Manuel Hidalgo, Fernando López-Ríos. *HER2/neu testing for anti-HER2-based therapies in patients with unresectable and/or metastatic gastric cancer*. *J Clin Pathol* 2012 ; 65 : 8 751-757.

Gong Y, Gilcrease M, Sneige N. *Reliability of chromogenic in situ hybridization for detecting HER-2 gene status in breast cancer: comparison with fluorescence in situ hybridization and assessment of interobserver reproducibility*. *Mod Pathol*. 2005 ; 18 : 1015-1021.

Gong Y, Sweet W, Duh YJ, Greenfield L, Fang Y, Zhao J, Tarco E, Symmans WF, Isola J, Sneige N. *Chromogenic in situ hybridization is a reliable method for detecting HER2 gene status in breast cancer: a multicenter study using conventional scoring criteria and the new ASCO/CAP recommendations*. *Am J Clin Pathol*. 2009 Apr ; 131 (4) : 490-7.

Grabsch H, Sivakumar S, Gray S, Gabbert HE, Müller W. *HER2 expression in gastric cancer: Rare, heterogeneous and of no prognostic value - conclusions from 924 cases of two independent series*. *Cell Oncol*. 2010 ; 32 (1-2) : 57-65.

Gravalos C, Jimeno A. *HER2 in gastric cancer: a new prognostic factor and a novel therapeutic target*. *Ann Oncol* 2008 ; 19 : 1523-9.

Gupta D, Middleton LP, Whitaker MJ, Abrams J. *Comparison of fluorescence and chromogenic in situ hybridization for detection of HER-2/neu oncogene in breast cancer*. *Am J Clin Pathol*. 2003 Mar ; 119(3):381-7.

Hauser-Kronberger C, Dandachi N. *Comparison of chromogenic in situ hybridization with other methodologies for HER2 status assessment in breast cancer*. *J Mol Histol*. 2004 ; 35 : 647-653.

Hoff ER, Tubbs RR, Myles JL, Procop GW. *HER2/neu amplification in breast cancer: stratification by tumor type and grade*. Am J Clin Pathol. 2002 Jun ; 117 (6) : 916-21.

Hoffmann M, Stoss O, Shi D, et al. *Assessment of a HER2 scoring system for gastric cancer: results from a validation study*. Histopathology 2008 ; 52 : 797–805.

Hsieh, E., P. Henry, et al. *HER2/Neu testing in 207 gastric and gastroesophageal junction adenocarcinomas: Immunohistochemistry and silver in situ hybridization (SISH) provide effective bright field methods for clinical HER2 testing Laboratory Investigation*. Conference: 100st Annual Meeting of the United States and Canadian Academy of Pathology Vancouver, BC Canada. Conference Start 92. (pp 163A). (2012).

Kim MA, Jung EJ, Lee HS et al. *Evaluation of HER-2 gene status in gastric carcinoma using immunohistochemistry, fluorescence in situ hybridization, and real-time quantitative polymerase chain reaction*. Hum. Pathol. 2007 ; 38 ; 1386-1393.

Koch JE, Kolvraa S, Petersen KB, Gregersen N, et al. *Oligonucleotide-priming methods for the chromosome-specific labeling of alpha satellite DNA in situ*. Chromosom. 1989. 98 : 259-265.

Kumamoto H, Sasano H, Taniguchi T, Suzuki T, Moriya T, Ichinohasama R. *Chromogenic in situ hybridization analysis of HER-2/neu status in breast carcinoma : application in screening of patients for trastuzumab (Herceptin) therapy*. Pathol Int. 2001 Aug ; 51 (8) : 579-84.

Lee S, de Boer WB, Fermoyle S, Platten M, Kumarasinghe MP. *Human epidermal growth factor receptor 2 testing in gastric carcinoma : issues related to heterogeneity in biopsies and resections*. Histopathology. 2011 Nov ; 59 (5) : 832-40.

Marx AH, Tharun L, Muth J et al. *HER-2 amplification is highly homogenous in gastric cancer*. Hum. Pathol. 2009 ; 40 ; 769–777.

Mayr D, Heim S, Weyrauch K et al. *Chromogenic in situ hybridization for Her-2 /neu-oncogene in breast cancer: comparison of a new dual-colour chromogenic in situ hybridization with immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization*. Histopathology 2009 ; 55 ; 716–723.

Moelans CB, van Diest PJ, Milne AN, Offerhaus GJ. *HER-2/neu Testing and Therapy in Gastroesophageal Adenocarcinoma*. Patholog Res Int. 2010 Dec 6 ; 2011 : 674182.

Moelans CB, de Weger RA, Van der Wall E, van Diest PJ. *Current technologies for HER2 testing in breast cancer*. Crit Rev Oncol Hematol. 2011 Dec; 80(3):380-92. Epub 2011 Jan 26.

Nitta H, Hauss-Wegrzyniak B, Lehrkamp M et al. *Development of automated brightfield double in situ hybridization (BDISH) application for HER2 gene and chromosome 17 centromere (CEN 17) for breast carcinomas and an assay performance comparison to manual dual color HER2 fluorescence in situ hybridization (FISH)*. Diagn. Pathol. 2008 ; 3 ; 41.

Papouchado BG, Myles J, Lloyd RV. *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 ; 767-776.

Papouchado BG, Myles J, Lloyd RV, Stoler M, Oliveira AM and 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 Jun ; 34 (6) : 767-76.

Park DI, Yun JW, Park JH et al. *HER-2/neu amplification is an independent prognostic factor in gastric cancer*. Dig. Dis. Sci. 2006 ; 51 ; 1371-1379.

Park YS, Hwang HS, Park HJ, Ryu MH, Chang HM, Yook JH, Kim BS, Jang SJ, Kang YK. *Hum. Comprehensive analysis of HER2 expression and gene amplification in gastric cancers using immunohistochemistry and in situ hybridization : which scoring system should we use ?* Pathol. 2012 Mar ; 43 (3) : 413-22.

Pedersen M, Rasmussen BB. *The correlation between dual-color chromogenic in situ hybridization and fluorescence in situ hybridization in assessing HER2 gene amplification in breast cancer.* Diagn. Mol. Pathol. 2009 ; 18 ; 96-102.

Penault-Llorca F, Chenard MP, Bouché O, Emile JF, Bibeau F, Metges JP, André T, Monges G. *Ann Pathol.* 2011 Apr ; 31 (2) : 78-87.

Powell RD, Pettay JD, Powell WC, et al. *Metallographic in situ hybridization.* Hum Pathol. 2007 ; 38 : 1145-1159.

Powell W, Loftus M, Pettay J, Gaire F, Roberts C, Dietel M, Roche P, Grogan T, Tubbs R. *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 Jun ; 34 (6) : 767-76.

Rhodes A, Jasani B, Anderson E, Dodson AR, Balaton AJ. *Evaluation of HER-2/neu immunohistochemical assay sensitivity and scoring on formalin-fixed and paraffin-processed cell lines and breast tumors : a comparative study involving results from laboratories in 21 countries.* Am J Clin Pathol 2002 ; 118 : 408-17.

Rüschoff J, Dietel M, Baretton G, et al. *HER2 diagnostics in gastric cancer-guideline validation and development of standardized immunohistochemical testing.* Virchows Arch. 2010 ; 457 : 299-3.

Shousha S, Peston D, Amo-Takyi B, Morgan M, Jasani B. *Evaluation of automated silver-enhanced in situ hybridization (SISH) for detection of HER2 gene amplification in breast carcinoma excision and core biopsy specimens.* Histopathology 2009 ; 54 ; 248-253.

Tanner M, Gancberg D, Di Leo A, et al. *Chromogenic in situ hybridization: a practical alternative for fluorescence in situ hybridization to detect HER-2/neu oncogene [amplification in archival breast cancer samples.* Am J Pathol. 2000 ; 157 : 1467-1472].

Tanner M, Hollmen M, Junttila TT et al. *Amplification of HER-2 in gastric carcinoma: association with Topoisomerase II alpha gene amplification, intestinal type, poor prognosis and sensitivity to trastuzumab.* Ann. Oncol. 2005 ; 16 ; 273-278.

Tharapel AT, Wachtel SS. *PRINS for the detection of gene deletions in cancer.* Methods Mol Biol. 2006 ; 334 : 105-13.

Thompson SK, Sullivan TR, Davies R, Ruzskiewicz AR. *Her-2/neu gene amplification in esophageal adenocarcinoma and its influence on survival.* Ann Surg Oncol. 2011 Jul ; 18 (7) : 2010-7. Epub 2011 Jan 26.

Tubbs R, Myles J, Papouchado B, et al. *Inter-observer interpretative reproducibility of HER2 genotyping of a consecutive series of primary breast carcinomas by silver in situ hybridization (SISH).* Breast Cancer Res Treat. 2007 ; 106 (suppl 1) : S86. Abstract 2008.

Uchino S, Tsuda H, Maruyama K, et al. *Overexpression of c-erbB-2 protein in gastric cancer.* Cancer 1993 ; 2 : 3179-3184.

Van Cutsem E et al. *Efficacy Results from the ToGA Trial : A Phase III Study of Trastuzumab Added to Standard Chemotherapy in First-Line HER2-Positive Advanced Gastric Cancer* Proc ASCO 2009 ; Abstract LBA4509.

Vladich F, Pestic-Dragovich L, McElhinny AS, et al. *A rapid, automated silver in situ hybridization (SISH) detection assay for HER2 gene status determination in breast carcinoma.* Presented at the 2007 ASCO Breast Cancer Symposium.

Wolff CA, Hammond MEH, Schwartz JN, 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 : 118-145.

Yan B, Yau EX, Bte Omar SS, Ong CW, Pang B, Yeoh KG, et al. *A study of HER2 gene amplification and protein expression in gastric cancer.* J Clin Pathol 2010 ; 63 : 839-42.

Yano T, Doi T, Ohtsu A et al. *Comparison of HER2 gene amplification assessed by fluorescence in situ hybridization and HER2 protein expression assessed by immunohistochemistry in gastric cancer.* Oncol. Rep. 2006 ; 15 ; 65-71.

Yoo SB, Lee HJ, Park JO et al. *Reliability of chromogenic in situ hybridization for epidermal growth factor receptor gene copy number detection in non-small-cell lung carcinomas: a comparison* Lung cancer. 2010 Mar; 67(3) 301-5.

Zhang XL, Yang YS, Xu DP, Qu JH, Guo MZ, Gong Y, et al. *Comparative study on overexpression of HER2/neu and HER3 in gastric cancer.* World J Surg 2009 ; 33 : 2112-8 With fluorescence in situ hybridization study. Lung Cancer 2010 ; 67 ; 301-305.

Zhao J, Wu R, Au A, Shi Z. *Chromogenic in situ hybridization (CISH) : A practical method to confirm the immunohistochemical (IHC) results for HER-2 amplification in archival breast carcinoma samples.* Mod Pathol Juin 2002 15 (6) pp : 657-65.

ANNEXES

Annexe A – Tableaux descriptifs des études

AUTEUR	DEVIS	OBJECTIFS ET DESCRIPTION DU PROTOCOLE	RÉSULTATS						
Garcia-Garcia E 2011	Rétrospective	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Comparaison de la FISH avec la technique dual-color SIH automatisée ▪ 166 adénocarcinomes gastriques de plusieurs centres : 50 biopsies endoscopiques (30,1%) 116 résections chirurgicales (69,9%) dont 15 (9%) sont des métastases à distance <p>Type histologique (Classification de Lauren)</p> <table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="padding: 2px;">Diffus</td> <td style="padding: 2px; text-align: right;">16 (51,8%)</td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;">Intestinal</td> <td style="padding: 2px; text-align: right;">47 (28,3%)</td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;">Indéterminé</td> <td style="padding: 2px; text-align: right;">33 (19,9%)</td> </tr> </table> <p>PCR en temps réel Real-time quantitative PCR menée avec la trousse LightMix HER-2. neu (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA).</p> <p>FISH Trousse avec sonde DNA PathVysion HER2 (Vysis, USA), avec Dako Histology FISH Accessory kit.</p> <p>Dual-color SISH Système automatisé Ventana Benchmark XT (Ventana Medical Systems, USA) avec sondes INFORM HER2 DNA et INFORM Chromosome 17</p>	Diffus	16 (51,8%)	Intestinal	47 (28,3%)	Indéterminé	33 (19,9%)	<p><u>FISH</u></p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ 166 prélèvements dont 17,5% ont été amplifiés (positifs) ▪ 55% sont des DMA¹² et 45% ont une amplification en grappe ▪ L'amplification est hétérogène dans 52% des cas ▪ Le ratio médian est, suivant l'observateur, égal à 5 et à 5,25 ▪ Il existe une association statistiquement significative entre le sous-type histologique intestinal (86% <i>versus</i> 14%, ($p < 0,0001$)) <p><u>Dual-colour SISH</u></p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ 166 prélèvements dont 21% ont été amplifiés (positifs) ▪ 34% sont des DMA et 46% ont une amplification en grappe et 20% ont une amplification de type mixte ▪ L'amplification est hétérogène dans 29% des cas ▪ Le ratio médian est, suivant l'observateur, égal à 5,65 et à 5,75 () <p><u>Corrélation entre FISH et SISH</u></p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Corrélation dans 96,4% des cas ▪ Six cas positifs au SISH étaient négatifs avec la FISH (sensibilité de 1, spécificité de 0,956, concordance de 0,964, $\kappa = 0,884$) ▪ Les cas discordants étaient polysomiques et ont été confirmés négatifs par amplification par PCR en temps réel ▪ Les rapports HER/CEP17 pour ce groupe sont compris entre 2,06 et 2,50 (l'utilisation d'un <i>cutoff</i> ≥ 3 permet d'obtenir une parfaite concordance (sensibilité de 1, spécificité de 1, concordance de 1, $\kappa = 1$; tableau 2) ▪ Tous les ratios des cas SISH concordants étaient > 3 (médianes de 8,1 et 6,02) ▪ Ces résultats sont compatibles avec les études précédentes des rapports sur ISH HER2 fond clair utilisant une seule coloration
Diffus	16 (51,8%)								
Intestinal	47 (28,3%)								
Indéterminé	33 (19,9%)								

¹² DMA : double chromosome amplification ou amplification en chromosome double minute. Ce sont des fragments d'ADN extrachromosomiques observés dans un grand nombre de tumeurs humaines. Ils ne comportent pas de centromère ou de télomère. Ils sont une manifestation de l'amplification génique pendant le développement de tumeurs. On retrouve souvent la présence d'oncogènes et de gènes liés à la résistance aux médicaments.

AUTEUR	DEVIS	OBJECTIFS ET DESCRIPTION DU PROTOCOLE	RÉSULTATS															
Boers et coll. 2011	Rétrospective (1999–2007)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 178 patients consécutifs ▪ 146 adénocarcinomes : <ul style="list-style-type: none"> 74 au niveau de l'estomac distal (24 du corps gastrique et 50 de l'antra gastrique) Type intestinal 73 % et 2 de type mucineux 28 cardia (82 % et 0 %) 44 œsophage (91 % et 0 %) <p>IHC : Hercep test™ Anticorps 4B5 (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ, USA) et SP3 (Labvision; Thermo Fisher Scientific, Fremont, CA, USA)</p> <p>FISH PathVysion (Abbott, Abbott Park, IL, États-Unis) utilisant des sondes pour HER2 et le chromosome 17 (Chr 17) et calcul du rapport HER2/ Chr17</p> <p>SISH (INFORM; Ventana) utilise deux lames séparées pour les sondes HER2 et le sondes Chr 17 et permet le calcul du rapport HER2/ Chr 17</p>	<p>IHC SP3 IHC 0 n = 125 (86 %) ; 1+ n = 4 ; 2+ n = 6 ; 3+ n = 1 cas IHC 4B5 IHC 0 n = 106 (72 %) ; 1+ n = 17 ; 2+ n = 6 ; 3+ n = 17 cas</p> <p>Tous les IHC ≥ 1+ montrent une coloration dans ≥ 10 cellules tumorales le plus souvent avec coloration basolatérale en U Coloration de fond absente avec Ac SP3 (différence avec Ac 4B5) La coloration du cytoplasme est notée dans 40 cas (27 %) dont 7 (5 %) avec immunoréactivité nucléaire dans deux cas, seule une forte coloration de fond a été notée sans coloration membraneuse notable</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ 146 cas (la durée de fixation peut être responsable de l'apparition, dans certains cas, de coloration, brume nucléaire) ▪ Les 17 cas SP3 2+/3+ sont amplifiés et 5/129 (4%) cas SP3 0/1+ ▪ 1/des 123 4B5 0/1+ et 21/23 (91 %) cas 2+/3+ sont amplifiés ▪ 2 cas amplifiés avec SP3 = 0 ; un score de 2+ avec 4B5 <p>Les 3 cas amplifiés avec SP3 1+ avaient un score de 2+ avec 4B5 dans 2 cas et 1+ dans un cas. Deux cas présentant une forte coloration nucléaire (sans coloration membranaire avec 4B5) étaient négatifs avec la SISH.</p> <table border="1" data-bbox="957 846 1787 922"> <thead> <tr> <th></th> <th>Sensibilité</th> <th>Spécificité</th> <th>VPP</th> <th>VPN</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>SP3</td> <td>77,3 %</td> <td>100 %</td> <td>100 %</td> <td>96,1 %</td> </tr> <tr> <td>4B5</td> <td>95,5 %</td> <td>98,4 %</td> <td>91,3 %</td> <td>99,2 %</td> </tr> </tbody> </table> <p>Sur les 42 cas pour lesquels la technique FISH a été effectuée, les résultats et ceux obtenus par la SISH étaient similaires : 22 cas ont été amplifiés Une coloration de fond granulaire a été observée dans un nombre limité de cellules tumorales et épithéliales normales</p> <p><u>Hétérogénéité</u> : les zones d'amplification de HER2 sont étroitement liées à l'immunoréactivité HER2. Cependant, en dehors du score IHC, le pourcentage de coloration de la tumeur pour un anticorps ne permet pas de prévoir le statut de HER2. Une seule généralisation : les cas les plus amplifiés ont un score de 2+ ou 3+ avec SP3, et 3 + (un pourcentage) ou 2 + (> 50 % de la tumeur avec 4B5)</p> <p>Polysomie définie comme ≥ 3 Chr 17 copies par cellule présents dans 28 cas (19,2 %) 7 cas sur 22 des cas amplifiés (32 %) ont ≥ 5 signaux HER2 par noyau. En revanche, la polysomie présente dans 21 /104 cas avait moins de 5 signaux HER2 par noyau</p> <p>Sur un total de 117 adénocarcinomes de type intestinal, 20 (17 %) ont montré une HER2-amplification; 17 cas ont été situés dans la région GO et deux dans l'estomac distal Deux des 15 cas (13 %) avec un type histologique mixte étaient également amplifiés et se trouvaient dans l'estomac distal Aucun des 14 cas avec le type histologique diffus ou mucineux n'ont montré d'amplification</p>		Sensibilité	Spécificité	VPP	VPN	SP3	77,3 %	100 %	100 %	96,1 %	4B5	95,5 %	98,4 %	91,3 %	99,2 %
	Sensibilité	Spécificité	VPP	VPN														
SP3	77,3 %	100 %	100 %	96,1 %														
4B5	95,5 %	98,4 %	91,3 %	99,2 %														

AUTEUR	DEVIS	OBJECTIFS ET DESCRIPTION DU PROTOCOLE	RÉSULTATS
Lee et coll. 2011	Rétrospective (2000-2009)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Évaluation du statut de HER2 et de l'hétérogénéité des cancers gastriques par IHC et SISH ▪ Étude de la corrélation du statut de HER2 entre résections et biopsies de cancer gastrique ▪ Échantillons de tumeurs (GOJ) archivés et traités, dont le type histologique a été évalué ▪ 118 biopsies et 114 sections de gastrectomies (incluant 54 cas appariés de biopsies et de résections gastriques) ▪ Total : 178 patients <p>IHC</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Ventana XT ; anticorps CERB2 (Dako, Glostrup, Danemark) ▪ Le score de la surexpression de HER2 est fondé sur les critères d'Hoffman et ses collaborateurs : un score de IHC 3 + est donné pour les sections de gastrectomie avec coloration forte, complète ou basolatérale dans ≥ 10 % des cellules tumorales. Pour les biopsies, un amas de cellules fortement colorés (environ cinq ou plus) ▪ Hétérogénéité (prélèvements de gastrectomie) HER2 a été définie comme < 66 % de la tumeur composée de HER2 positifs clonés <p>SISH</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ SISH a été réalisée dans 61 biopsies et 36 sections de gastrectomie ▪ System automatisé Ventana INFORM HER2 ▪ Le comptage se fait sur 20 cellules et est considéré HER2 positif si ≥ 6 copies 	<p>Corrélation des IHC et SISH</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Évaluée dans 97 sections de biopsie et une gastrectomie ▪ IHC (0 et 1+) et IHC positivité (3 +) étaient concordants avec SISH dans 77 des 80 cas (96,2 %, n = 47/49 IHC 0-1+, n = 30/31 IHC3+) ▪ 6/17 IHC équivoques (2 +). L'amplification obtenue par SISH correspond aux sections ayant montré une surexpression de HER2 à l'IHC ▪ 2 des 49 IHC négatives (0. 1 +) ont également été SISH négatives <p><i>Discordance</i></p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Un cas avec motif de coloration inhabituelle ▪ Un cas IHC1+ et SISH + sur une section de gastrectomie alors que la biopsie a montré une IHC 3 + ▪ Un cas pour lequel la biopsie a montré une IHC 3 + une SISH – lors d'une dysplasie de haut grade ▪ Une difficulté est rencontrée dans l'évaluation du statut de HER2 dans le carcinome gastrique diffus, en particulier dans les biopsies <p>Hétérogénéité</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ L'hétérogénéité a été étudiée dans les sections 12 IHC 3 + ou IHC 2+ /SISH positif. Dans 6 cas (50 %), l'hétérogénéité de la coloration est significative. La proportion de clones IHC 2+/ 3+ dans les sections de gastrectomies variait de < 33 % (n = 4) à 33-66 % (n = 2) à > 66 % (n = 6) ▪ Dans les 3 tumeurs pour lesquelles < 33% ont présenté une IHC 2+/3+, on retrouve des zones IHC plus faibles (2+ ou 1+). Ces zones plus faiblement colorées ont également montré un test SISH positif ▪ L'hétérogénéité a été évidente dans les cas de biopsie HER2 positive, avec une réactivité HER2 non uniforme entre les fragments de tumeur. Seulement 19 des 33 (57,6 %) cas ont montré un résultat diffus de HER2 positivité dans tous les fragments de tumeur ▪ Les clones HER2 positifs se démarquent nettement de la tumeur négative, mais la section correspondante n'a pas montré d'hétérogénéité morphologique ▪ Dans 4 des 6 cas de résections de gastrectomie due à des dysplasies de haut grade, on retrouve un score IHC de 3+. Dans les deux cas restants, une immunoréactivité HER2 a été observée dans seulement environ 30 % de la muqueuse dysplasique <p>Concordance entre les gastrectomies et biopsies de 74,1 %. Les cas faux négatifs (biopsies) sont associés à des erreurs d'échantillonnage lors de la prise de prélèvements de tumeur en biopsie</p>

AUTEUR	DEVIS	OBJECTIFS ET DESCRIPTION DU PROTOCOLE	RÉSULTATS																																																																										
Park et coll. 2011	Rétrospective (01/2000 - 04/2007)	<ul style="list-style-type: none"> 1091 adénocarcinomes gastriques primaires sans chimiothérapie ou radiothérapie 738 hommes et 353 femmes 20 à 70 ans (médiane, 55 ans) <p>Localisation : 1/3 supérieur n = 105 ; moyen n = 416 ; 1/3 inférieur n = 422 et multiple ou sur l'ensemble de l'estomac n = 148</p> <p>Ils ont été regroupés à partir de 2 études de phase III indépendantes randomisées contrôlée [19,20], qui étaient tous les cas curatifs, gastrectomie</p> <p>Stade évolutif : stade II n = 484 ; stade IIIA n = 345 ; stade IIIB n = 138 ; Stade IV n = 124</p> <p>Type histologique (selon la classification Lauren) : intestinal n = 347 ; diffus n = 577, et mixte ou indéterminé n = 140 mixtes</p> <p>IHC : HercepTest (polyclonal antibody; DAKO, Glostrup, Denmark) and Pathway Anticorps monoclonal 4B5; Ventana Medical System, Tucson, AZ)</p> <p>L'échelle utilisée est basée sur le Gastric Cancer Scoring System (GCSS) suggérée par Hoffman et ses collaborateurs [Hoffman] et le Breast Cancer Scoring System (BCSS) par les lignes directrices de l'ASCO / CAP [Wolf 2007]</p> <p>FISH : Abbott PathVysion HER2 DNA Probe Kit protocol (Laboratoire Abbott)</p> <p>SISH : INFORM HER2 DNA et sonde chromosome 17 (CEP17) (Ventana Medical System) : le score a été effectué selon les critères des lignes directrices ASCO / PAC</p> <p>Les comparaisons des sensibilités et des spécificités ont été analysées statistiquement en utilisant un test de type Wald. $p < 0,05$ est considéré statistiquement significatif. Les valeurs kappa ont été calculées utilisant le logiciel statistique SPSS 15.0.</p>	<p>Tableau de concordance entre FISH et Dual-color SISH</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="2">FISH</th> <th colspan="2">Dual-color SISH</th> <th rowspan="2">Total</th> </tr> <tr> <th>Négatif</th> <th>Positif</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <th>Négatif</th> <td>513 (99)</td> <td>4 (5,7)</td> <td>517</td> </tr> <tr> <th>Positif</th> <td>5 (1)</td> <td>66 (94,3)</td> <td>71</td> </tr> <tr> <th>Total</th> <td>518</td> <td>70</td> <td>588</td> </tr> </tbody> </table> <p>*En gras les cas de discordance entre FISH et Dual-color SISH</p> <p>Tableau de concordance entre IHC et Dual-color SISH</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="2">Dual-color SISH</th> <th colspan="4">Score IHC : Utilisation de l'échelle GCSS</th> <th rowspan="2">Total</th> </tr> <tr> <th>0</th> <th>1+</th> <th>2+</th> <th>3+</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <th>Négatif</th> <td>764 (97,2)</td> <td>121 (88,3)</td> <td>34 (66,7)</td> <td>0 (0)</td> <td>919</td> </tr> <tr> <th>Positif</th> <td>22 (2,8)^a</td> <td>16 (11,7)</td> <td>17 (33,3)</td> <td>68 (100)</td> <td>123</td> </tr> <tr> <th>Total</th> <td>786</td> <td>137</td> <td>51</td> <td>68</td> <td>1 042</td> </tr> </tbody> </table> <table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="2">Dual-color SISH</th> <th colspan="4">Score IHC : Utilisation de l'échelle BCSS</th> <th rowspan="2">Total</th> </tr> <tr> <th>0</th> <th>1+</th> <th>2+</th> <th>3+</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <th>Négatif</th> <td>764 (97,2)</td> <td>147 (78,2)</td> <td>8 (32,0)</td> <td>0 (0)</td> <td>919</td> </tr> <tr> <th>Positif</th> <td>22 (2,8)</td> <td>41 (21,8)</td> <td>17 (68,0)</td> <td>43 (100)</td> <td>123</td> </tr> <tr> <th>Total</th> <td>786</td> <td>188</td> <td>25</td> <td>43</td> <td>1 042</td> </tr> </tbody> </table> <p>* En gras, les cas de discordances entre IHC et Dual-color SISH</p> <p>Concordance des résultats obtenus avec IHC et de dual-color SISH entre les différents systèmes de notation</p> <p>La sensibilité avec GCSS était significativement plus élevée que celle obtenue avec l'échelle BCSS pour les deux types d'anticorps (respectivement $p = 0,003$ et $p < 0,001$)</p> <p>La spécificité de BCSS était plus élevée que celle obtenue avec GCSS pour les deux anticorps ($p = 0,004$ et $p < 0,001$). Toutefois, les spécificités étaient $> 96\%$ dans les 2 systèmes de notation et pour les 2 types d'anticorps utilisés</p> <p>La différence de survie globale entre les cas GCSS positifs/BCSS négatifs et les cas GCSS négatifs/BCSS négatifs, n'a montré aucune différence statistique (HercepTest, $p = 0,777$; Pathway, $p = 0,764$; les données n'ont pas été présentées)</p>	FISH	Dual-color SISH		Total	Négatif	Positif	Négatif	513 (99)	4 (5,7)	517	Positif	5 (1)	66 (94,3)	71	Total	518	70	588	Dual-color SISH	Score IHC : Utilisation de l'échelle GCSS				Total	0	1+	2+	3+	Négatif	764 (97,2)	121 (88,3)	34 (66,7)	0 (0)	919	Positif	22 (2,8)^a	16 (11,7)	17 (33,3)	68 (100)	123	Total	786	137	51	68	1 042	Dual-color SISH	Score IHC : Utilisation de l'échelle BCSS				Total	0	1+	2+	3+	Négatif	764 (97,2)	147 (78,2)	8 (32,0)	0 (0)	919	Positif	22 (2,8)	41 (21,8)	17 (68,0)	43 (100)	123	Total	786	188	25	43	1 042
FISH	Dual-color SISH		Total																																																																										
	Négatif	Positif																																																																											
Négatif	513 (99)	4 (5,7)	517																																																																										
Positif	5 (1)	66 (94,3)	71																																																																										
Total	518	70	588																																																																										
Dual-color SISH	Score IHC : Utilisation de l'échelle GCSS				Total																																																																								
	0	1+	2+	3+																																																																									
Négatif	764 (97,2)	121 (88,3)	34 (66,7)	0 (0)	919																																																																								
Positif	22 (2,8)^a	16 (11,7)	17 (33,3)	68 (100)	123																																																																								
Total	786	137	51	68	1 042																																																																								
Dual-color SISH	Score IHC : Utilisation de l'échelle BCSS				Total																																																																								
	0	1+	2+	3+																																																																									
Négatif	764 (97,2)	147 (78,2)	8 (32,0)	0 (0)	919																																																																								
Positif	22 (2,8)	41 (21,8)	17 (68,0)	43 (100)	123																																																																								
Total	786	188	25	43	1 042																																																																								

AUTEUR	DEVIS	OBJECTIFS ET DESCRIPTION DU PROTOCOLE	RÉSULTATS
Fox et coll. 2012	<p>Évaluation de la concordance interlaboratoire des tests de détection du statut de 'HER2 dans les cancers (primitifs et secondaires) gastriques et de la jonction gastro-œsophagienne</p> <p>Prospective, comparative, multicentrique</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 9 laboratoires de références (dont un laboratoire de référence pour la FISH) ▪ 15 adénocarcinomes (estomac et JGO) ▪ 100 échantillons prétestés ont été sélectionnés dont 40 % étaient IHC3+ avec un minimum d'échantillons avec un score de IHC = 0 assurant une puissance suffisante pour l'étude de concordance (faiblement à fortement positif) <p>Les échantillons ont été prélevés en 2 exemplaires. Les courbes non colorées ont été envoyées aux différents laboratoires :</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Pour HER2/IHC, n = 9 ▪ CISH Double-sonde, n = 3 ▪ SISH, n = 6 ▪ FISH, n = 1 Laboratoire de référence de HER2 et Chr 17 ▪ Différents types d'anticorps ont été utilisés pour l'IHC : A0485 de Dako = 4; 4B5 de Ventana = 4 et SP3 de Pierce biotech = 1 <p>Un second système de notation a été utilisé et comparé à celui utilisé lors de l'étude ToGA (Intensity scoring method [48])</p> <p>Au total :</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ IHC évaluée par la méthode ToGA dans tous les laboratoires ▪ CISH évaluée dans tous les laboratoires ▪ SISH évaluée dans tous les laboratoires ▪ CISH et SISH combinées dans tous les laboratoires ▪ Comparaison des résultats : laboratoire de référence (LR) FISH <i>versus</i> CISH ▪ Comparaison des résultats : laboratoire de référence FISH <i>versus</i> SISH ▪ Laboratoire de référence FISH <i>versus</i> CISH et SISH combinées <p>Analyse statistique des résultats</p>	<p>Corrélation interlaboratoire IHC HER2 selon la méthode utilisée par l'étude ToGA : Une corrélation modérée a été observée entre les différents laboratoires ($\kappa = 0,46$; SE = 0,010; accord global 68 %). Celle-ci est meilleure lorsque les deux IHC0 et IHC1 + scores ont été classés comme IHC négatif, IHC2 + en tant que équivoques, et IHC3 + seulement comme positif ($\kappa = 0,62$; SE = 0,014; accord global 84 %)</p> <p>Une bonne corrélation est retrouvée pour IHC3 + ($\kappa = 0,76$; SE = 0,018; accord global 92 %)</p> <p>Corrélation interlaboratoire sur le score HER2 par CISH / SISH : Elle est bonne à très bonne quand le score selon le nombre de copies HER2 a été utilisé, classé comme suit : négatif (< 4), équivoques (4 à 6), ou positif (> 6) pour l'amplification ($\kappa = 0,68$ [SE = 0,050] à 0,86 [SE = 0,020])</p> <p>Cette corrélation interlaboratoire reste inchangée (CISH) ou réduite (SISH) lorsque le seuil de positivité (<i>cutoff</i>) du rapport HER2/chr17 utilisé est $\geq 2,0$ ou $\geq 2,2$. ($\kappa = 0,59$ [SE = 0,027] à 0,70 [SE = 0,027]).</p> <p>Corrélation entre le score HER2 établi par FISH (laboratoire de référence) par rapport à ceux établis par CISH / SISH : Très bonne ($\kappa = 0,88$ [SE = 0,040] à 0,91 [SE = 0,020]). Elle diminue lorsque le seuil de positivité (<i>cutoff</i>) du rapport HER2/chr17 utilisé est $\geq 2,0$ ou $\geq 2,2$ ($\kappa = 0,84$ [SE = 0,037] à 0,86 [SE = 0,053])</p> <p>Une hétérogénéité statistiquement significative est observée lors de la comparaison des SISH avec la méthode FISH.</p> <p>Corrélation interlaboratoire entre les résultats obtenus par IHC et ISH selon la méthode utilisé par ToGA : La corrélation est bonne ou très bonne lorsqu'on considère des tests positifs à l'IHC (3+) et les tests FISH ($\kappa = 0,85$; SE = 0,030) ou CISH / SISH ($\kappa = 0,83$; SE = 0,010) en utilisant le comptage des copies HER2. L'utilisation d'un seuil de positivité (<i>cutoff</i>) du rapport HER2/chr17 $\geq 2,0$ ou ≥ 2 affaiblit cette corrélation et une hétérogénéité statistiquement significative est observée lors de la comparaison avec la technique SISH. Ces effets sont encore plus marqués lorsqu'on considère la positivité de l'IHC à 2+/3+ (IHC et CISH / SISH [$\kappa = 0,73$; SE = 0,010] ou FISH [$\kappa = 0,78$; SE = 0,030])</p> <p>Une bonne concordance des résultats entre les 2 types d'échelle de calcul (ToGA et méthode de notation en fonction de l'intensité) quand IHC3 + est considéré comme positif ($\kappa = 0,65$; SE = 0,010). Une hétérogénéité statistiquement significative est observée</p>

AUTEURS	DEVIS	OBJECTIFS ET DESCRIPTION DU PROTOCOLE	RÉSULTATS																	
Gómez-Martin et coll. 2012	<p>Étude comparative du statut de HER2 chez des patients présentant un cancer gastrique à un stade avancé</p> <p>Étude rétrospective.</p>	<p>Évaluer la fréquence de l'amplification du gène HER2 ou une surexpression sur les prélèvements histologiques provenant de patients atteints d'un cancer gastrique à un stade avancé</p> <p>Évaluer l'association de l'amplification de HER2 avec les caractéristiques cliniques des patients et leur survie</p>	<p><u>Surexpression de HER2 par IHC</u></p> <table> <tr> <td>Score de 0</td> <td>122 patients (82,4 %)</td> </tr> <tr> <td>Score de 1+</td> <td>5 patients (3,4 %)</td> </tr> <tr> <td>Score de 2+</td> <td>6 (4,1 %)</td> </tr> <tr> <td>Score de 3+</td> <td>15 (10,1 %). Cas considérés comme IHC positifs</td> </tr> </table> <p><u>Amplification de HER2</u></p> <table> <thead> <tr> <th></th> <th>FISH</th> <th>dc-SISH</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Nombre de cas</td> <td>27</td> <td>32</td> </tr> <tr> <td>HER2/CEP17 (moyen)</td> <td>5,81 de 2,1 à 12,3 (IC à 95 % 4,64 à 6,98)</td> <td>6,87 de 2,1 à 16,7 (IC à 95 % 5,51 à 8,23)</td> </tr> </tbody> </table> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Pas de différence statistiquement significative de la surexpression de HER2 selon le sexe, l'âge ou la localisation métastatique ▪ Pas de différence statistiquement significative de l'amplification de HER2 selon l'âge et le sexe (FISH ou cc-SISH). Une diminution du nombre d'amplification (dc-SISH) a été obtenue chez les patients atteints de carcinome péritonéal ($p = 0,0218$) ▪ En présence d'une tumeur de type intestinal, les résultats étaient fortement positifs : IHC = 73,3 %; FISH = 85,1 % et dc-SISH = 81,25 % ▪ Association statistiquement significative entre un type histologique intestinal et une amplification positive (FISH ou dc-SISH) ($p < 0,0001$) ▪ Tous les échantillons amplifiés par FISH et dc-SISH ont été confirmés par une RT-PCR ▪ Discordance : Six des 34 cas amplifiés par dc-SISH ont été négatifs par la technique FISH (tous étaient IHC 0/1+). Tous les cas ont été polysomiques ou l'absence d'amplification a été confirmée par RT-PCR. Les 5 cas amplifiés (FISH ou par dc-SISH) avaient un score de 0/1+ à l'IHC et dans les 2 cas pour lesquels une RT-PCR a pu être effectuée, l'amplification de HER2/neu a été confirmée <p>Corrélation avec la survie des patients - Amplification du gène HER2 ou surexpression</p> <p><i>Survie médiane sans progression (SSP)</i> de 6,14 mois (IC à 95 % 5,19 à 7,23 mois) : Il n'y a pas de différence de SSP selon la présence ou non de surexpression de HER2. Cependant une différence statistiquement significative a été observée en fonction de la présence ou non d'amplification</p> <p><i>Survie globale médiane (SG)</i> de 11,37 mois (IC à 95 % 9,00 à 13,83 mois) pour toute la population. La survie globale moyenne était significativement plus longue dans le groupe de patients pour lequel une surexpression de HER2 ou une amplification est rapportée, et ce, quelle que soit la technique utilisée (IHC (21,4 vs 9,8 mois, HR (rapport de risques) 0,42 ; $p = 0,005$), FISH (19,6 vs 9,7 mois, HR 0,49 ; $p = 0,007$) ou cc-SISH (19,6 vs 9,7 mois, HR 0,53 ; $p = 0,009$))</p>	Score de 0	122 patients (82,4 %)	Score de 1+	5 patients (3,4 %)	Score de 2+	6 (4,1 %)	Score de 3+	15 (10,1 %). Cas considérés comme IHC positifs		FISH	dc-SISH	Nombre de cas	27	32	HER2/CEP17 (moyen)	5,81 de 2,1 à 12,3 (IC à 95 % 4,64 à 6,98)	6,87 de 2,1 à 16,7 (IC à 95 % 5,51 à 8,23)
Score de 0	122 patients (82,4 %)																			
Score de 1+	5 patients (3,4 %)																			
Score de 2+	6 (4,1 %)																			
Score de 3+	15 (10,1 %). Cas considérés comme IHC positifs																			
	FISH	dc-SISH																		
Nombre de cas	27	32																		
HER2/CEP17 (moyen)	5,81 de 2,1 à 12,3 (IC à 95 % 4,64 à 6,98)	6,87 de 2,1 à 16,7 (IC à 95 % 5,51 à 8,23)																		

AUTEURS	DEVIS	OBJECTIFS ET DESCRIPTION DU PROTOCOLE	RÉSULTATS
			<p>La survie globale médiane pour le sous-groupe de patients atteints de type intestinal GC (14,5 mois ; IC à 95 % : 12,02 à 21,16) était significativement supérieure à celle observée dans les tumeurs autres que celles de type intestinal (7,36 mois, IC à 95 % 6,24 à 10,31) (log-rank $p = 0,0011$)</p> <p>Analyse multivariée de survie</p> <p><i>La présence de type histologique intestinal semble constituer un facteur pronostic favorable (vs type non intestinal : HR) :</i></p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ 0,68; IC à 95 % 0,46 à 0,99; $p = 0,044$) ▪ IHC (IHC3+ vs IHC ≤ 2 : HR : 0,47, IC à 95 % 0,24 à 0,94; $p = 0,032$) ▪ FISH (ratio ≥ 2 vs ratio < 2 : HR : 0,58, IC à 95 % 0,34 à 0,99; $p = 0,046$) dc-SISH (ratio ≥ 2 vs ratio < 2 : HR : 0,58, IC à 95 % 0,36 à 0,93; $p = 0,023$) <p><u>Remarque</u> : La même analyse a été effectuée pour le sous-groupe de patients de type intestinal : La surexpression de HER2 de la protéine ou de son amplification déterminée par FISH ne semble pas avoir une valeur pronostique particulière, seule la présence de métastases hépatiques (HR : 1,74, IC à 95 % 1,03 à 2,94; $p = 0,038$) ou un carcinome péritonéale (HR : 2,87, IC à 95 % 1,56 à 5,30; $p = 0,0007$) ayant été statistiquement significative</p> <p>Carcinome péritonéal : facteur pronostic défavorable pour la SG (HR : 1,60, IC à 95 % 1,08 à 2,38; $p = 0,020$)</p> <p>L'analyse de la survie globale montre des différences significatives entre les quatre sous-groupes de patients stratifiés en fonction à la fois de leur type histologique (Lauren) et des résultats des tests (IHC ou FISH, ne dc- SISH) selon le modèle de Kaplan Meier ($p = 0,0003$, test log-rank). L'analyse de régression par modèle de Cox a montré des résultats similaires ($p = 0,0005$)</p> <p>Les auteurs concluent que la mise en évidence d'une amplification du gène HER2 par HIS (FISH ou dc-SISH) est associée à un taux de survie plus élevé. < HER2 approches d'amplification génique pourrait être une stratégie d'essai optimale pour la sélection des patients qui sont candidats à un traitement par des thérapies anti-HER2</p>

AUTEURS	DEVIS	OBJECTIFS ET DESCRIPTION DU PROTOCOLE	RÉSULTATS
Fassan et coll. 2012 [15]	Étude comparative, rétrospective	<p>275 prélèvements :</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ 100 biopsies de tumeurs gastriques ▪ 125 biopsies de l'œsophage de Barrett <p>Des échantillons de biopsie de muqueuse gastrique normale (25 cas) et spinocellulaire muqueuse œsophagienne normale (25 cas) obtenus à partir de patients dyspeptiques ont été utilisés comme témoins normaux.</p> <p>IHC <i>Immunohistochimie</i></p> <p>Dans chaque cas, une IHC a été réalisée par l'application de deux protocoles d'immunomarquage commerciaux, selon les recommandations des fabricants :</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Pathway HER-2 / neu anticorps de lapin (4B5) monoclonal (Ventana Medical Systems, Milan, Italie), plate-forme XT automatisée (Ventana Medica Systèmes) ▪ IHC système ORACLE HER2 Bond (CB11) anticorps monoclonal de souris (Menarini Diagnostics, Florence, Italie), en utilisant le Leica automatisé bondmax Microsystems (Leica, Wetzlar, Allemagne) <p>Expression de HER2 marquée conformément à la HercepTest à quatre niveaux, tel que modifiée par l'adénocarcinome gastrique : Un score de 3+ est considéré comme positif.</p> <p>Dc-SISH</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ HER2 et la sonde énumération chromosome 17 (SCEP) ont été testés sur la lame : HER2 Ventana ISH bicolore (Ventana Medical Systems). La coloration automatisée de référence XT plate-forme XT (Ventana Medical Systems) ▪ Le protocole standard ▪ La trousse de détection ultraView SISH et réactifs accessoires (Ventana Medical Systems) ▪ Les résultats ont été évalués sur un système Cyres (Zeiss, Jena, Allemagne) composé d'un microscope optique classique connecté à un moniteur via une caméra couleur 3CCD (JVC, Tokyo, Japon) ▪ HER2 résultats en simples points noirs, des copies simples du chromosome 17 du SCEP sont présentés sous forme de points rouges ▪ HER2/CEP ≥ ou quand il y avait des preuves de grappes de signaux HER2 <p>Les différences et les corrélations entre les groupes ont été testées avec le test de Kruskal-Wallis. Le coefficient k est utilisé pour vérifier le niveau d'accord entre les résultats obtenus par les différents anticorps utilisés (4B5 en comparaison avec CB11), et le statut HER2 défini par IHC ou établie SISH. Les valeurs de k, allant de 0,61 à 0,80 indiquent une bonne corrélation. Les valeurs de $p < 0,05$ ont été considérées comme statistiquement significatives. L'analyse statistique a été réalisée avec le logiciel Stata (Stata Corporation, College Station, TX, USA).</p>	<p>IHC</p> <p>Corrélation observée. Un très bon accord a été observé dans les 275 échantillons analysés entre la coloration obtenue à l'aide de 4B5 et lors de l'utilisation de CB11 (95,3 % ; $k = 0,78$; $p < 0,001$), avec des divergences dans seulement 13/275</p> <p>Une surexpression de HER2 (2+ et 3+) est également retrouvée dans les 2 types de tissus gastriques et œsophagiens. Le taux de cette surexpression est augmenté de façon significative avec le degré de dédifférenciation des lésions (du bas grade au haut grade), $p < 0,001$ (Kruskal-Wallis) pour les deux anticorps</p> <p>Amplification de HER2</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Estomac : 1 cas TIE de bas grade; 4 cas TIE de haut grade et 8 cas d'adénocarcinome ▪ Pour les tumeurs œsophagiennes, 2 cas de TIE de bas grade; 5 cas de TIE de haut grade et 7 cas d'adénocarcinome de Barrett ▪ Le taux d'amplification de HER2 a augmenté de façon significative de la tumeur de bas grade, à la tumeur de haut grade, à l'adénocarcinome ($p < 0,001$, Kruskal-Wallis). <p>Il existe une excellente concordance entre les résultats de dc-SISH et la surexpression (2+ et 3+) de HER2 pour les deux anticorps : 4B5 (97,8 %; $k = 0,89$, $p < 0,001$) et CB11 (98,5 %; $k = 0,91$, $p < 0,001$)</p> <p>Tous les prélèvements 3+ (pour les 2 anticorps) présentaient une amplification HER2</p>

Annexe B - Bref descriptif de l'étude TOGA

L'étude ToGA est une étude internationale, randomisée, multicentrique de phase III. Cinq cent quatre-vingt-quatre patients (sur 3800 patients testés) ayant un cancer gastrique ou un cancer de la jonction gastro-œsophagienne HER2 positif à un stade avancé (récurrent, métastatique ou inopérable) ont été inclus dans cette étude. Les patients ont été répartis au hasard pour recevoir un des deux traitements suivants :

- 5-FU ou capécitabine + cisplatine 3 x par semaine, pendant 6 cycles (n = 290)
- 5-FU ou capécitabine + cisplatine 3 x par semaine, pendant 6 cycles + trastuzumab 3 x par semaine. Administration jusqu'à la progression de la maladie (n = 294).

L'objectif principal de l'étude consistait à étudier et à comparer l'efficacité globale du groupe traité par chimiothérapie + trastuzumab à celle du groupe recevant la chimiothérapie seule.

L'étude ToGA a montré la supériorité de l'association trastuzumab à la chimiothérapie en ce qui concerne la survie globale : 13,8 vs 11,1 mois (HR : 0,74 ; IC à 95 % : [0,60-0,91] ; p = 0,0046) dans les cancers gastriques ou les cancers de la JOG à un stade avancé HER2+. Cette efficacité était encore plus importante dans le sous-groupe avec une surexpression HER2 définie comme IHC3+ ou IHC2+ confirmée par un test d'HIS (16 % de la population testée). Pour cette population de patients, la survie globale lors de l'étude a été de 16 mois en moyenne, comparativement à 11,8 mois pour les patients n'ayant pas reçu de trastuzumab [Van Cutsem et coll., 2009].

	CHIMIOTHÉRAPIE N = 290	CHIMIOTHÉRAPIE + TRASTUZUMAB N = 294	HR (IC à 95 %)	P
Survie globale	11,1	13,8	0,74 (0,60-0,91)	0,0046
Survie sans progression médiante en mois	5,5	6,7	0,71 (0,59-0,85)	0,0002
Délai avant la progression de la maladie	5,6	7,1	0,70 (0,58-0,85)	0,0003
Taux de réponse globale (%)	34,5 %	47,3 %	1,70 ^b (1,22, 2,38)	0,0017
Durée de la réponse	4,8	6,9	0,54 (0,40-0,73)	< 0,0001

^a Médiante en mois ; ^b Odds ratio