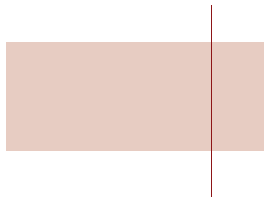


Performance diagnostique des techniques de détermination du statut HER-2 dans le cancer du sein

AGENCE D'ÉVALUATION DES TECHNOLOGIES
ET DES MODES D'INTERVENTION EN SANTÉ

ETMIS 2008; Vol. 4 : N° 3



Performance diagnostique des techniques de détermination du statut HER-2 dans le cancer du sein

Rapport préparé pour l'AETMIS par

Cathy Gosselin et Pierre Dagenais

Mai 2008

20*ans*
AVEC VOUS
POUR LA SANTÉ

Agence d'évaluation
des technologies
et des modes
d'intervention en santé
Québec 

Ce rapport a été adopté par l'Assemblée des membres de l'Agence lors de sa réunion du 19 mars 2008.

Le contenu de cette publication a été rédigé et édité par l'Agence d'évaluation des technologies et des modes d'intervention en santé (AETMIS). Ce document ainsi que le résumé anglais, intitulé *Diagnostic Performance of Techniques Used for HER-2 Testing in Breast Cancer*, sont également offerts en format PDF dans le site Web de l'Agence.

RÉVISION SCIENTIFIQUE

D^r Gilles Pineau, conseiller scientifique

COORDINATION INTERNE ET MONTAGE

Jocelyne Guillot

VÉRIFICATION BIBLIOGRAPHIQUE

Denis Santerre

RESPONSABLE DES OPÉRATIONS ET DE LA PERFORMANCE

Lise-Ann Davignon

COORDINATION DE LA LECTURE EXTERNE

Lise-Ann Davignon

BIBLIOTHÉCAIRES

Pierre Vincent

RECHERCHE DOCUMENTAIRE

Micheline Paquin

COMMUNICATIONS ET DIFFUSION

Service des communications

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

Agence d'évaluation des technologies et des modes d'intervention en santé

2021, avenue Union, bureau 10.083

Montréal (Québec) H3A 2S9

Téléphone : 514-873-2563

Télécopieur : 514-873-1369

Courriel : aetmis@aetmis.gouv.qc.ca

www.aetmis.gouv.qc.ca

Comment citer ce document :

Agence d'évaluation des technologies et des modes d'intervention en santé (AETMIS). Performance diagnostique des techniques de détermination du statut HER-2 dans le cancer du sein. Rapport préparé par Cathy Gosselin et Pierre Dagenais. ETMIS 2008;4(3):1-110.

Dépôt légal

Bibliothèque et Archives nationales du Québec, 2008

Bibliothèque et Archives Canada, 2008

ISSN 1915-3082 ETMIS (Imprimé), ISSN 1915-3104 ETMIS (PDF)

ISBN 978-2-550-52721-3 (Imprimé), ISBN 978-2-550-52722-0 (PDF)

© Gouvernement du Québec, 2008.

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

LA MISSION

L'Agence d'évaluation des technologies et des modes d'intervention en santé (AETMIS) a pour mission de contribuer à améliorer le système de santé québécois. Pour ce faire, l'Agence conseille et appuie le ministre de la Santé et des Services sociaux ainsi que les décideurs du système de santé en matière d'évaluation des services et des technologies de la santé. L'Agence émet des avis basés sur des rapports scientifiques évaluant l'introduction, la diffusion et l'utilisation des technologies de la santé, incluant les aides techniques pour personnes handicapées, ainsi que les modalités de prestation et d'organisation des services. Les évaluations tiennent compte de multiples facteurs, dont l'efficacité, la sécurité et l'efficience ainsi que les enjeux éthiques, sociaux, organisationnels et économiques.

LES MEMBRES

D^{re} Marie-Dominique Beaulieu,
titulaire de la Chaire Docteur Sadok Besroun en médecine
familiale, professeure titulaire, Faculté de médecine,
Université de Montréal, et chercheure, Centre de recherche
du CHUM, Montréal

D^{re} Sylvie Bernier,
directrice, Organisation des services médicaux et technologiques,
MSSS, Québec

D^r Serge Dubé,
chirurgien, directeur du programme de chirurgie, Hôpital
Maisonnette-Rosemont, et vice-doyen aux affaires professorales,
Faculté de médecine, Université de Montréal

M. Roger Jacob,
ingénieur, directeur associé, Gestion des immobilisations et
des technologies médicales, Agence de la santé et des services
sociaux de Montréal

D^r Michel Labrecque,
professeur et chercheur clinicien, Unité de médecine familiale,
Hôpital Saint-François d'Assise, CHUQ, Québec

M. A.-Robert LeBlanc,
ingénieur, professeur titulaire et directeur des programmes,
Institut de génie biomédical, Université de Montréal, et directeur
adjoint à la recherche, au développement et à la valorisation,
Centre de recherche de l'Hôpital du Sacré-Cœur de Montréal

LA DIRECTION

D^r Juan Roberto Iglesias,
président-directeur général

D^{re} Alicia Framarin,
directrice scientifique

D^r Reiner Banken,
directeur général adjoint au développement et aux partenariats

D^r Pierre Dagenais,
directeur scientifique adjoint

M. Jean-Marie R. Lance,
économiste, conseiller scientifique principal

M^{me} Esther Leclerc,
infirmière, directrice des soins infirmiers, CHUM, Montréal

D^r Jean-Marie Moutquin,
spécialiste en gynéco-obstétrique, directeur de la recherche et
directeur du département d'obstétrique-gynécologie, CHUS,
Sherbrooke

D^r Réginald Nadeau,
cardiologue, chercheur, Centre de recherche de l'Hôpital du
Sacré-Cœur de Montréal, et professeur émérite, Faculté de
médecine, Université de Montréal

M^{me} Johane Patenaude,
éthicienne, professeure agrégée, département de chirurgie,
Faculté de médecine, Université de Sherbrooke, et chercheure
boursière, FRSQ

D^r Simon Racine,
spécialiste en santé communautaire, directeur général adjoint aux
affaires cliniques, Centre hospitalier Robert-Giffard – Institut
universitaire en santé mentale, Québec

PRÉFACE



On estime qu'en 2007, environ 5 900 femmes ont reçu un diagnostic de cancer du sein au Québec. Malgré une baisse des taux de mortalité par cancer du sein dans tous les groupes d'âge, celui-ci constitue la deuxième cause de décès par cancer chez la femme, et demeure la première cause de mortalité par cancer chez les femmes de moins de 50 ans. Environ 1 400 patientes en seraient décédées en 2007.

Approximativement de 18 à 20 % des patientes atteintes d'un cancer du sein présenteraient un mauvais pronostic associé au marqueur biologique HER-2. La protéine HER-2, le récepteur 2 du facteur de croissance épidermique humain, peut se retrouver en quantité excessive à la surface des cellules tumorales, favorisant ainsi leur prolifération. Chez ces patientes dites « HER-2 positives », on observe entre autres un risque accru de récurrence après chirurgie et un temps de survie réduit.

Le trastuzumab (Herceptin®), un médicament spécifiquement conçu pour inhiber l'activité du récepteur HER-2 à la surface des cellules tumorales, est susceptible d'améliorer de façon significative le pronostic des femmes de statut HER-2 positif. Il est toutefois très coûteux (environ 45 000 \$ CA par patiente) et entraîne un risque de cardiotoxicité.

Initialement approuvé pour le traitement des stades métastatiques, le trastuzumab est maintenant indiqué pour le traitement adjuvant des cancers infiltrants du sein de stade précoce. Afin de déterminer si les patientes sont susceptibles de bénéficier du médicament, il est maintenant la norme de pratique d'établir le statut HER-2 de tout cancer infiltrant du sein au moment du diagnostic.

Compte tenu de l'importance clinique et économique de l'administration du trastuzumab, le statut HER-2 d'une patiente se doit d'être déterminé avec la plus grande exactitude possible, en minimisant les résultats faux positifs et faux négatifs.

Pour ce faire, il existe plusieurs tests diagnostiques différents comportant chacun leurs avantages et inconvénients. Les tests et algorithmes d'utilisation recommandés par les divers organismes internationaux varient également d'un pays à l'autre. Le Comité de l'évolution des pratiques en oncologie (CEPO) a donc demandé à l'AETMIS d'effectuer une évaluation comparative des méthodes de détermination du statut HER-2 d'une tumeur.

Le présent rapport constitue une revue systématique de la performance diagnostique des techniques de détermination du statut HER-2 dans le cancer du sein. Les conclusions et recommandations pourront servir de fondement pour l'élaboration, par le CEPO, d'un guide de pratique clinique pour l'utilisation des tests, ainsi que pour l'organisation, par la Direction de la lutte contre le cancer, de l'offre de service des tests par les laboratoires d'anatomopathologie.

Juan Roberto Iglesias, m.d., M. Sc.,
président-directeur général

L'AVIS EN BREF

La norme de pratique est maintenant d'établir le statut HER-2 de toutes les femmes atteintes d'un cancer infiltrant du sein afin de déterminer leur admissibilité au trastuzumab (Herceptin®). La présente évaluation montre que le test diagnostique généralement utilisé en première intention dans la province et au pays, l'immunohistochimie (IHC), exige une grande expertise des laboratoires qui l'effectuent et des anatomopathologistes qui l'interprètent. En outre, les différents tests d'hybridation *in situ* (ISH), dont certains sont présentement utilisés au Québec pour confirmer un résultat équivoque d'IHC, ne sont pas toujours équivalents en terme d'exactitude au test de référence, l'hybridation *in situ* fluorescente (FISH). De plus, l'assurance qualité interne et externe dans les laboratoires est indispensable, et dans ce contexte, le recours à des laboratoires centraux ou de référence doit être privilégié. À la lumière de ces considérations, l'AETMIS recommande :

- 1) que les autorités concernées mettent en place un programme d'assurance qualité relatif aux tests de détermination du statut HER-2 au Québec et que, dans le cadre de ce programme, les mesures suivantes soient introduites :
 - la désignation d'au moins un laboratoire de référence;
 - l'élaboration et l'application par ce ou ces laboratoires de référence de mesures d'assurance qualité interne;
 - la validation périodique des résultats de ce ou ces laboratoires avec ceux d'autres laboratoires de référence provinciaux et canadiens ou étrangers;
 - l'affiliation à un laboratoire de référence de tous les laboratoires qui effectuent les tests concernés et leur participation obligatoire au programme d'assurance qualité externe établi;
 - la validation initiale et périodique des méthodes utilisées dans tous les laboratoires qui effectuent les tests concernés et l'obligation pour ces laboratoires de satisfaire aux exigences de qualité définies par le ou les laboratoires de référence;
 - l'obligation pour les laboratoires de satisfaire au nombre minimal de cas à tester annuellement recommandé par les normes canadiennes, soit 250 pour l'IHC et 100 (idéalement 200) pour les tests d'ISH, tout en limitant le nombre d'anatomopathologistes chargés de leur interprétation de façon à maintenir leur expertise;
 - la formation continue des anatomopathologistes et du personnel de laboratoire impliqué;
 - la préparation conforme aux meilleures pratiques des échantillons à soumettre par les hôpitaux aux laboratoires qui effectuent les tests concernés;
 - l'évaluation de la faisabilité de mettre sur pied une banque de données centrale regroupant les résultats de ces tests ainsi que d'autres données pertinentes pour l'ensemble des patientes atteintes d'un cancer infiltrant du sein;
- 2) que les recommandations canadiennes relatives à l'utilisation des tests d'IHC et FISH soient suivies par les laboratoires, notamment le recours initial au test d'IHC suivi du test FISH (ou autres tests d'ISH validés) pour les résultats équivoques;
- 3) que le test FISH puisse être le test initial effectué lorsque la qualité de l'échantillon reçu par le laboratoire est mise en doute;
- 4) que l'utilisation du test d'hybridation *in situ* chromogénique (CISH) dans le but de confirmer un résultat équivoque obtenu par IHC se fasse à l'aide de deux sondes : l'une pour le gène HER-2 et l'autre pour le centromère du chromosome 17;
- 5) que la performance diagnostique de l'hybridation *in situ* argentique (SISH) fasse l'objet d'une veille documentaire jusqu'à ce que les données probantes confirment la validité de cette technique.

REMERCIEMENTS

Le présent rapport a été préparé par Cathy Gosselin, M. Sc. (épidémiologie), chercheure consultante, et par D^r Pierre Dagenais, M.D., FRCP(C) (rhumatologie), Ph. D. (biologie cellulaire), M. Sc. (évaluation et gestion des technologies de la santé) et directeur scientifique adjoint, à la demande de l'Agence d'évaluation des technologies et des modes d'intervention en santé (AETMIS).

L'AETMIS remercie vivement les lecteurs externes pour leurs précieuses suggestions et leur contribution à la qualité générale et à la rigueur de ce rapport :

D^{re} Julie Beaudet

Hématologue et oncologue médical, Hôpital Maisonneuve-Rosemont et professeure adjointe de clinique, département de médecine, Faculté de médecine, Université de Montréal, Montréal (Québec)

D^r Jean Deschênes

Anatomopathologiste, Associate Professor of Pathology, Department of Pathology and Laboratory Medicine, Cross Cancer Institute, University of Alberta, Edmonton (Alberta)

D^r Louis Gaboury

Directeur, Plateforme d'histologie, Institut de recherche en immunologie et en oncologie (IRIC), Université de Montréal, Montréal (Québec), anatomopathologiste, Hôtel-Dieu de Montréal (CHUM), Montréal (Québec), professeur agrégé, département de pathologie et de biologie cellulaire, Université de Montréal, Montréal (Québec) et président de l'Association des pathologistes du Québec (APQ)

D^{re} Wedad Hanna

Anatomopathologiste, Chief, Anatomic Pathology, Sunnybrook Health Sciences Centre, Toronto (Ontario) et Professor, Department of Laboratory Medicine & Pathobiology, Faculty of Medicine, University of Toronto, Toronto (Ontario)

D^r Simon Jacob

Anatomopathologiste, Service de pathologie, Hôpital du Saint-Sacrement (CHAUQ), Québec (Québec)

D^r Sylvain Mailhot

Anatomopathologiste, Pathologie anatomique et clinique, Centre de santé et de services sociaux (CSSS) de Rimouski-Neigette, Rimouski (Québec)

D^r Bernard Têtu

Anatomopathologiste, Hôtel-Dieu de Québec (CHUQ), Québec (Québec), professeur titulaire, division de pathologie, département de biologie médicale, Faculté de médecine, Université Laval, Sainte-Foy (Québec)

L'AETMIS tient également à remercier les personnes suivantes pour avoir fourni plusieurs informations pertinentes à la préparation de ce rapport :

D^{re} Anne-Marie Bourgault

Microbiologiste infectiologue, directrice du Laboratoire de santé publique du Québec, Sainte-Anne-de-Bellevue (Québec)

D^r Louis Lamarre

Anatomopathologiste, Hôpital Charles LeMoine, Greenfield Park (Québec)

M^{me} Nancy Roberge

Biochimiste (B. Sc.), professionnelle de recherche, Unité d'interface clinique, Centre de recherche de l'Hôtel-Dieu de Québec (CRHDQ), Québec (Québec)

M. François Sanschagrin

Biologiste moléculaire (Ph. D.), Service de pathologie, Hôpital du Saint-Sacrement (CHAUQ), Québec (Québec) et professeur associé, département de biologie médicale, Faculté de Médecine, Université Laval, Sainte-Foy (Québec) et chercheur associé, Unité de recherche en santé des populations, Centre de recherche du CHAUQ, Québec (Québec)

M^{me} Lina Sévigny

Service du développement et de l'évaluation des technologies, Ministère de la santé et des services sociaux (MSSS), Québec (Québec)

M. Pierre Turcotte

Responsable des programmes d'assurance qualité, Laboratoire de santé publique du Québec, Sainte-Anne-de-Bellevue (Québec)

Les membres du Comité de l'évolution des pratiques en oncologie (CEPO)

DIVULGATION DE CONFLITS D'INTÉRÊTS

Aucun conflit à signaler.

RÉSUMÉ

Introduction

Au Québec, on estime que 5 900 femmes ont reçu un diagnostic de cancer du sein au cours de l'année 2007. Environ 18 à 20 % d'entre elles présentent un mauvais pronostic associé au marqueur biologique HER-2. Chez ce sous-groupe de patientes, les cellules tumorales expriment à leur surface une quantité excessive d'un récepteur membranaire de facteurs de croissance, la protéine HER-2, qui favorise la prolifération tumorale. Il en résulte entre autres un risque accru de récurrence après la chirurgie et une diminution de la réponse tumorale à la chimiothérapie conventionnelle.

Le trastuzumab (Herceptin®), un médicament ciblé contre la protéine HER-2, améliore de façon significative le pronostic de ces patientes. Toutefois, cette thérapie est très coûteuse et comporte des risques d'effets indésirables graves. Son administration doit donc être strictement réservée aux patientes atteintes d'un cancer infiltrant surexprimant la protéine HER-2, seules susceptibles d'en retirer des bénéfices.

La norme de pratique est maintenant d'établir le statut HER-2 au diagnostic pour tout cancer infiltrant du sein. L'importance des effets cliniques et économiques associés à l'administration du trastuzumab exige que le statut HER-2 soit déterminé avec le plus d'exactitude possible. Plusieurs modalités diagnostiques sont actuellement disponibles, avec leurs avantages et inconvénients respectifs. Le Comité de l'évolution des pratiques en oncologie (CEPO) a donc demandé à l'AETMIS de réaliser une évaluation comparative des techniques de détermination du statut HER-2 dans le cancer du sein. Cette évaluation pourrait servir d'assise aux membres du CEPO pour l'élaboration de lignes directrices de pratique clinique et à la Direction de la lutte contre le cancer pour l'organisation de services offerts par les laboratoires d'anatomopathologie.

Les techniques de détermination du statut HER-2

L'immunohistochimie (IHC) est une technique peu coûteuse, rapide et facilement disponible dans la plupart des laboratoires de pathologie. Elle utilise des anticorps et une réaction enzymatique pour mettre en évidence le niveau d'expression de la protéine HER-2 à la surface des cellules tumorales. La coloration produite par la réaction s'interprète de façon semi-quantitative à l'aide d'une échelle de 0 à 3+, le score 3+ correspondant à une surexpression protéique.

D'autres méthodes indirectes comme l'hybridation *in situ* (ISH) visent plutôt à détecter une amplification du gène codant pour la production de la protéine HER-2. L'amplification est une augmentation du nombre de copies du gène par chromosome et serait le mécanisme le plus souvent responsable de la surexpression de la protéine. Le statut HER-2 d'une tumeur présentant une amplification du gène est donc aussi considéré positif.

L'hybridation *in situ* fluorescente (FISH) est la forme d'ISH la plus connue. Elle utilise des sondes d'ADN marquées d'un fluorochrome qui se lient spécifiquement aux copies du gène et en permettent le décompte. Elle exige plus de temps et un équipement coûteux qui n'est disponible que dans quelques laboratoires de pathologie. Le test FISH semble plus reproductible que l'IHC.

Le plus souvent, le FISH est effectué à l'aide de deux sondes différentes : l'une spécifique au gène HER-2 et l'autre spécifique au centromère du chromosome 17 (CEP17). Comme une hausse du nombre de copies par cellule du gène HER-2 attribuable à une polysomie 17 ne représente pas une vraie amplification, l'utilisation simultanée des deux sondes permet cette correction.

L'hybridation *in situ* chromogénique (CISH) est une forme d'ISH qui utilise une réaction chromogénique pour mettre en évidence les sondes d'ADN hybridées au site du gène. Elle présente un avantage considérable sur le FISH, celui de ne pas exiger d'équipement spécialisé et coûteux. Toutefois, les deux sondes HER-2 et CEP17 ne peuvent être utilisées simultanément et exigent deux réactions séparées d'hybridation. En pratique, il n'est pas rare que la sonde HER-2 soit la seule utilisée pour le CISH.

L'hybridation *in situ* argentique (SISH) est une nouvelle technique d'ISH qui utilise la précipitation d'ions argent pour le repérage des sondes d'ADN hybridées. Cette technique a été adaptée pour une préparation automatisée des lames et un contrôle possible de la polysomie 17.

Enfin, les techniques de PCR et de RT-PCR en temps réel sont des techniques de biologie moléculaire qui permettent de quantifier le contenu des cellules tumorales en ADN ou en ARN messager (ARNm) spécifique à une séquence génique (HER-2 *versus* un gène de référence). Elles ont jusqu'à maintenant été utilisées surtout en recherche.

Les techniques et algorithmes recommandés pour déterminer le statut HER-2 diffèrent d'un pays à l'autre. Aux États-Unis, on recommande autant le FISH que l'IHC comme test initial. Au Canada, l'IHC est recommandée comme test initial suivi d'un des trois tests d'ISH (FISH, CISH ou SISH) pour confirmer un résultat équivoque. En Europe, on recommande l'IHC, le CISH ou le FISH en première intention.

Méthode de recherche

Le présent document constitue une revue systématique de la littérature au sujet de la performance diagnostique des techniques de l'IHC, du CISH, du SISH et des PCR et RT-PCR en temps réel dans le cancer du sein. Le test de référence utilisé pour l'analyse est le FISH qui inclut les sondes HER-2 et CEP17. La distribution des scores d'IHC chez les patientes atteintes d'un cancer du sein est estimée et la concordance des résultats de FISH et de CISH pour chaque score d'IHC (0, 1+, 2+ et 3+) est présentée. Les variabilités interobservateurs et interlaboratoires de chaque technique sont également évaluées. Le présent rapport inclut l'analyse des études publiées entre janvier 2000 et novembre 2007 inclusivement.

Résultats

Près des trois quarts (environ 73 %) des patientes atteintes d'un cancer du sein obtiennent un résultat négatif d'IHC (scores 0 ou 1+) dont la grande majorité (97,4 %) peut être confirmée par FISH. Quant aux patientes testées positives à l'IHC (score 3+), seulement 89,9 % obtiennent un résultat positif du FISH, on peut donc dire que 10,1 % de ces cas sont discordants. La concordance entre les résultats d'IHC et de FISH est toutefois améliorée lorsque les tests sont effectués dans des laboratoires centraux ou de référence plutôt que dans des laboratoires locaux.

La performance diagnostique du CISH est très bonne mais seulement lorsque les sondes HER-2 et CEP17 sont utilisées en complémentarité. Autrement, la sensibilité comme la spécificité du test diminuent sous le seuil de 95 %. Parmi les cas ayant obtenu un résultat

équivoque d'IHC (score 2+), le résultat du CISH est variable et concorde moins bien avec le résultat du FISH.

Seulement deux études comparant le SISH et le FISH ont été repérées, dont une seule a tenu compte de la correction pour la polysomie 17. L'utilisation de deux sondes (HER-2 et CEP17) semble améliorer la performance du SISH, mais sa sensibilité demeure faible malgré tout.

Les PCR et RT-PCR en temps réel ont une bonne spécificité mais détectent difficilement les cas positifs au FISH. La sélection des cellules tumorales à analyser par microdissection au laser semble augmenter l'exactitude du PCR, mais les preuves dans la présente évaluation s'appuient sur une seule étude.

Le niveau d'accord entre anatomopathologistes dans l'interprétation des tests d'IHC varie beaucoup d'une étude à l'autre et n'est pas toujours satisfaisant compte tenu des enjeux impliqués. Quoique moins étudiées, les variabilités interobservateurs du FISH, du CISH et du SISH semblent très bonnes.

Quant à la reproductibilité interlaboratoires des tests, elle est de faible à moyenne pour l'IHC et semble meilleure entre laboratoires qui utilisent les mêmes anticorps. Plusieurs études ont rapporté pour des laboratoires locaux des proportions élevées (de 18,4 à 36,4 %) de résultats d'IHC positifs (score 3+) qui se sont par la suite révélés négatifs lorsque retestés par IHC dans un laboratoire central ou de référence.

La concordance des résultats de FISH est bonne entre laboratoires locaux *versus* laboratoires centraux et excellente entre laboratoires centraux. Les résultats de reproductibilité interlaboratoires du CISH sont plus rares mais semblent bons, alors que ceux du SISH et des techniques de PCR et RT-PCR en temps réel ne sont toujours pas disponibles.

Conclusions

L'utilisation de l'IHC comme test initial semble une bonne stratégie pour détecter rapidement et à moindre coût les patientes non susceptibles de bénéficier du trastuzumab. D'une part, ces patientes représentent la grande majorité des cas de cancer du sein et d'autre part, les résultats négatifs d'IHC concordent bien avec ceux du FISH.

En revanche, parmi les cas positifs (3+) à l'IHC, beaucoup s'avèrent négatifs au FISH. Étant donné la variabilité des résultats d'IHC, certains de ces cas pourraient représenter de faux positifs associés à des difficultés techniques, de calibration de la méthode ou d'interprétation. Leur proportion parmi l'ensemble des cas discordants est toutefois inconnue, puisque des mécanismes biologiques peuvent aussi mener à la surexpression d'une protéine sans qu'il y ait amplification du gène. À ce jour, la réponse au trastuzumab des cas discordants serait encore incertaine.

Toutefois, comme la protéine est la cible du traitement, les lignes directrices consensuelles canadiennes considèrent d'emblée admissibles au trastuzumab les cas positifs à un test d'IHC effectué sur un échantillon de bonne qualité dans des laboratoires à l'expertise reconnue et soumis à des mesures d'assurance qualité interne et externe.

Pour améliorer l'exactitude du diagnostic, plusieurs laboratoires de la province effectuent pour chaque patiente non pas un mais deux tests d'IHC avec des anticorps de sensibilités différentes. Ils réfèrent ensuite en ISH tous les cas discordants ou équivoques. Même s'il apparaît raisonnable de croire que cet algorithme puisse améliorer l'exactitude des tests, les données probantes permettant de le soutenir sont encore peu nombreuses.

Quoi qu'il en soit, cette stratégie à deux tests d'IHC ne devrait pas pallier l'absence au Québec d'un programme formel d'assurance qualité externe propre à ces tests ni le nombre insuffisant de tests d'IHC effectués par certains laboratoires de la province. En effet, plusieurs laboratoires ne testeraient pas le nombre annuel minimal de cas prescrit dans les normes canadiennes pour assurer la compétence désirée.

Par ailleurs, les lignes directrices consensuelles canadiennes reconnaissent l'utilisation du CISH comme solution de rechange au FISH, mais ce test, lorsque effectué à l'aide d'une sonde HER-2 uniquement, n'apparaît pas suffisamment performant pour remplacer le FISH. Au Québec, le CISH est effectué sans sonde centromérique du chromosome 17 et une certaine quantité de ces tests doivent donc être repris par FISH pour valider l'exactitude du diagnostic.

De plus, la recommandation canadienne d'utiliser le SISH comme option possible semble davantage s'appuyer sur des opinions d'experts que sur des données probantes. La performance diagnostique rapportée dans la littérature est nettement insuffisante. Néanmoins, cette analyse est en voie d'implantation au Québec.

Aucune donnée probante présentée dans cette évaluation n'appuie le PCR ou le RT-PCR en temps réel comme solution de remplacement au FISH dans un contexte clinique.

Recommandations

À la lumière de ces considérations, l'AETMIS recommande :

- 1) que les autorités concernées mettent en place un programme d'assurance qualité relatif aux tests de détermination du statut HER-2 au Québec et que, dans le cadre de ce programme, les mesures suivantes soient introduites :
 - la désignation d'au moins un laboratoire de référence;
 - l'élaboration et l'application par ce ou ces laboratoires de référence de mesures d'assurance qualité interne;
 - la validation périodique des résultats de ce ou ces laboratoires avec ceux d'autres laboratoires de référence provinciaux et canadiens ou étrangers;
 - l'affiliation à un laboratoire de référence de tous les laboratoires qui effectuent les tests concernés et leur participation obligatoire au programme d'assurance qualité externe établi;
 - la validation initiale et périodique des méthodes utilisées dans tous les laboratoires qui effectuent les tests concernés et l'obligation pour ces laboratoires de satisfaire aux exigences de qualité définies par le ou les laboratoires de référence;
 - l'obligation pour les laboratoires de satisfaire au nombre minimal de cas à tester annuellement recommandé par les normes canadiennes, soit 250 pour l'immunohistochimie (IHC) et 100 (idéalement 200) pour les tests d'hybridation *in situ* (ISH), tout en limitant le nombre d'anatomopathologistes chargés de leur interprétation de façon à maintenir leur expertise;
 - la formation continue des anatomopathologistes et du personnel de laboratoire impliqué;
 - la préparation conforme aux meilleures pratiques des échantillons à soumettre par les hôpitaux aux laboratoires qui effectuent les tests concernés;

- l'évaluation de la faisabilité de mettre sur pied une banque de données centrale regroupant les résultats de ces tests ainsi que d'autres données pertinentes pour l'ensemble des patientes atteintes d'un cancer infiltrant du sein;
- 2) que les recommandations canadiennes relatives à l'utilisation des tests d'IHC et d'hybridation *in situ* fluorescente (FISH) soient suivies par les laboratoires, notamment le recours initial au test d'IHC suivi du test FISH (ou autres tests d'ISH validés) pour les résultats équivoques;
 - 3) que le test FISH puisse être le test initial effectué lorsque la qualité de l'échantillon reçu par le laboratoire est mise en doute;
 - 4) que l'utilisation du test d'hybridation *in situ* chromogénique (CISH) dans le but de confirmer un résultat équivoque obtenu par IHC se fasse à l'aide de deux sondes : l'une pour le gène HER-2 et l'autre pour le centromère du chromosome 17;
 - 5) que la performance diagnostique de l'hybridation *in situ* argentique (SISH) fasse l'objet d'une veille documentaire jusqu'à ce que les données probantes confirment la validité de cette technique.

ABRÉVIATIONS ET ACRONYMES

Ac	Anticorps
ACIS	<i>Automated cellular imaging system</i>
ADN	Acide désoxyribonucléique
AEC	3-amino-9-ethylcarbazole
AETMIS	Agence d'évaluation des technologies et des modes d'intervention en santé
AMC	Association médicale canadienne
APP	<i>Alzheimer's disease amyloid A4 protein</i>
APQ	Association des pathologistes du Québec
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ASCO	American Society of Clinical Oncology
CAP	College of American Pathologists
CEP17	<i>Centromeric probe 17</i> (en français, sonde centromérique du chromosome 17)
CEPO	Comité de l'évolution des pratiques en oncologie
CHA	Centre hospitalier affilié
CHAUQ	Centre hospitalier affilié universitaire de Québec (réfère également au CHA)
CHUM	Centre hospitalier de l'Université de Montréal
CHUQ	Centre hospitalier universitaire de Québec
CHUS	Centre hospitalier universitaire de Sherbrooke
CISH	<i>Chromogenic in situ hybridization</i> (en français, hybridation <i>in situ</i> chromogénique)
CRHDQ	Centre de recherche de l'Hôtel-Dieu de Québec
CSSS	Centre de santé et de services sociaux
CUSM	Centre universitaire de santé McGill
DAB	3,3'-diaminobenzidine
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DIG	Digoxigénine
DNP	Dinitrophénol
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i> (en français, récepteur du facteur de croissance épidermique)
ELISA	<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i> (en français, essai par immunosorbant lié à une enzyme)
É.-U.	États-Unis
FDA	Food and Drug Administration
FFPE	<i>Formalin-fixed and paraffin-embedded</i> (en français, fixé à la formaline et inclus en paraffine)

FIHC	<i>Fluorescence immunohistochemistry</i> (en français, immunohistochimie fluorescente)
FISH	<i>Fluorescence in situ hybridization</i> (en français, hybridation <i>in situ</i> fluorescente)
FITC	Fluorescéine isothiocyanate
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i> (en français, peroxydase de raifort)
IC	Intervalle de confiance
ICC	Immunocytochimie
IHC	Immunohistochimie
INQAT	Italian Network for Quality Assurance of Tumor Biomarkers
IRIC	Institut de recherche en immunologie et en oncologie
ISH	Hybridation <i>in situ</i>
k	Kappa
K_w	<i>Weighted kappa</i> (en français, kappa pondéré)
LBI-HTA	Ludwig Boltzmann Institute for Health Technology Assessment
MSSS	Ministère de la Santé et des Services sociaux
NBCC	National Breast Cancer Centre
NCCN	National Comprehensive Cancer Network
NCCTG	North Central Cancer Treatment Group
NEQAS	National External Quality Assessment Scheme
NSABP	National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project
OQLF	Office québécois de la langue française
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (en français, réaction en chaîne de la polymérase)
PGDS	<i>Protein and gene double staining</i>
PGTM	Programme de gestion thérapeutique des médicaments
QUADAS	<i>Quality Assessment of Diagnostic Accuracy Studies</i>
RAMQ	Régie de l'assurance maladie du Québec
RT-PCR	<i>Reverse-transcriptase PCR</i>
SCC	Société canadienne du cancer
SISH	<i>Silver-enhanced in situ hybridization</i> (en français, hybridation <i>in situ</i> argentique)
SNCHSC	<i>Sunnybrook and Women's College Health Sciences Center</i>
TBP	<i>TATA box binding protein</i>
TMA	<i>Tissue microarrays</i> (en français, micromatrices tissulaires)
UK	United Kingdom
VPN	Valeur prédictive négative
VPP	Valeur prédictive positive

GLOSSAIRE

Amplification de gène

Production *in vivo* de copies supplémentaires d'une séquence d'ADN ou extrachromosomique [OQLF, 2007].

Aneuploïdie

Anomalie caractérisée par la présence, dans les cellules d'un individu, d'un nombre anormal de chromosomes. Le nombre de chromosomes peut être insuffisant ou en excès [OQLF, 2007].

Aneusomie

Terme générique, désignant toute anomalie numérique des chromosomes ou toute anomalie quantitative (par défaut ou par excès) du matériel chromosomique [OQLF, 2007].

Anticorps monoclonal

Anticorps produit par des cellules hybrides appelées hybridomes. Ces cellules ont la capacité de se multiplier en culture, chacune donnant naissance à une lignée cellulaire, ou clone, qui produit une seule sorte d'anticorps, appelé, pour cette raison, monoclonal [OQLF, 2007].

Anticorps polyclonal

Mélange complexe d'immunoglobulines reconnaissant une série d'épitopes différents (d'après Karol Sikora et Howard M. Smedley, Anticorps monoclonaux, 1986, p. 13) [OQLF, 2007].

Anticorps primaire

Anticorps qui se fixe directement à la protéine d'intérêt.

Anticorps secondaire

Anticorps qui se fixe à un anticorps primaire. Cet anticorps est habituellement marqué.

Antigène

Structure présente à la surface de la molécule d'antigène, capable de se combiner à une seule molécule d'anticorps [OQLF, 2007].

ARN messager

Molécule d'acide ribonucléique transcrite à partir de l'acide désoxyribonucléique (ADN) d'un gène, et qui sert de modèle pour la traduction d'une protéine par l'action des ribosomes [OQLF, 2007].

Biais de sélection

Erreur systématique induite dans une étude à cause des méthodes adoptées pour choisir les participants à l'étude [Beaucage *et al.*, 1996].

Biais de vérification

Erreur systématique induite dans une étude lorsque le résultat d'un examen diagnostique influence la décision d'effectuer ou non l'examen de référence [Beaucage *et al.*, 1996].

Centromère

Point par lequel les chromosomes s'attachent au fuseau [OQLF, 2007].

Coupe

Méthode employée en histologie pour obtenir des prélèvements suffisamment minces pour, d'une part être transparents aux rayons lumineux du microscope optique et, d'autre part ne comporter en principe qu'une seule couche cellulaire [OQLF, 2007].

Déterminant antigénique

Structure présente à la surface de la molécule d'antigène, capable de se combiner à une seule molécule d'anticorps. Synonyme : épitope [OQLF, 2007].

Échantillon de convenance

Échantillon constitué d'individus sélectionnés par les chercheurs de façon non aléatoire. Synonyme : échantillon électif [Beaucage *et al.*, 1996].

Épitope

Structure présente à la surface de la molécule d'antigène, capable de se combiner à une seule molécule d'anticorps. Synonyme : déterminant antigénique [OQLF, 2007].

Hybridation *in situ*

Hybridation d'une sonde d'ADN ou d'ARN spécifique marquée avec l'ARN ou l'ADN cellulaire, sur une coupe de tissu ou des cellules fixées [OQLF, 2007].

Hybridation *in situ* fluorescente

Technique de cartographie génétique permettant de repérer une séquence d'ADN ou d'ARN au moyen d'une sonde de séquence spécifique complémentaire à celle qui est recherchée, dans laquelle l'hybridation est révélée par un signal fluorescent [OQLF, 2007].

Immunohistochimie

Branche de l'histologie utilisant des techniques d'immunofluorescence ou de révélation des antigènes intracellulaires par des anticorps marqués par des enzymes (peroxydase en général) pour détecter des molécules définies à l'intérieur de cellules fixées. Synonyme : biomarqueur [OQLF, 2007].

Marqueur biologique

Paramètre d'origine biologique qui constitue l'indicateur d'un processus normal, d'un processus pathologique ou encore d'une réponse à un traitement pharmacologique ou thérapeutique, et qui permet de distinguer un état physiologique normal d'un état anormal [OQLF, 2007].

Mesure d'accord kappa

Mesure du degré d'accord non attribuable au hasard, soit entre différents observateurs (accord interobservateurs), soit chez un même observateur qui apprécie le même phénomène à plusieurs reprises (accord intra-observateur) [Beaucage *et al.*, 1996].

Microdissection au laser

Technique qui, à l'aide d'un microscope couplé à un faisceau laser contrôlé par système informatique, permet de découper et de capturer une région tissulaire bien précise (voire une ou plusieurs cellules) sur une coupe histologique en vue d'effectuer des analyses moléculaires.

Micromatrice tissulaire

Bloc de paraffine dans lequel sont alignés plusieurs fragments tissulaires différents pour permettre une analyse histologique simultanée. Synonymes : micromatrice de tissus ou puce à tissus.

Monosomie

État résultant de la perte d'un chromosome entier, se traduisant par la présence dans une cellule diploïde d'un seul des deux chromosomes correspondant à une paire déterminée [OQLF, 2007].

Moyenne pondérée

Mesure statistique moyenne ajustée pour la taille de chacun des échantillons qui constituent la base du calcul.

Polyploïde

Se dit de cellules dont le nombre des chromosomes est un multiple du nombre normal [OQLF, 2007].

Polysomie

Constitution génétique caractérisée par l'existence d'un ou plusieurs chromosomes supplémentaires par rapport à l'ensemble normal pair [OQLF, 2007].

Réaction en chaîne de la polymérase

Procédé d'amplification enzymatique *in vitro* d'une séquence définie d'ADN [OQLF, 2007].

Sensibilité

Critère de performance d'un test diagnostique mesurant sa capacité à détecter une maladie (ou un problème de santé) lorsqu'elle est vraiment présente. La sensibilité est la proportion de tous les malades dont le résultat du test est positif, calculée ainsi : $[\text{vrais positifs} \div (\text{vrais positifs} + \text{faux négatifs})]$.

Sonde d'ADN

Fragment d'acide nucléique capable de se lier de façon complémentaire à une région chromosomique spécifique et qui a la propriété d'être facilement repérable grâce à l'adjonction d'un marqueur (enzyme, composé radioactif ou fluorescent). Synonyme : sonde nucléique.

Spécificité

Critère de performance d'un test diagnostique mesurant sa capacité à exclure une maladie (ou un problème de santé) lorsqu'elle est vraiment absente. La spécificité est la proportion de personnes saines dont le résultat du test est négatif, calculée ainsi : $[\text{vrais négatifs} \div (\text{vrais négatifs} + \text{faux positifs})]$.

Substrat

Substance transformée en un ou plusieurs produits par une activité enzymatique [OQLF, 2007].

Surexpression protéique

Production d'une protéine en quantité anormalement élevée dans une cellule.

Test de référence

Test largement admis comme le meilleur et qui devrait servir de référence pour comparer les autres.
Synonymes : test étalon ou étalon or.

Test étalon

Synonymes : test de référence ou étalon or.

Valeur pondérée

Se définit comme la valeur relative associée à chacune des procédures. La valeur pondérée est une valeur qui reflète le niveau relatif de ressources nécessaires pour sa réalisation. Le calcul de la valeur pondérée tient compte des manipulations, des contrôles, des calibrations et des répétitions devant être effectués pour la réalisation de la procédure. Les éléments de calcul sont les suivants : le temps d'exécution, le temps de soutien à l'exécution, le temps rémunéré non travaillé, le coût des réactifs et les taxes.

Valeur prédictive négative

Probabilité qu'une personne ayant obtenu un résultat négatif d'un test diagnostique ne soit pas malade, calculée ainsi : $[\text{vrais négatifs} \div (\text{vrais négatifs} + \text{faux négatifs})]$.

Valeur prédictive positive

Probabilité qu'une personne ayant obtenu un résultat positif d'un test diagnostique soit malade, calculée ainsi : $[\text{vrais positifs} \div (\text{vrais positifs} + \text{faux positifs})]$.

TABLE DES MATIÈRES

LA MISSION	i
PRÉFACE	ii
L'AVIS EN BREF	iii
REMERCIEMENTS.....	iv
RÉSUMÉ	vi
ABRÉVIATIONS ET ACRONYMES.....	xi
GLOSSAIRE.....	xiii
1 INTRODUCTION.....	1
2 CONTEXTE GÉNÉRAL	2
2.1 HER-2	2
2.2 Trastuzumab.....	2
2.3 Techniques diagnostiques	3
2.3.1 Immunohistochimie.....	3
2.3.2 Hybridation <i>in situ</i>	5
2.3.3 Réaction en chaîne de la polymérase	9
2.3.4 Test de référence.....	9
2.4 Lignes directrices.....	9
2.4.1 Techniques et algorithmes	9
2.4.2 Nombre minimal de tests requis par laboratoire	10
2.4.3 Validation des tests	11
2.4.4 Assurance qualité interne et externe.....	11
2.5 Techniques utilisées au Québec	11
3 MÉTHODE DE RECHERCHE	13
3.1 Objectifs.....	13
3.2 Recherche documentaire.....	13
3.3 Critères d'inclusion et d'exclusion	13
3.4 Analyses.....	15
4 RÉSULTATS	16
4.1 Immunohistochimie	16
4.1.1 Distribution des scores d'IHC	16
4.1.2 Proportion de résultats FISH positifs par score d'IHC.....	17
4.1.3 Performance diagnostique de l'IHC en référence au FISH.....	18
4.1.4 Concordance entre l'IHC et le FISH selon le lieu d'exécution (local <i>versus</i> central)	19
4.1.5 En résumé, pour la comparaison de l'IHC et du FISH.....	19
4.2 Hybridation <i>in situ</i> chromogénique	19
4.2.1 Performance diagnostique du CISH en référence au FISH.....	19
4.2.2 Concordance entre le CISH et le FISH par score d'IHC.....	22
4.2.3 Proportion de résultats CISH positifs par score d'IHC	22
4.2.4 En résumé, pour le CISH.....	24
4.3 Hybridation <i>in situ</i> argentique	24
4.4 Réaction en chaîne de la polymérase en temps réel.....	25

4.5	Variabilité interobservateurs	26
4.5.1	IHC	26
4.5.2	FISH	29
4.5.3	CISH	29
4.5.4	SISH	30
4.5.5	En résumé, pour la variabilité interobservateurs des tests.....	30
4.6	Reproductibilité interlaboratoires	30
4.6.1	IHC	30
4.6.2	FISH	32
4.6.3	CISH	33
4.6.4	En résumé, pour la reproductibilité interlaboratoires des tests	34
5	DISCUSSION	35
6	CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS	42
6.1	Conclusions.....	42
6.2	Recommandations.....	44
ANNEXE A	ALGORITHMES DÉCISIONNELS.....	45
ANNEXE B	STRATÉGIES DE RECHERCHE DOCUMENTAIRE	50
ANNEXE C	LISTE DES ÉTUDES EXCLUES ET RAISONS D'EXCLUSION	54
ANNEXE D	RÉSULTATS	58
ANNEXE E	RÉSUMÉS DES ÉTUDES INCLUSES	63
RÉFÉRENCES		101

LISTE DES TABLEAUX ET DES FIGURES

Tableau 1	Critères d'interprétation du test d'IHC	4
Tableau 2	Interprétation d'un résultat du test FISH	6
Tableau 3	Guide d'interprétation du test CISH	7
Tableau 4	Distribution des scores d'IHC selon l'anticorps utilisé	17
Tableau 5	Proportion de résultats FISH positifs par score d'IHC selon l'anticorps utilisé	18
Tableau 6	Performance du CISH à détecter les cas d'amplification au FISH	20
Tableau 7	Performance du CISH en référence au FISH selon l'interprétation	21
Tableau 8	Concordance entre le CISH et le FISH par score d'IHC	22
Tableau 9	Proportion de résultats CISH positifs par score d'IHC	23
Tableau 10	Proportion de résultats CISH positifs par score d'IHC selon l'anticorps utilisé	24
Tableau 11	Performance du SISH à détecter les cas d'amplification au FISH	25
Tableau 12	Performance du PCR en temps réel à détecter les cas d'amplification au FISH	26
Tableau 13	Variabilité interobservateurs de l'IHC	27
Tableau 14	Proportion de résultats d'IHC obtenus dans des laboratoires locaux concordant avec ceux d'un laboratoire central	31
Tableau C-1	Liste des études exclues et raisons d'exclusion par comparaison ou objectif d'évaluation	54

Tableau D-1	Distribution des scores d'IHC dans une population de cas de cancer du sein.....	58
Tableau D-2	Proportion de résultats FISH positifs par score d'IHC.....	59
Tableau D-3	Proportion de résultats FISH positifs par score d'IHC 0 et 1+.....	60
Tableau D-4	Performance de l'IHC à détecter les cas d'amplification au FISH.....	61
Tableau D-5	Proportion de résultats FISH positifs par score d'IHC selon le lieu d'exécution des tests.....	62
Tableau D-6	Performance du RT-PCR en temps réel à détecter les cas d'amplification au FISH	62
Tableau D-7	Proportion de résultats FISH positifs par score d'IHC obtenue dans trois revues systématiques et méta-analyses	62
Tableau E-1	Résumé des études incluses dans la présente revue systématique.....	63
Figure A-1	Algorithme de l'ASCO/CAP pour l'évaluation du statut HER-2 – IHC comme test initial	45
Figure A-2	Algorithme de l'ASCO/CAP pour l'évaluation du statut HER-2 – FISH comme test initial	46
Figure A-3	Algorithme consensuel canadien pour l'évaluation du statut HER-2.....	47
Figure A-4	Algorithme de la Commission européenne pour l'évaluation du statut HER-2.....	48
Figure A-5	Processus décisionnel (non consensuel) utilisé par plusieurs laboratoires québécois pour l'évaluation du statut HER-2.....	49

Selon une estimation de la Société canadienne du cancer (SCC) et de l'Institut national du cancer du Canada, on prévoyait 5 900 nouveaux cas de cancer du sein pour l'année 2007 au Québec et près de 1 400 décès. Malgré une baisse des taux de mortalité par cancer du sein dans tous les groupes d'âge, celui-ci constitue la deuxième cause de décès par cancer chez la femme, après le cancer du poumon, et demeure la première cause de mortalité par cancer chez les femmes de moins de 50 ans [SCC, 2007].

Dans le cancer du sein, le statut HER-2 (*Human Epidermal growth factor Receptor 2*) est un marqueur biologique dont la positivité est associée à un mauvais pronostic [Lee *et al.*, 2007; Slamon *et al.*, 1987]. La surexpression (ou présence anormalement élevée) de la protéine HER-2 à la surface des cellules tumorales, souvent associée à l'amplification (augmentation du nombre de copies par chromosome) du gène HER-2, caractérise un statut HER-2 positif. La prévalence de l'amplification génique atteindrait 18 à 20 % chez les femmes atteintes d'un cancer du sein [Wolff *et al.*, 2007].

Le trastuzumab, commercialisé sous le nom de Herceptin®, est un anticorps monoclonal humanisé développé spécifiquement pour cibler la protéine HER-2 [Hofmann *et al.*, 2007; Willems *et al.*, 2005]. En juillet 2005, le Québec annonçait que ce médicament, dont le coût est estimé à environ 45 000 \$ [Letarte, 2007] par patiente, serait couvert par le régime provincial pour le traitement adjuvant du cancer du sein [PGTM, 2005]. Cette thérapie est toutefois uniquement indiquée pour les femmes qui présentent un statut HER-2 positif. Dans le but de déterminer leur admissibilité au trastuzumab, il est recommandé que toutes les femmes atteintes d'un cancer du sein infiltrant soient testées au moment du diagnostic; c'est maintenant la norme de pratique [ASCO et CAP, 2007; Hanna *et al.*, 2007a; NCCN, 2007]. Le coût élevé associé à ce médicament ainsi que son risque de cardiotoxicité exigent que le statut HER-2 soit déterminé avec le plus d'exactitude possible.

Il existe actuellement une controverse quant à la meilleure stratégie pour déterminer le statut HER-2. Les deux tests les plus utilisés sont l'immunohistochimie (IHC) et l'hybridation *in situ* fluorescente (FISH) [Dowsett *et al.*, 2007b; Penault-Llorca et Cayre, 2004]. Le FISH serait plus fiable mais s'avérerait plus coûteux et laborieux. Ces deux techniques sont donc souvent utilisées selon un algorithme qui définit l'IHC comme examen de première ligne et le FISH comme test visant à confirmer les cas équivoques. D'autres techniques d'hybridation *in situ* (CISH et SISH) sont maintenant disponibles, mais leur utilisation ne fait pas l'objet d'un consensus international. Quant à la réaction en chaîne de la polymérase (PCR), il s'agit d'une méthode de biologie moléculaire surtout utilisée en recherche qui a fait l'objet de plusieurs publications liées à l'évaluation du statut HER-2. Elle serait utilisée comme test de validation hors province.

Compte tenu de l'importance du statut HER-2 dans la prise de décisions thérapeutiques et des enjeux cliniques et économiques associés à l'administration du trastuzumab chez des femmes ayant un résultat faux positif ou faux négatif, il apparaît essentiel de réaliser une évaluation comparative des méthodes diagnostiques utilisées pour déterminer le statut HER-2 d'une tumeur. Telle est la demande qui a été formulée à l'AETMIS par le Comité de l'évolution des pratiques en oncologie (CEPO). Le présent rapport constitue donc une revue systématique de la littérature au sujet de la performance diagnostique de ces techniques. Cette revue pourrait servir d'assise aux membres du CEPO pour l'élaboration de lignes directrices de pratique clinique pour le Québec.

Le présent chapitre définit d'abord ce qu'est le statut HER-2 et aborde ensuite le traitement au trastuzumab, les techniques diagnostiques les plus utilisées pour déterminer l'admissibilité des patientes à cette thérapie, les lignes directrices canadiennes et internationales, ainsi que l'utilisation au Québec des différentes techniques au regard du diagnostic du statut HER-2.

2.1 HER-2

L'oncogène HER-2/neu situé sur le chromosome 17 code pour une protéine transmembranaire (c-erbB-2, erbB2 ou HER-2) possédant une activité tyrosine kinase. Dans ce document, le terme HER-2 est utilisé pour désigner le gène comme la protéine. Cette protéine de surface est un des quatre membres de la famille du récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR), dont les ligands jouent un rôle dans les processus de signalisation intracellulaire qui régulent la prolifération, la différenciation et la survie cellulaire [Blaizel *et al.*, 2006; Carlson *et al.*, 2006; Lebeau, 2006]. La protéine HER-2 est faiblement exprimée dans les cellules épithéliales du sein normal [Penault-Llorca *et al.*, 2002] et dans une variété d'autres tissus tels que les ovaires, les reins, le tractus gastro-intestinal, le cœur et le système nerveux central [Laudadio *et al.*, 2007; Carlson *et al.*, 2006].

Dans les carcinomes mammaires, cette région du chromosome 17 est susceptible de subir des réarrangements [Popescu *et al.*, 1989 dans Tawfik *et al.*, 2006] menant à une amplification (augmentation du nombre de copies) du gène HER-2 par chromosome. Cette altération entraîne une augmentation des niveaux d'ARN messager (ARNm) intracellulaire et une surexpression de la protéine HER-2 à la surface des cellules [Corzo *et al.*, 2007; Kostopoulou *et al.*, 2007; Wolff *et al.*, 2007; Lebeau, 2006]. On estime que l'amplification du gène HER-2 survient approximativement chez 18 à 20 % des cas de cancer du sein [ASCO et CAP, 2007; Tubbs *et al.*, 2007] et qu'elle serait le mécanisme principal pour expliquer la surexpression de la protéine HER-2 [Wolff *et al.*, 2007].

Un statut HER-2 positif (une surexpression ou une amplification de HER-2) est associé à une tumeur plus agressive, une incidence élevée des métastases, un risque accru de récurrence après la chirurgie, un temps de survie réduit, une résistance à certaines thérapies endocrines (hormonales) et une réponse incomplète à la chimiothérapie conventionnelle [ASCO et CAP, 2007; Laudadio *et al.*, 2007; Blaizel *et al.*, 2006; Enzing *et al.*, 2006; Lebeau, 2006].

2.2 Trastuzumab

Le trastuzumab, commercialisé sous le nom de Herceptin® (Roche Ltd, Bâle, Suisse), est un anticorps monoclonal humanisé recombinant qui a pour cible la portion extracellulaire (ou extracytoplasmique) du récepteur HER-2 [Willems *et al.*, 2005]. L'anticorps inhibe l'activité tyrosine kinase et la prolifération des cellules tumorales surexprimant la protéine HER-2 à leur surface [Laudadio *et al.*, 2007]. En 1998, la Food and Drug Administration (FDA) des États-Unis approuvait pour la première fois ce médicament pour le traitement des femmes atteintes d'un cancer du sein métastatique HER-2 positif [ASCO et CAP, 2007; Enzing *et al.*, 2006]. Ce traitement a aussi été approuvé au Canada et en Europe en 1999 [PGTM, 2005] et en 2000 [Enzing *et al.*, 2006], respectivement.

Plus récemment, l'utilisation du trastuzumab a démontré des bénéfices cliniques importants pour le traitement adjuvant des femmes atteintes d'un cancer du sein de stade précoce présentant un statut HER-2 positif. Les bénéfices associés incluaient entre autres une réduction substantielle du risque de récurrence, une amélioration du taux de survie sans maladie et une survie globale prolongée [ASCO et CAP, 2007; Smith *et al.*, 2007; Romond *et al.*, 2005; Slamon *et al.*, 2005].

Le traitement s'échelonne sur une année à raison d'une administration par semaine ou aux trois semaines [NCCN, 2007]. En plus d'être très coûteux (environ 45 000 \$ par patiente) [Letarte, 2007], le trastuzumab entraîne un risque de cardiotoxicité. En effet, une dysfonction cardiaque asymptomatique survient chez 5 à 15 % des patientes et une insuffisance cardiaque congestive chez 2 à 4 % d'entre elles [ASCO et CAP, 2007]. La thérapie au trastuzumab nécessite donc une surveillance périodique de la fonction cardiaque [NCCN, 2007; CEPO, 2005].

Le statut HER-2 des patientes doit être vérifié avant l'administration du médicament [PGTM, 2005], puisque seules les tumeurs présentant une surexpression de la protéine ou une amplification du gène HER-2 sont susceptibles de répondre à la thérapie [Wolff *et al.*, 2007].

2.3 Techniques diagnostiques

Il existe plusieurs analyses disponibles pour déterminer soit le niveau d'expression de la protéine HER-2, le nombre de copies du gène ou le niveau d'ARN messager dans les cellules tumorales. Les cinq techniques les plus susceptibles d'être utilisées en clinique sont décrites aux sections suivantes (2.3.1 à 2.3.3). D'autres techniques également disponibles (ELISA, transfert en points, transferts de Western, de Northern et de Southern, etc.) ne font pas l'objet du présent document en raison de leur moindre applicabilité au contexte clinique. Ces techniques requièrent d'autres types d'échantillons que les blocs de tumeurs fixées et incluses en paraffine utilisés de routine dans les laboratoires de pathologie [Ciampa *et al.*, 2006; Yaziji *et al.*, 2002].

2.3.1 Immunohistochimie

L'immunohistochimie (IHC) est une technique d'histologie qui utilise des anticorps généralement marqués par des enzymes pour détecter la présence d'une molécule d'intérêt. Dans le cancer du sein, l'IHC est entre autres utilisée pour évaluer le niveau d'expression de la protéine HER-2. Elle consiste d'abord à incuber des coupes histologiques en présence d'un anticorps primaire spécifiquement dirigé contre un déterminant antigénique (épitope) de la protéine HER-2. L'anticorps fixé à la protéine est ensuite reconnu par un anticorps secondaire conjugué à une enzyme : la peroxydase ou, plus rarement, la phosphatase alcaline. La conversion enzymatique d'un chromogène (le plus souvent, le DAB pour 3,3'-diaminobenzidine) ajouté ultérieurement permet de révéler la réaction en formant un précipité visible au microscope ordinaire à fond clair au site de l'antigène (membrane cellulaire) [Dako, 2004].

L'évaluation des cellules tumorales doit porter uniquement sur la composante infiltrante du carcinome, puisque les carcinomes canaux *in situ* surexpriment fréquemment la protéine HER-2 même lorsque la composante infiltrante du carcinome est négative [ASCO et CAP, 2007; Schlemmer *et al.*, 2004; Dowsett *et al.*, 2003], d'où le rôle essentiel de l'anatomopathologiste dans l'interprétation des lames. L'échelle semi-quantitative (0 à 3+) utilisée pour l'interprétation de l'IHC repose à la fois sur l'intensité et la qualité du marquage membranaire et sur le pourcentage des cellules tumorales positives; un score 3+ indique la plus forte expression protéique (tableau 1)

[Hanna *et al.*, 2007a]. L'interprétation de l'IHC est subjective et est donc sujette à une variabilité interobservateurs [Dendukuri et Brophy, 2006; Hicks et Tubbs, 2005].

TABEAU 1

Critères d'interprétation du test d'IHC	
SCORE	INTERPRÉTATION
0	Négatif. Aucune coloration membranaire.
1+	Négatif. Coloration membranaire faible et* incomplète, sans égard à la proportion de cellules tumorales marquées.
2+	Équivoque. Coloration membranaire intense et complète (motif de diffraction) de $\leq 30\%$ des cellules tumorales, ou coloration membranaire hétérogène et complète, faible ou modérée de $\geq 10\%$ des cellules tumorales.
3+	Positif. Coloration membranaire intense, complète et homogène (motif de diffraction) de $> 30\%$ des cellules tumorales.

* La version française de la brochure de renseignements techniques [Hanna *et al.*, 2007b] comprend une erreur de traduction. Ainsi, il faut lire « et » au lieu de « ou ».

Source : Hanna *et al.*, 2007a; 2007b.

Il existe une trentaine d'anticorps primaires disponibles pour évaluer l'expression de la protéine HER-2 [Hanna, 2001], chacun reconnaissant un épitope différent. Les plus utilisés sont l'anticorps polyclonal A0485 et les anticorps monoclonaux CB11 et TAB250 [Ellis *et al.*, 2004; Hanna et O'Malley, 2002]. La variabilité des résultats d'IHC est entre autres associée au choix de l'anticorps [Laudadio *et al.*, 2007; Carlson *et al.*, 2006] et au protocole technique utilisé. Le protocole d'IHC doit être calibré (dilution de l'anticorps, démasquage antigénique, temps d'incubation, etc.) pour prendre en compte l'immunoréactivité de l'anticorps choisi [Vincent-Salomon *et al.*, 2003]. Il est reconnu que les techniques utilisées varient beaucoup d'un laboratoire à l'autre [Carlson *et al.*, 2006], ce qui compromet la reproductibilité interlaboratoires de l'IHC.

Des trousse de réactifs prêts à l'emploi incluant des lames témoins (positif et négatif) sont également commercialisées et permettent de contrôler dans une certaine mesure les difficultés de standardisation de la technique [Penault-Llorca et Cayre, 2004]. La plus connue et utilisée est la trousse HercepTest™ (Dako, Danemark) qui inclut l'anticorps A0485.

Outre le protocole technique lui-même, d'autres facteurs préanalytiques viennent affecter l'immunoréactivité et donc les résultats d'IHC [Hicks et Tubbs, 2005]. Ces facteurs incluent le délai entre le prélèvement de l'échantillon et la fixation du tissu, le choix du fixateur et le temps de fixation [Carlson *et al.*, 2006]. Des lignes directrices ont d'ailleurs récemment été publiées à cet effet [Hanna *et al.*, 2007a; 2007b; Wolff *et al.*, 2007].

Malgré la multitude de facteurs analytiques pouvant affecter la reproductibilité interlaboratoires d'un test d'IHC, de nombreux avantages lui sont conférés, notamment sa rapidité, sa simplicité et son faible coût. Le répertoire québécois et système de mesure des procédures de biologie médicale attribue à un test d'IHC effectué pour la protéine HER-2 une valeur pondérée¹ de 73,0 [MSSS, 2008]. Le test peut être effectué en quelques heures et interprété la journée même en moins d'une minute. Les honoraires

1. Voir le glossaire pour la définition de « valeur pondérée ».

de facturation d'un anatomopathologiste pour la lecture d'un test d'IHC est de 26,30 \$². Le coût des réactifs d'une trousse standardisée HercepTest™ est de 54 \$ par test. Celui d'un test « maison » serait toutefois moins élevé. Il varierait entre 20 et 40 \$ selon les laboratoires québécois. Pour toutes ces raisons, l'IHC est le test le plus utilisé en première intention pour déterminer l'admissibilité des patientes au trastuzumab. Les résultats équivoques doivent toutefois être contrôlés par une méthode d'hybridation *in situ* (ISH).

2.3.2 Hybridation *in situ*

L'hybridation *in situ* (ISH) est une technique qui, de façon générale, permet d'identifier la présence de chromosomes ou de régions chromosomiques spécifiques grâce à l'hybridation (appariement) de sondes d'ADN marquées à l'ADN chromosomique préalablement dénaturé sur des coupes histologiques. Elle permet de détecter une amplification du gène HER-2 dans des tissus tumoraux. Il existe divers types d'ISH, chacune utilisant un système particulier de détection (visualisation) des sondes (fluorescence, colorimétrie, métallographie).

2.3.2.1 Hybridation *in situ* fluorescente

L'hybridation *in situ* fluorescente (FISH) est une technique d'ISH qui utilise des sondes d'ADN marquées d'un fluorochrome. Le protocole technique se déroule sur deux jours séparés par une nuit d'hybridation. La visualisation des sondes hybridées, représentées par des points fluorescents dans le noyau des cellules, est possible uniquement par microscopie à fluorescence. Cet équipement est coûteux et non disponible dans tous les laboratoires de pathologie.

Dans le cas d'une recherche d'amplification du gène HER-2, la technique implique généralement l'utilisation de deux sondes : une spécifique au gène HER-2 et l'autre spécifique au centromère du chromosome 17, chacune étant marquée d'un fluorochrome différent. La sonde centromérique joue un rôle de contrôle interne pour l'aneusomie, un phénomène caractérisé par l'addition (polysomie) ou la délétion (monosomie) de copies du chromosome 17 dans une cellule [Carlson *et al.*, 2006]. La sur-représentation du gène HER-2 par polysomie 17 ne constitue pas une amplification véritable [Penault-Llorca et Cayre, 2004]. Tubbs et ses collaborateurs [2007] ont estimé que ce phénomène est présent chez 3 % des cancers du sein³. L'interprétation du FISH repose donc sur le rapport entre le nombre moyen de copies du gène HER-2 et le nombre moyen de copies du centromère du chromosome 17 par noyau (rapport HER-2/CEP17). Toutefois, certaines trousse commercialisées n'incluent que la sonde spécifique au gène HER-2, l'interprétation reposant alors uniquement sur le nombre moyen de copies par cellule du gène HER-2.

On doit généralement compter un minimum de 20 noyaux dans deux zones différentes [Wolff *et al.*, 2007]. Comme le présente le tableau 2, un résultat de FISH peut être défini comme clairement négatif, clairement positif ou équivoque. Un résultat équivoque nécessitera le comptage de signaux additionnels ou la reprise du test

2. Régie de l'assurance maladie du Québec (RAMQ). Manuel des médecins spécialistes : services de laboratoire en établissement (n° 170). Anatomo-pathologie. Disponible à : http://www.ramq.gouv.qc.ca/fr/professionnels/manuels/170/010_a_anatomo_patho_sle_spec.pdf.

3. L'ASCO/CAP ont quant à eux rapporté une prévalence de 8 % [Wolff *et al.*, 2007]. La prévalence et la définition de la polysomie 17 varient beaucoup d'une étude à l'autre. La majorité des études comportent d'importants biais de sélection des patientes, ce qui invalide l'estimation de cette proportion. Les études qui, comme celle de Tubbs et ses collaborateurs [2007], ont estimé la prévalence sur une grande série de cas de cancer du sein primitif provenant d'un seul établissement et évalués initialement par FISH sont rares.

[Hanna *et al.*, 2007a]. L'admissibilité au trastuzumab des cas ayant obtenu un résultat équivoque au FISH ne peut être déterminée que par un rapport HER-2/CEP17 et n'est reconnue que si ce rapport est égal ou supérieur à 2,0⁴.

TABEAU 2

Interprétation d'un résultat du test FISH	
RÉSULTAT	INTERPRÉTATION
Rapport HER-2/CEP17 < 1,8 ou nombre moyen de copies de HER-2 < 4	Négatif
Rapport HER-2/CEP17 entre 1,8 et 2,2 ou nombre moyen de copies de HER-2 de 4 à 6, inclusivement	Équivoque
Rapport HER-2/CEP17 > 2,2 ou nombre moyen de copies de HER-2 > 6	Positif

Bien que la nature quantitative du test rende l'interprétation moins sujette à une variabilité interobservateurs [Hofmann *et al.*, 2007], il n'en demeure pas moins que l'interprétation du FISH nécessite une formation. Dans un premier temps, comme la morphologie tissulaire ne peut pas être examinée de façon simultanée lors de l'examen en fluorescence, le repérage de zones invasives du carcinome doit se faire au préalable sur une autre lame colorée de façon standard. Il faut s'assurer que la zone sélectionnée correspond à celle qui sera examinée ultérieurement en fluorescence. Une bonne expérience est également nécessaire pour reconnaître l'aspect des cellules contre-colorées au DAPI⁵ et la présence d'éventuelles anomalies (noyaux cellulaires tronqués, autofluorescence, etc.) attribuables à des problèmes techniques survenus au cours de la préparation des lames (sur- ou sous-digestion enzymatique) [Hicks et Tubbs, 2005; Penault-Llorca et Cayre, 2004; Bilous *et al.*, 2003a]. Au besoin, l'étape de digestion enzymatique qui précède l'hybridation des sondes devra être ajustée.

Selon l'expérience de l'observateur, le nombre de noyaux et de signaux à calculer, ainsi que la qualité du microscope à fluorescence, la lecture d'une lame exige entre 15 et 25 minutes d'observation. Le tout se déroule dans l'obscurité et une fatigue oculaire peut s'installer rapidement. Les signaux fluorescents s'atténuent avec le temps et les lames ne peuvent donc pas être archivées pour une longue période. Des clichés peuvent être pris mais, comme ils ne portent que sur une partie de la lame, ils ne permettent pas toujours une réévaluation adéquate de celle-ci [Tubbs *et al.*, 2004].

Le FISH est coûteux en matière d'équipement (microscope à fluorescence et filtres adaptés), de réactifs, de temps technique et d'interprétation. Au Canada, il en coûte 8 127,87 \$ pour une trousse PathVysion® contenant les sondes HER-2 et CEP17 pour 50 tests (162,56 \$ par test)⁶. Par contre, les laboratoires arrivent tout de même à faire au moins deux fois plus de tests que le nombre prévu par le fabricant en n'hybridant qu'une partie de la lame et en utilisant ainsi moins de réactifs⁷. À cela doivent s'ajouter les trousse de pré-traitement des lames, le temps technique ainsi que l'interprétation par l'anatomopathologiste (47,30 \$⁸). Le répertoire québécois et système de mesure des

4. Les patientes présentant un rapport HER-2/CEP17 $\geq 2,0$ étaient admises dans les essais cliniques sur le traitement adjuvant par le trastuzumab [Hanna *et al.*, 2007b; Wolff *et al.*, 2007]. Les données disponibles ne peuvent donc pas supporter leur exclusion pour la thérapie au trastuzumab [Wolff *et al.*, 2007].

5. Le DAPI/PI est le contre-colorant utilisé sur les lames à examiner en fluorescence.

6. M^{me} Nancy Roberge, biochimiste (B. Sc.), CRHDQ, communication personnelle, 7 septembre 2007.

7. Il faudrait toutefois s'assurer que cette façon de faire n'a pas d'impact sur la qualité des tests FISH.

8. Régie de l'assurance maladie du Québec (RAMQ). Manuel des médecins spécialistes : services de laboratoire en établissement (n° 170). Anatomopathologie. Disponible à : http://www.ramq.gouv.qc.ca/fr/professionnels/manuels/170/010_a_anatomo_patho_sle_spec.pdf.

procédures de biologie médicale accorde au FISH une valeur pondérée⁹ de 153,0 [MSSS, 2008], soit un peu plus du double de celle de l'IHC.

2.3.2.2 Hybridation *in situ* chromogénique

L'hybridation *in situ* chromogénique (CISH) est une méthode plus récente d'analyse de l'amplification du gène HER-2. De façon similaire au FISH, la technique consiste à hybrider des sondes d'acide nucléique à l'ADN chromosomique du gène HER-2 sur des coupes histologiques [Bhargava *et al.*, 2005]. Le système de révélation consiste toutefois en une réaction immunoenzymatique semblable à celle utilisée en IHC. Le plus souvent, on utilise une sonde HER-2 marquée à la digoxigénine (DIG) à laquelle vient se fixer un anticorps anti-DIG conjugué à une peroxydase de raifort (HRP). La conversion d'un substrat chromogène (DAB) par la peroxydase entraîne la formation permanente de points bruns foncés dans le noyau de la cellule. Comme les signaux d'hybridation peuvent être observés par microscopie à fond clair, la technique est avantageuse. L'anatomopathologiste peut ainsi procéder à l'examen simultané de la morphologie des tissus (contre-colorés à l'hématoxyline) tout en repérant les zones d'intérêt. L'inconvénient majeur de la technique tient au fait que l'interprétation repose avant tout sur le nombre moyen de signaux ou copies du gène HER-2 par noyau et non sur le rapport HER-2 par chromosome 17.

Une seule trousse standardisée est disponible, incluant tous les réactifs et lames témoins. Elle est commercialisée sous le nom Zymed® SPoT-Light® HER2 CISH™ Kit (Invitrogen, South San Francisco, CA, États-Unis). Le guide d'interprétation est présenté au tableau 3.

TABEAU 3

Guide d'interprétation du test CISH		
RÉSULTAT	INTERPRÉTATION*	
Amplification	Élevée	> 10 points, ou agrégats importants, ou mélange de points multiples et d'agrégats importants du gène HER-2 présents par noyau dans > 50 % des cellules cancéreuses
	Faible	> 5-10 points, ou petits agrégats, ou mélange de points multiples et de petits agrégats du gène HER-2 présents par noyau dans > 50 % des cellules cancéreuses
Pas d'amplification	Polysomie	3-5 points du gène HER-2 présents par noyau dans > 50 % des cellules cancéreuses
	Diploïde	1-2 points du gène HER-2 présents par noyau dans > 50 % des cellules cancéreuses

* Au fil du temps, le fabricant a modifié son guide d'interprétation. Initialement, une amplification était définie par la présence de ≥ 6 copies du gène HER-2 par noyau [Bilous *et al.*, 2006].

Il est nécessaire d'évaluer un minimum de 30 cellules tumorales. Si le nombre moyen de points par noyau est compris entre cinq et six, il faut évaluer 30 cellules supplémentaires.

Source : Zymed Laboratoires [2007].

Pour les tumeurs comportant une polysomie du chromosome 17 (généralement celles ayant de trois à cinq signaux HER-2 par noyau), il est suggéré de procéder à une seconde réaction d'hybridation, à l'aide d'une sonde centromérique du chromosome 17, pour confirmer ou distinguer une polysomie d'une amplification faible. Cette réaction doit être réalisée sur une coupe adjacente (deuxième lame), ce qui implique que les mêmes cellules ne peuvent pas toujours être évaluées [Loring *et al.*, 2005]. Pour les cas présentant une amplification élevée (> 10 signaux ou gros agrégats), l'utilisation d'une sonde centromérique n'est pas nécessaire [Zymed Laboratories, 2005].

9. Voir le glossaire pour la définition de « valeur pondérée ».

Lorsque la réaction d'hybridation est limitée à une sonde, le CISH est moins coûteux que le FISH. Le prix d'un test CISH serait d'environ le quart de celui d'un FISH [Nistor *et al.*, 2006]. Au Canada, la trousse complète Zymed® HER2 CISH™ (20 tests) coûterait 1 543,77 \$, soit 77,19 \$ par test¹⁰. Le temps d'interprétation est également réduit de 25 à 50 %¹¹. Bhargava et ses collaborateurs [2005] prétendent que le temps d'interprétation est réduit de plus de moitié. Par ailleurs, même si le protocole technique du CISH nécessite un peu plus d'étapes et de manipulations que celui du FISH, la technique peut être réalisée en deux jours [Cayre *et al.*, 2007; Bhargava *et al.*, 2005]. Le répertoire québécois et système de mesure des procédures de biologie médicale attribue au CISH une valeur pondérée¹² de 75,0 [MSSS, 2008], c'est-à-dire environ l'équivalent de l'IHC.

2.3.2.3 Hybridation *in situ* argentique

Le test d'hybridation *in situ* argentique ou SISH (pour *silver-enhanced in situ hybridization*) utilise des sondes d'ADN marquées par une haptène (le dinitrophénol) qui sert de cible à un anticorps lui-même reconnu par un polymère d'anticorps jumelé à l'enzyme HRP. Cette dernière entraîne la précipitation des ions argent (Ag⁺) en solution au site du gène. Cette réaction se manifeste par l'apparition dans le noyau cellulaire de points noirs visibles par microscopie à fond clair. Cette méthode est commercialisée sous le nom de EnzMet™ (Nanoprobes, Yaphank, NY, États-Unis) pour métallographie enzymatique. Elle offre l'avantage de produire des signaux (points) distincts (non diffus), faciles à compter et permanents [Powell *et al.*, 2007a; Tubbs *et al.*, 2004]. Toutefois, ce type de marquage ne permet pas d'évaluer la présence d'une polysomie 17 sur une même lame et nécessite donc une seconde réaction d'hybridation pour l'obtention d'un rapport HER-2/CEP17. Lorsque deux sondes sont utilisées, le guide d'interprétation est le même que pour le FISH [Dietel *et al.*, 2007], alors que si la sonde HER-2 est utilisée seule, la présence d'au moins six points noirs ou de larges agrégats dans plus de 30 % des cellules tumorales indique une amplification [Wolff *et al.*, 2007].

Une trousse commercialisée sous le nom de EnzMet™ GenePro (Ventana, Tucson, AZ, États-Unis) permet de détecter l'amplification du gène HER-2 par ISH, par le système EnzMet™, et l'expression simultanée de la protéine HER-2 par IHC (utilisant la phosphatase alcaline comme enzyme pour le substrat *fast red K*). Cette dernière technique a été décrite dans les dernières lignes directrices de l'American Society of Clinical Oncology (ASCO) et du College of American Pathologists (CAP) [Wolff *et al.*, 2007]. À notre connaissance, elle n'a pas encore reçu l'approbation officielle de la FDA.

Le SISH a été adapté pour en automatiser la technique aux fins de commercialisation par la compagnie Ventana Medical System, Inc (BenchMark Series of instruments, Ventana, Tucson, AZ, États-Unis). La préparation des lames par l'appareil permet l'obtention d'un résultat en seulement six heures. Bien que le coût des réactifs (environ 170 \$ par test pour les deux sondes¹³) soit légèrement supérieur à celui des réactifs du FISH et nettement supérieur à celui des réactifs du CISH, le temps gagné grâce à la préparation automatisée des lames constitue un avantage indéniable. Le répertoire québécois et système de mesure des procédures de biologie médicale [MSSS, 2008] n'a encore attribué aucune valeur pondérée au SISH.

10. Pour la sonde HER-2 uniquement (sans sonde centromérique).

11. M^{me} Nancy Roberge, biochimiste (B. Sc.), CRHDQ, communication personnelle, 7 septembre 2007.

12. Voir le glossaire pour la définition de « valeur pondérée ».

13. Dr Sylvain Mailhot, anatomopathologiste, communication personnelle, 27 février 2008.

2.3.3 Réaction en chaîne de la polymérase

La réaction en chaîne de la polymérase (PCR) est une méthode qui permet de produire des copies de séquences géniques et de les multiplier en grand nombre [Mullis *et al.*, 1986]. Elle est réalisée directement par l'action de l'enzyme polymérase de l'ADN, à partir de séquences d'ADN chromosomique ou indirectement à partir de l'ARNm du gène étudié. Cette dernière technique est appelée RT-PCR (*reverse-transcriptase PCR*) d'après le nom de l'enzyme permettant de produire l'ADN qui sera multiplié par PCR. Le RT-PCR présente toutefois des difficultés techniques inhérentes à la conservation tissulaire et à la manipulation de l'ARNm.

Il est possible de quantifier l'ADN initialement retrouvé dans un échantillon par la méthode de PCR en temps réel. Le marquage fluorescent des amorces d'ADN utilisées pour la réaction permet de quantifier à la fois le gène d'intérêt et un gène de référence utilisé comme contrôle interne [Heid *et al.*, 1996].

Ces techniques automatisées sont bien standardisées, rapides, reproductibles [Bieche *et al.*, 1999] et relativement peu coûteuses¹⁴ [Merkelbach-Bruse *et al.*, 2003]. De plus, elles ne sont pas sensibles à l'expertise de l'observateur comme le sont les techniques histologiques mentionnées précédemment. Par contre, l'inconvénient majeur de ces techniques est que l'homogénéisation d'un échantillon biopsique entraîne l'obtention d'un mélange non spécifique de cellules saines, pré-cancéreuses et cancéreuses. Pour améliorer la précision des PCR, il est préférable d'isoler les cellules cancéreuses des échantillons par microdissection au laser, ce qui est coûteux et contraignant [Lehmann *et al.*, 2000].

2.3.4 Test de référence

Il n'existe aucun test étalon parfait pour la détermination du statut HER-2 [Dowsett *et al.*, 2007b; Tuma, 2007; Wolff *et al.*, 2007; Lacroix-Triki *et al.*, 2006]. Bien que certains auteurs aient rapporté le FISH comme un meilleur facteur prévisionnel de la réponse au trastuzumab que l'IHC [Mass *et al.*, 2001; Kakar *et al.*, 2000; Pauletti *et al.*, 2000], l'ASCO et le CAP croient que les données disponibles ne permettent pas de démontrer clairement la supériorité de l'IHC ou de l'ISH pour prédire la réponse au trastuzumab [Wolff *et al.*, 2007].

Néanmoins, même si on reconnaît qu'il est imparfait, le FISH est le test le plus souvent accepté comme test de référence [Dendukuri *et al.*, 2007; NCCN, 2007; Morelle *et al.*, 2006; Nistor *et al.*, 2006]. Ce choix serait surtout attribuable à sa plus grande reproductibilité et à sa grande fiabilité. D'ailleurs, un point de vue minoritaire à la table ronde des lignes directrices de l'ASCO/CAP était que l'IHC n'est pas suffisamment exacte pour déterminer le statut HER-2 et que le FISH devrait préférablement être utilisé [Wolff *et al.*, 2007].

2.4 Lignes directrices

2.4.1 Techniques et algorithmes

En janvier 2007, l'ASCO et le CAP ont publié des lignes directrices au regard de l'évaluation du statut HER-2 dans le cancer du sein. Ce document a été produit à la suite

14. La trousse de PCR en temps réel LightMix® Kit HER2/neu vendue par TIB MOLBIOL (Berlin, Allemagne) coûte 640 \$ pour 96 réactions (M. François Sanschagrin, biologiste moléculaire (Ph. D.), communication personnelle, 20 novembre 2007).

d'un examen approfondi des données probantes publiées dans la littérature. L'ASCO et le CAP recommandent autant l'IHC que le FISH comme test initial (figures A-1 et A-2, annexe A). Les cas équivoques à l'IHC devront être confirmés par FISH et les cas équivoques au FISH nécessiteront un dénombrement de cellules additionnelles ou une répétition du FISH [Wolff *et al.*, 2007]. Si le résultat du FISH demeure équivoque après recomptage ou reprise du test, l'IHC devra être effectuée [ASCO et CAP, 2007].

Lors d'une réunion tenue à Toronto le 16 février 2007, onze anatomopathologistes canadiens en venaient également à un consensus. Les lignes directrices canadiennes issues de cette réunion s'appuient sur l'expérience des participants au consensus de même que sur les recommandations des lignes directrices de l'ASCO et du CAP. Toutefois, ces deux ensembles de lignes directrices diffèrent de façon importante [Hanna *et al.*, 2007a].

Contrairement à celles de l'ASCO/CAP, les lignes directrices consensuelles canadiennes recommandent l'utilisation d'un test d'IHC comme test initial à moins que l'échantillon soit de petite taille ou qu'il ait été prélevé par biopsie au trocart dans le contexte d'un traitement néo-adjuvant¹⁵. Les cas testés positifs à l'IHC (score 3+) sont admissibles à recevoir le trastuzumab, alors que les cas équivoques (score 2+) devront être retestés par l'une ou l'autre des techniques d'ISH (FISH, CISH ou SISH) [Hanna *et al.*, 2007a] (figure A-3, annexe A). Comme leur approbation n'a pas encore été octroyée par la FDA, le CISH et le SISH ne sont pas des techniques recommandées par l'ASCO et le CAP [Wolff *et al.*, 2007; Carlson *et al.*, 2006]. Elles n'étaient pas non plus recommandées au Royaume-Uni [Di Palma *et al.*, 2007; Dowsett *et al.*, 2007a; Ellis *et al.*, 2004]. Cependant, en date du 1^{er} avril 2008, une mise à jour de ces recommandations indique que les laboratoires qui utilisent le CISH ou le SISH doivent effectuer une validation initiale de leur méthode à l'aide du FISH [Walker *et al.*, 2008].

La Commission européenne a approuvé en octobre 2004 l'utilisation optionnelle du CISH et du FISH pour remplacer l'IHC comme test initial. Les cas équivoques ou polyploïdes nécessitent un contrôle par ISH ou IHC, selon le test initial utilisé (figure A-4, annexe A) [Penault-Llorca et Cayre, 2004]. En Finlande, le CISH a remplacé le FISH pour détecter l'amplification du gène. Toutefois, il est uniquement effectué dans deux laboratoires de référence où le personnel est hautement habilité à le faire [Bilous *et al.*, 2003a].

En Australie, pour être admissibles au trastuzumab, les patientes avec un cancer métastatique doivent présenter une surexpression de la protéine HER-2 à l'IHC (score 3+) ou une amplification du gène HER-2 par FISH ou par CISH. Quant aux patientes atteintes d'un cancer du sein de stade précoce, leur admissibilité dépend d'un test d'ISH (FISH ou CISH) positif [NBCC, 2007].

2.4.2 Nombre minimal de tests requis par laboratoire

Les lignes directrices canadiennes recommandent que chaque laboratoire qui procède à des tests d'IHC ou FISH pour le diagnostic du statut HER-2 en effectue pour un nombre minimal de 250 et 100 (préférentiellement 200) cas par année, respectivement [Hanna *et al.*, 2007a]. Cette recommandation s'appuie sur celle émise par le Royaume-Uni [Ellis *et al.*, 2004]. L'ASCO et le CAP vont dans le même sens [Wolff *et al.*, 2007].

15. Dans ces cas d'exception, il est préférable d'effectuer un test d'ISH comme test initial [Hanna *et al.*, 2007a].

Pour les techniques du CISH et du SISH, aucun nombre minimal de tests requis n'est mentionné dans les lignes directrices canadiennes [Hanna *et al.*, 2007a]. Le nombre de tests effectués par chaque anatomopathologiste doit également être pris en compte dans l'évaluation de sa compétence [Hanna *et al.*, 2007b].

2.4.3 Validation des tests

Il est recommandé que toute technique nouvellement utilisée dans un laboratoire soit validée en référence à une autre méthode déjà validée (FISH ou IHC). La validité d'une technique est reconnue lorsqu'elle permet d'obtenir un taux de concordance de 95 % avec la technique de référence pour les cas positifs comme pour les cas négatifs (non équivoques). Pour valider l'utilisation d'un nouvel anticorps, un laboratoire doit valider sa technique sur 25 à 100 échantillons, préférablement 100 si le laboratoire offre le test depuis peu. Toute modification à un protocole validé nécessite une validation additionnelle et la conservation de la documentation pertinente [Hanna *et al.*, 2007a; 2007b; Wolff *et al.*, 2007].

2.4.4 Assurance qualité interne et externe

Les procédures optimales d'assurance qualité interne d'un laboratoire incluent la validation initiale du test, l'utilisation de modes opératoires normalisés et de matériel de contrôle (témoins) pour chaque test, et la revalidation des procédures en cas de modification. Elles incluent également la formation théorique et pratique ainsi que l'évaluation continue des compétences du personnel (techniciens et anatomopathologistes).

Les lignes directrices canadiennes comme celles de l'ASCO/CAP recommandent la participation à un programme d'assurance qualité externe [Hanna *et al.*, 2007a; Wolff *et al.*, 2007]. Ce type de programme implique l'envoi biannuel de blocs tumoraux de résultats positifs et négatifs (généralement cinq chacun) dans un laboratoire de référence. Il vise à assurer la calibration d'une méthode et le maintien de l'expertise d'un laboratoire local pour une technique donnée. Si le laboratoire local obtient des résultats insuffisants (concordance inférieure à 90 % avec le laboratoire de référence), il se voit fournir un soutien pour améliorer la qualité de ses tests. Par la suite, s'il maintient un niveau élevé de résultats erronés, son accréditation pour effectuer la technique en question dans le cadre du HER-2 pourrait lui être retirée. Ce type de programme existe entre autres aux États-Unis (CAP; www.cap.org), au Royaume-Uni (UK NEQAS; www.ukneqas.org.uk) et en Ontario¹⁶. NordiQC est un organisme scientifique à but non lucratif qui fournit également un service de référence. Les laboratoires de l'extérieur peuvent adhérer à ces programmes.

2.5 Techniques utilisées au Québec

Selon la Direction de l'organisation des services médicaux et technologiques du MSSS, en 2006, 32 centres hospitaliers de 14 régions différentes du Québec ont effectué un total de 13 549 tests d'IHC spécifiquement pour le marqueur biologique HER-2. Onze (34 %) de ces 32 établissements ont effectué moins de 250 tests par an, ne satisfaisant donc pas aux exigences des lignes directrices canadiennes de 2007. Huit (25 %) en ont même effectué moins de 100.

16. Le ministère de la Santé et des Soins de longue durée de l'Ontario a lancé son programme d'assurance qualité externe en 2001. Deux fois par an, les 17 laboratoires accrédités pour effectuer des tests pour le statut HER-2 envoient des échantillons dans deux laboratoires de référence [Hanna *et al.*, 2007b].

Les anticorps primaires utilisés pour effectuer les tests d'IHC incluent entre autres le CB11, le A0485, le TAB250 et le SP3. La trousse standardisée HercepTest™ serait quant à elle très peu utilisée. Les raisons évoquées incluent son coût élevé, le manque de spécificité ou la trop grande sensibilité du test comme en fait état la littérature. L'utilisation d'anticorps hors trousse implique l'utilisation de plusieurs protocoles « maison » propres à chaque laboratoire. Étant donné que la sensibilité et la spécificité du test d'IHC diffèrent selon l'anticorps choisi et parfois même selon le lot du fabricant, la plupart des centres effectueraient pour un même cas deux tests d'IHC à l'aide de deux anticorps différents pour minimiser le risque de faux diagnostic¹⁷ (voir figure A-5, annexe A).

La très grande majorité des cas sont systématiquement testés par IHC. Par contre, le choix des cas qui doivent ensuite être retestés par ISH ne semble pas faire l'unanimité. Certains anatomopathologistes ne retestent que les cas équivoques, alors que d'autres estiment que les cas positifs devraient également être retestés. Enfin, certains anatomopathologistes retestent systématiquement tous les cas par ISH.

Six centres effectuent actuellement des tests FISH pour déterminer le statut HER-2 des patientes au Québec¹⁸. Ils utiliseraient les sondes PathVysion®¹⁹ et atteindraient le nombre minimal recommandé de tests à effectuer annuellement. Ces hôpitaux reçoivent en référence les cas des hôpitaux périphériques pour le FISH uniquement ou pour l'IHC également.

Un seul centre effectue des tests CISH dans le cadre du HER-2 au Québec. Cet hôpital qui effectue également des tests FISH procède au CISH uniquement chez certains cas ayant obtenu des résultats discordants à deux tests d'IHC, en l'occurrence un résultat négatif (0 ou 1+) et un résultat équivoque (2+)²⁰. Toutefois, l'obtention d'un résultat équivoque ou positif au CISH nécessite confirmation par FISH dans cet hôpital, puisque la sonde centromérique n'est pas utilisée pour le CISH. Un deuxième laboratoire effectuait jusqu'à tout dernièrement des tests CISH dans le cadre du HER-2 mais aurait cessé à la suite de la publication des lignes directrices de l'ASCO/CAP.

Le Centre hospitalier régional de Rimouski, qui fait partie intégrante du CSSS de Rimouski-Neigette, compte utiliser, en plus de l'IHC, la méthode automatisée du SISH pour tester systématiquement tous ses cas de cancer du sein pour le statut HER-2. Dans un premier temps, les résultats équivoques au SISH continueront d'être retestés par le FISH qui demeurera le test de référence. L'implantation sera conditionnelle au succès de la phase de validation de la technique qui est présentement en cours²¹.

Certains laboratoires dont le laboratoire d'oncopathologie moléculaire de l'Hôpital du Saint-Sacrement (Québec) montre un intérêt pour l'utilisation du RT-PCR en temps réel. Pour le moment, le test n'est pas utilisé dans un contexte clinique mais fera l'objet d'études expérimentales dans ce centre. Si les premiers résultats sont convaincants, ce centre pourrait songer à utiliser le RT-PCR en temps réel comme test de validation, comme cela se fait ailleurs en Amérique du Nord²².

17. D' Louis Gaboury, anatomopathologiste, communication personnelle, juillet 2007.

18. Le test FISH est utilisé à l'Hôpital Hôtel-Dieu de Montréal (CHUM), à l'Hôpital Général Juif de Montréal, à l'Hôpital Hôtel-Dieu de Québec (CHUQ), à l'Hôpital du Saint-Sacrement (Québec) (CHAUQ), au Centre hospitalier universitaire de Sherbrooke (CHUS) et au Centre hospitalier régional de Rimouski.

19. Cette trousse inclut les deux sondes du HER-2 et du centromère du chromosome 17.

20. Tous les autres cas de résultats discordants sont plutôt retestés par FISH.

21. D' Sylvain Mailhot, anatomopathologiste, communication personnelle, décembre 2007.

22. M. François Sanschagrin, biologiste moléculaire (Ph. D.), communication personnelle, 20 novembre 2007.

3.1 Objectifs

La présente revue systématique vise à déterminer la validité des différentes techniques utilisées dans les laboratoires de pathologie pour déterminer le statut HER-2 des patientes atteintes d'un cancer du sein. Les six techniques visées par cette évaluation sont l'immunohistochimie (IHC), l'hybridation *in situ* fluorescente (FISH), l'hybridation *in situ* chromogénique (CISH), l'hybridation *in situ* argentique (SISH) et la réaction en chaîne de la polymérase (PCR ou RT-PCR) en temps réel. Leur validité est déterminée en examinant leur performance diagnostique (sensibilité, spécificité, exactitude et valeurs prédictives positive et négative), leur concordance entre elles et leurs variabilités interobservateurs et interlaboratoires. Plus spécifiquement, les objectifs de l'évaluation sont de déterminer :

- 1) la performance diagnostique de l'IHC, du CISH, du SISH, du PCR et du RT-PCR en temps réel en référence au FISH (considéré comme le test étalon dans cette évaluation);
- 2) la distribution des scores d'IHC (0/1+ [ou 0, 1+], 2+, 3+) dans une population de cas sélectionnée de façon aléatoire ou successive;
- 3) la proportion de résultats FISH et CISH positifs par score d'IHC (0/1+ [ou 0, 1+], 2+, 3+);
- 4) les variabilités interobservateurs et interlaboratoires de l'IHC, du FISH, du CISH et du SISH.

Dans le domaine de l'évaluation des tests diagnostiques, il s'agit principalement d'une étude de niveau 2, c'est-à-dire d'une analyse de la performance diagnostique des différentes techniques [Fryback et Thornbury, 1991] et non d'une analyse des répercussions des tests diagnostiques sur le choix thérapeutique, sur l'évolution de l'état de santé du patient ou sur la société.

3.2 Recherche documentaire

La recherche d'articles scientifiques primaires a été effectuée dans les bases de données spécialisées en santé : *PubMed*, *EMBASE* par l'interface *Ovid* et *The Cochrane Library 2007, issue 4*. Les stratégies de recherche utilisées sont présentées à l'annexe B. Elles ont été élaborées à partir de quatre thèmes : le cancer du sein, HER-2, les techniques diagnostiques et la variabilité. Afin de repérer des lignes directrices de pratique clinique sur le diagnostic du statut HER-2, une recherche a été effectuée dans le Web et dans la littérature grise (voir l'annexe B). La bibliographie des articles consultés a aussi été examinée pour relever d'autres références pertinentes.

3.3 Critères d'inclusion et d'exclusion

L'évaluation porte sur les études primaires publiées de janvier 2000 à novembre 2007 inclusivement, répondant aux critères suivants.

Critères d'inclusion :

- 1) articles publiés dans des journaux scientifiques revus par des pairs;
- 2) études portant sur des patientes atteintes d'un cancer du sein invasif;
- 3) études comparant les résultats de deux techniques pour au moins 50 patientes, sauf pour les comparaisons IHC *versus* FISH et IHC *versus* CISH pour lesquelles un échantillon de 100 patientes est requis²³;
- 4) études présentant des résultats de concordance interobservateurs pour une même technique pour au moins 50 patientes ou lames, sans référence nécessaire au test étalon;
- 5) pour l'IHC, études qui utilisent les trousse standardisées HercepTest™ ou PATHWAY®²⁴, ou les anticorps primaires A0485, CB11, TAB250 et SP3²⁵;
- 6) pour le FISH, études qui utilisent les trousse PathVysion® ou pharmDx™²⁶;
- 7) études publiées en français ou en anglais.

Critères d'exclusion :

- 1) résumés de conférence, lettres, éditoriaux, résumés et études de cas;
- 2) études qui utilisent des échantillons de tissus fixés à l'aide d'un fixateur autre que la formoline²⁷;
- 3) études qui utilisent des échantillons sanguins, de moelle osseuse ou des biopsies d'aspiration à l'aiguille fine;
- 4) études qui utilisent des échantillons congelés sauf pour le PCR et le RT-PCR²⁸;
- 5) études qui utilisent une interprétation des résultats non conforme aux recommandations canadiennes et américaines (section 2.4 et annexe A)²⁹;
- 6) études qui utilisent des logiciels d'interprétation automatisée des lames (ACIS);
- 7) études qui rapportent les résultats du FISH ou du CISH seulement pour un sous-groupe de résultats à l'IHC (exemple IHC 2+ uniquement);
- 8) études qui comparent l'IHC et le FISH sans fournir les résultats séparés pour les catégories équivoque (2+) et positive (3+) à l'IHC;
- 9) pour l'analyse de la distribution des scores d'IHC, études qui incluent un biais de sélection ou dont l'échantillon est composé à plus de 40 % de cas IHC 2+/3+, même s'il s'agit d'une série consécutive de patientes;

23. Étant donné le nombre important d'articles comparant l'IHC à l'ISH, les études de plus grande taille sont probablement les plus pertinentes.

24. La trousse HercepTest™ inclut l'anticorps A0485 et la trousse PATHWAY® inclut maintenant l'anticorps 4B5. Initialement, cette dernière incluait l'anticorps CB11.

25. Ces anticorps primaires sont les plus susceptibles d'être utilisés au Québec.

26. Ces deux trousse incluent une sonde HER-2 et une sonde centromérique du chromosome 17 pour l'obtention d'un rapport HER-2/CEP17.

27. Ce fixateur est recommandé par les fabricants des trousse et dans les lignes directrices canadiennes. L'usage d'un autre fixateur peut influencer les résultats des tests et doit préalablement être validé.

28. Les échantillons congelés sont plutôt utilisés dans un contexte de recherche.

29. De légères variations existent entre les études pour l'interprétation de l'IHC. Pour être incluses, les études devaient avoir utilisé un point seuil de cellules marquées entre 10 et 30 %. Les lignes directrices canadiennes et de l'ASCO/CAP qui précèdent celles de 2007 recommandaient un point seuil de 10 %, alors qu'un point seuil de 30 % est maintenant recommandé.

- 10) techniques FIHC³⁰, PGDS³¹;
- 11) techniques d'autométallographie à l'or et (ou) à l'argent.

Le seuil minimal de taille d'échantillon s'applique individuellement à chacune des analyses ou comparaisons lorsque plusieurs sont présentées dans une même étude. L'annexe C présente la liste des études qui ont été exclues pour une ou plusieurs raisons non clairement évidentes dans le résumé. Lorsqu'une étude est incluse dans la présente évaluation mais exclue pour une analyse particulière, la raison est mentionnée dans le résumé de l'étude (annexe E).

3.4 Analyses

La qualité des études incluses dans le présent document est évaluée selon les critères établis dans la grille QUADAS développée pour les études diagnostiques [Whiting *et al.*, 2003]. Les résumés d'études présentent pour chacune les points les plus importants (annexe E).

Dans la majorité des analyses présentées au chapitre 4, les résultats de FISH sont dichotomisés selon le rapport HER-2/CEP17 qui définit l'admissibilité au trastuzumab (positifs si $\geq 2,0$ et négatifs si $< 2,0$). C'est sous cette forme que les résultats sont disponibles dans la très grande majorité des articles. Lorsqu'on fait référence à des résultats nettement positifs ($> 2,2$) ou négatifs ($< 1,8$), cela est clairement spécifié. De la même façon, les résultats négatifs d'IHC font référence dans l'analyse aux scores 0 ou 1+, puisqu'ils ne sont pas admissibles au trastuzumab.

Dans chacune des analyses, les résultats d'IHC sont regroupés selon l'anticorps primaire utilisé pour effectuer le test.

La mesure de la performance diagnostique de l'IHC en référence au FISH est calculée de deux façons. La première consiste à ne considérer comme positifs que les scores IHC 3+; la deuxième, à considérer comme positifs les scores 2+ et 3+³². Ces analyses ont été effectuées à partir des données brutes présentées dans les études et ne reflètent pas toujours la positivité telle que définie par les auteurs. Généralement, les auteurs qui calculent des valeurs de performance diagnostique ne présentent les résultats que d'une des deux façons.

Pour le CISH, les résultats sont analysés en fonction de l'interprétation du test, c'est-à-dire selon le nombre de copies par cellule du gène HER-2 utilisé comme point seuil pour définir un résultat positif (≥ 6 , ≥ 5 ou > 5).

Afin de regrouper les résultats de plusieurs études en une seule mesure qui tient compte de la taille d'échantillon de chacune, des moyennes pondérées sont calculées pour certaines mesures de performance. Pour ce faire, le logiciel Meta-DiSc³³ est utilisé [Zamora *et al.*, 2006]. Celui-ci fournit avec la mesure regroupée, un intervalle de confiance (IC) à 95 % et une valeur de p pour le chi carré d'hétérogénéité. Lorsque le chi carré d'hétérogénéité est significatif (valeur de $p \leq 0,05$), il indique une hétérogénéité importante entre les résultats des différentes études. Dans la présente évaluation, lorsque la valeur de p est nettement sous le seuil de signification, celle-ci est mentionnée dans les résultats, et le résultat doit être interprété avec prudence.

30. Immunohistochimie fluorescente.

31. *Protein and gene double staining*.

32. Comme les scores IHC 3+, les scores 2+ étaient initialement considérés positifs [Jacobs *et al.*, 1999].

33. Meta-DiSc® version 1.4. Meta-analysis of diagnostic and screening tests. Disponible à : <http://www.hrc.es/investigacion/metadisc.html>.

4.1 Immunohistochimie

4.1.1 Distribution des scores d'IHC

Sept études totalisant 5 017 patientes ont permis d'estimer la distribution des scores d'IHC. Pour chaque étude, la proportion de patientes dans chacun des scores est présentée au tableau D-1 (annexe D). La qualité des études choisies pour évaluer cette distribution n'est pas optimale, puisque ces études portent sur des cohortes rétrospectives, seules études disponibles. Bien qu'il s'agisse de séries de patientes sélectionnées de façon consécutive, les critères d'inclusion et d'exclusion ne sont pas toujours clairement mentionnés. Il est également possible que les échantillons choisis ne soient pas parfaitement représentatifs de l'ensemble des patientes, parfois en raison de l'objectif principal de l'étude (détails en annexe E).

Trois des sept études ont séparé les résultats pour les scores 0 et 1+; les autres les ont regroupés en une catégorie (tableau D-1). La proportion de scores 0 variait de 24,5 à 41,6 % avec une médiane de 37,2 % et une moyenne pondérée de 37,0 % (IC à 95 % : de 35,4 à 38,5 %). Quant à la proportion de scores 1+, elle allait de 34,7 à 48,2 % (médiane de 35,9 %) avec une moyenne pondérée de 36,2 % (IC à 95 % : de 34,7 à 37,8 %) (tableau D-1). Ces trois études ont utilisé la trousse HercepTest™.

Le tableau 4 présente les proportions médianes et moyennes des scores d'IHC pour l'ensemble des sept études et pour celles ayant utilisé la trousse HercepTest™ et l'anticorps CB11. Une étude [Egervari *et al.*, 2007] a utilisé deux anticorps différents pour tester les mêmes cas de façon parallèle et a obtenu des résultats très différents (tableau D-1). Globalement, près des trois quarts des patientes (médiane de 73,1 %; moyenne pondérée de 73,5 %) ont obtenu un résultat 0 ou 1+ de l'IHC. Pour les scores 2+ et 3+, les proportions médianes sont de 11,1 et 13,7 %, respectivement (tableau 4). La valeur de *p* du chi carré d'hétérogénéité est très significative pour les moyennes pondérées calculées pour le score 2+. L'interprétation de ces mesures appelle donc à la prudence.

Par ailleurs, les lignes directrices de l'ASCO et du CAP [Wolff *et al.*, 2007] citaient en référence l'étude de Owens et ses collaborateurs [2004] qui ont estimé la proportion de chacun des scores d'IHC chez 116 736 cas de cancer du sein testés consécutivement dans deux laboratoires de référence aux États-Unis. La proportion de cas testés 3+ à l'IHC dans cette étude était de 11 %, alors que celle des cas testés 0 ou 1+ a été de 80 %. D'après la présente évaluation, cette étude est jugée inadéquate pour l'estimation des scores d'IHC en raison de l'absence d'information concernant les raisons pour lesquelles ces cas ont été référés. Il n'est pas mentionné s'il s'agissait d'échantillons référés pour une première analyse, si ceux-ci représentaient l'ensemble des échantillons des hôpitaux d'où provenaient les cas ou si certains échantillons avaient été référés dans un but d'assurance qualité seulement.

TABLEAU 4

Distribution des scores d'IHC selon l'anticorps utilisé							
ANTICORPS	NOMBRE DE SUJETS (NOMBRE D'ÉTUDES)	SCORE D'IHC					
		0 OU 1+		2+		3+	
		Médiane*	Moyenne pondérée†	Médiane*	Moyenne pondérée†	Médiane*	Moyenne pondérée†
HercepTest™	4 900 (6)	74,4 (70,7-76,2)	73,6 (72,3-74,8)	10,4 (5,9-17,8)	14,8 (13,8-15,8)*	13,6 (10,9-18,2)	11,6 (10,7-12,5)
CB11§	291 (2)	62,1 (52,3-71,8)	60,1 (54,3-65,8)*	21,4 (14,5-28,2)	22,7 (18,0-27,9)*	16,6 (13,7-19,5)	17,2 (13,0-22,0)
Total	5 017 (7)	73,1 (52,3-76,2)	73,5 (72,3-74,8)	11,1 (5,9-28,2)	14,8 (13,8-15,8)*	13,7 (10,9-19,5)	11,7 (10,8-12,6)

* Les médianes sont présentées en pourcentage avec les valeurs minimales et maximales entre parenthèses.

† Les moyennes pondérées sont présentées en pourcentage avec les intervalles de confiance à 95 %.

‡ Valeur de p du chi carré d'hétérogénéité $\leq 0,005$.

§ Anticorps CB11 de Novocastra ou Ventana.

|| Inclut les résultats des études présentées au tableau D-1; pour le calcul de la médiane et de la moyenne pondérée (IC à 95 %), seulement les résultats de la trousse HercepTest™ ont été utilisés pour l'étude d'Egervari et ses collaborateurs [2007].

4.1.2 Proportion de résultats FISH positifs par score d'IHC

Vingt-sept études ont évalué la concordance entre les résultats du test FISH et de l'IHC. Les résultats de FISH détaillés par score d'IHC sont présentés au tableau D-2 (annexe D). Toutes ces études ont utilisé la trousse PathVysion®, les réactifs de Vysis Inc (Downers Grove, IL, États-Unis) (une étude) ou la trousse pharmDx™ (une étude). Une majorité d'études ont utilisé la trousse HercepTest™ pour effectuer l'IHC. Les autres anticorps primaires utilisés sont le A0485 et le CB11 (Novocastra ou Ventana). La faiblesse méthodologique la plus souvent rencontrée dans ces études est le biais de sélection. Plusieurs échantillons ont fait l'objet d'une sélection de convenance. Le biais de vérification a aussi été rencontré (voir glossaire). Les détails de chaque étude sont fournis dans les résumés d'études en annexe E.

Le tableau 5 présente les proportions médianes et moyennes de résultats FISH positifs³⁴ par score d'IHC pour l'ensemble des 27 études mais aussi par anticorps utilisé pour l'IHC. Globalement, environ 2,6 % des cas négatifs d'IHC ont obtenu un résultat FISH positif (tableau 5). En considérant le FISH comme le test de référence, ces cas seraient des « faux négatifs » et la valeur prédictive négative de l'IHC s'élèverait donc à 97,4 %. Par ailleurs, 18 études ont présenté des résultats séparés pour les catégories 0 et 1+ à l'IHC; les médianes sont de 2,0 % (étendue de 0 à 12,5) et 3,6 % (étendue de 0 à 50), respectivement (tableau D-3).

Les résultats les plus variables ont été obtenus dans la catégorie des scores équivoques à l'IHC. Toutefois, la catégorie des scores 3+ n'échappe pas à cette variabilité. Dans l'ensemble, les résultats positifs d'IHC n'ont été confirmés par FISH que dans une proportion de 89,9 % (tableau 5); c'est donc dire qu'environ 10,1 % des cas considérés positifs par IHC sont discordants de ceux du FISH.

Au tableau 5, on constate également que l'IHC effectuée à l'aide de l'anticorps primaire A0485 semble obtenir la meilleure concordance avec le FISH, mais le nombre

34. Dans cette analyse, le résultat FISH positif fait référence au résultat qui définit l'admissibilité au trastuzumab (rapport HER-2/CEP17 $\geq 2,0$) (voir section 3.4).

d'études est restreint. L'IHC effectuée avec un anticorps CB11 obtiendrait la plus faible concordance. Encore une fois, les études sont peu nombreuses. Par ailleurs, deux études présentées au tableau D-2 [Egervari *et al.*, 2007; Sáez *et al.*, 2006] ont utilisé pour l'IHC deux anticorps différents de façon parallèle. Elles ont toutes deux obtenu plus de résultats discordants avec l'anticorps CB11 qu'avec la trousse HercepTest™.

TABEAU 5

Proportion de résultats FISH positifs par score d'IHC selon l'anticorps utilisé							
ANTICORPS	NOMBRE DE SUJETS (NOMBRE D'ÉTUDES)	SCORE D'IHC					
		0 OU 1+		2+		3+	
		Médiane*	Moyenne pondérée†	Médiane*	Moyenne pondérée†	Médiane*	Moyenne pondérée†
HercepTest™	15 670 (21)	2,6 (0-8,7)	3,5 (3,1-3,9)	12,2 (0,0-92,3)	22,3 (21,1-23,5)	85,5 (38,5-100)	86,6 (85,2-87,9)
A0485	3 459 (3)	0,6 (0-2,8)	2,3 (1,7-3,2)	17,0 (13,3-27,8)	17,0 (15,0-19,2)	91,6 (90,0-92,0)	91,4 (88,3-94,0)
CB11‡	1 052 (4)	2,1 (1,3-9,1)	3,9 (2,2-6,4)	23,8 (0-35,3)	27,3 (22,8-32,3)	79,4 (61,8-96,6)	87,7 (83,5-91,1)
Total§	20 200 (27)	2,6 (0,0-11,5)	3,4 (3,0-3,7)	16,9 (0,0-92,3)	21,7 (20,7-22,7)	89,9 (38,5-100)	87,9 (86,7-89,0)

La valeur de *p* du chi carré d'hétérogénéité de chacune des moyennes pondérées est très significative (hétérogénéité importante) sauf pour l'anticorps A0485.

* Les médianes sont présentées en pourcentage avec les valeurs minimales et maximales entre parenthèses.

† Les moyennes pondérées sont présentées en pourcentage avec les intervalles de confiance à 95 %.

‡ Trois études ont utilisé l'anticorps CB11 de Novocastra et une celui de Ventana.

§ Les résultats obtenus avec la trousse HercepTest™ ont été utilisés lorsque deux anticorps ont été étudiés parallèlement; les résultats du laboratoire central ont été utilisés pour l'étude de Reddy et ses collaborateurs [2006].

4.1.3 Performance diagnostique de l'IHC en référence au FISH

Le tableau D-4 (annexe D) présente, pour les mêmes 27 études qu'à la section 4.1.2, la sensibilité et la spécificité de l'IHC en référence au FISH (PathVysion®). Deux scénarios sont considérés. Les résultats montrent que si on ne considérait que les cas IHC 3+ pour le trastuzumab sans se préoccuper des cas équivoques (2+), la sensibilité médiane de l'approche ne serait que de 71 % (étendue de 27,9 à 100 %). En d'autres mots, 29 % des patientes admissibles au trastuzumab (selon le FISH) ne seraient pas détectées. Par contre, la spécificité serait très élevée (médiane de 97,2 %; étendue de 70,1 à 100 %). Cette dernière mesure correspond à la proportion de cas FISH négatifs qui seraient détectés comme 0, 1+ ou 2+ à l'IHC.

D'autre part, si on considérait l'ensemble des cas IHC 2+ et 3+ comme positifs, comme le suggérait initialement le guide d'interprétation de la trousse HercepTest™, la sensibilité de l'IHC serait beaucoup plus élevée (médiane de 95,2 %; étendue de 65,7 à 100 %); à l'inverse, la spécificité serait beaucoup plus faible (médiane de 74,2 %; étendue de 17,0 à 98,5 %).

Pour ces analyses, la prévalence médiane des tests FISH positifs parmi les 27 études est de 23,6 %, ce qui est supérieur à celle attendue. La présence de biais de sélection, qu'ils soient volontaires ou non, peut affecter la validité de ces résultats de sensibilité et de spécificité.

4.1.4 Concordance entre l'IHC et le FISH selon le lieu d'exécution (local *versus* central)

Deux études présentées au tableau D-5 (annexe D) ont comparé la concordance entre les tests d'IHC et FISH selon le lieu d'exécution des tests. Reddy et ses collaborateurs [2006] ont comparé les résultats d'IHC de plusieurs laboratoires locaux aux résultats de FISH d'un laboratoire central, puis comparé les résultats d'IHC et de FISH du laboratoire central. Ils ont constaté que les résultats d'IHC concordaient davantage avec les résultats de FISH lorsque les deux tests étaient effectués dans un laboratoire central. On peut voir au tableau D-5 (annexe D) que les résultats IHC 3+ de laboratoires locaux furent moins souvent positifs au FISH que ceux d'un laboratoire central (73,6 % *versus* 85,5 %). De plus, les résultats IHC négatifs (0 ou 1+) de laboratoires locaux ont donné plus souvent de faux négatifs que ceux du laboratoire central (4,2 % *versus* 2,6 %).

De même, Papadopoulos et ses collaborateurs [2007] ont comparé les résultats d'IHC de 19 laboratoires régionaux effectuant moins de 100 tests par année aux résultats de FISH d'un laboratoire central. De plus, ils ont comparé les résultats d'IHC et de FISH du laboratoire central. Les résultats sont présentés au tableau D-5. Les laboratoires régionaux ont obtenu légèrement plus de faux négatifs que le laboratoire central (13,3 % *versus* 11,5 %). De plus, les résultats IHC 3+ du laboratoire central concordaient beaucoup plus souvent avec ceux du FISH que ceux des laboratoires locaux (90,6 % *versus* 57,1 %).

4.1.5 En résumé, pour la comparaison de l'IHC et du FISH

- Le choix de l'anticorps primaire utilisé influence le résultat d'IHC;
- Près des trois quarts des cas de cancer du sein sont négatifs (score de 0 ou 1+) à l'IHC;
- La proportion de résultats positifs d'IHC qui ne concordent pas avec ceux du FISH est importante (1 sur 10);
- La concordance entre les résultats d'IHC et ceux de FISH est plus grande lorsque les deux tests sont effectués dans un laboratoire central.

4.2 Hybridation *in situ* chromogénique

4.2.1 Performance diagnostique du CISH en référence au FISH

Neuf études portant sur 1 339 patientes ont été retenues pour évaluer la performance diagnostique du CISH à détecter une amplification du gène HER-2 (tableau 6). Toutes les études sauf deux [Gong *et al.*, 2005; Loring *et al.*, 2005] ont utilisé des échantillons de convenance dont deux composés d'une forte proportion de cas de faible amplification [Van de Vijver *et al.*, 2007; Bhargava *et al.*, 2005]. Dans toutes ces études, le test de référence (FISH) a été effectué à l'aide de la trousse PathVysion®. Cayre et ses collaborateurs [2007] ont aussi utilisé la trousse pharmDx™ de façon parallèle mais, aux fins de comparabilité avec les autres études, ces résultats ne sont pas présentés au tableau 6. Les tests CISH ont tous été effectués à l'aide de sondes HER-2 marquées à la digoxigénine (Zymed®), mais les systèmes de détection (anticorps + enzyme) peuvent varier et influencer les résultats. Les détails de chaque étude sont fournis dans les résumés d'études de l'annexe E.

L'interprétation du test CISH diffère d'une étude à l'autre et complique la combinaison des résultats. Les points seuils utilisés ne sont pas toujours les mêmes. Certaines études

ont interprété un nombre moyen de copies de gène HER-2 par noyau supérieur ou égal à six comme positifs, ce qui correspond à l'ancien guide d'interprétation du CISH. Une d'entre elles a également utilisé un point seuil supérieur ou égal à cinq copies. Deux études seulement ont fourni des données représentatives du nouveau guide (CISH positif si ≥ 5 copies; voir tableau 3) [Cayre *et al.*, 2007; Bhargava *et al.*, 2005]. De plus, quatre études ont utilisé une sonde centromérique du chromosome 17 pour corriger la possibilité d'une polysomie 17 mais ne l'ont pas appliquée aux mêmes cas. Isola et ses collègues [2004] l'ont utilisée chez les cas ayant obtenu une valeur limite d'amplification, Vocaturo et ses collaborateurs [2006], chez ceux présentant de 6 à 10 copies de gène HER-2 par noyau, Loring et ses collaborateurs [2005], chez ceux présentant de 3 à 10 copies par noyau, alors que Bhargava et ses collaborateurs [2005] ont comparé les résultats obtenus sans correction et avec correction pour tous les cas.

TABLEAU 6

Performance du CISH à détecter les cas d'amplification au FISH						
ÉTUDE	N	EXACTITUDE EN % (NOMBRES RÉELS)	SENSIBILITÉ EN % (NOMBRES RÉELS)	SPÉCIFICITÉ EN % (NOMBRES RÉELS)	VPP EN % (NOMBRES RÉELS)	VPN EN % (NOMBRES RÉELS)
CISH positif si ≥ 6 copies du gène HER-2 par noyau dans > 50 % des cellules						
Cayre <i>et al.</i> , 2007*	53	94,3 (50/53)	100 (17/17)	91,7 (33/36)	85,0 (17/20)	100 (33/33)
Hyun <i>et al.</i> , 2007*	309	96,8 (299/309)	90,0 (54/60)	98,4 (245/249)	93,1 (54/58)	97,6 (245/251)
Van de Vijver <i>et al.</i> , 2007*	208	89,9 (187/208)	83,8 (93/111)	96,9 (94/97)	96,9 (93/96)	83,9 (94/112)
Sáez <i>et al.</i> , 2006*	174	94,8 (165/174)	97,5 (39/40)	94,0 (126/134)	83,0 (39/47)	99,2 (126/127)
Vocaturo <i>et al.</i>, 2006*†	111	94,6 (105/111)	84,6 (33/39)	100 (72/72)	100 (33/33)	92,3 (72/78)
Gong <i>et al.</i> , 2005	80	91,2 (73/80)	86,4 (19/22)	93,1 (54/58)	82,6 (19/23)	94,7 (54/57)
Loring <i>et al.</i>, 2005‡	110	99,1 (109/110)	100 (27/27)	98,8 (82/83)	96,4 (27/28)	100 (82/82)
Isola <i>et al.</i>, 2004*§	192	93,8 (180/192)	95,8 (92/96)	91,7 (88/96)	92,0 (92/100)	95,7 (88/92)
CISH positif si ≥ 5 copies du gène HER-2 par noyau dans > 50 % des cellules						
Van de Vijver <i>et al.</i> , 2007*	208	91,3 (190/208)	89,2 (99/111)	93,8 (91/97)	94,3 (99/105)	88,4 (91/103)
CISH positif si > 5 copies du gène HER-2 par noyau > 50 % des cellules						
Cayre <i>et al.</i> , 2007*	53	88,7 (47/53)	100 (17/17)	83,3 (30/36)	73,9 (17/23)	100 (30/30)
Bhargava <i>et al.</i> , 2005*	102	97,1 (99/102)	98,4 (62/63)	94,9 (37/39)	96,9 (62/64)	97,4 (37/38)
CISH positif si rapport HER-2/CEP17 $\geq 2,0$						
Bhargava <i>et al.</i>, 2005*	102	100 (102/102)	100 (63/63)	100 (39/39)	100 (63/63)	100 (39/39)

N : nombre de sujets; les études en gras ont utilisé une sonde centromérique du chromosome 17 pour certains ou tous les cas (voir annexe E); le test de référence (FISH) a été effectué à l'aide de la trousse PathVysion®.

* Échantillon de convenance.

† Utilisation d'une sonde CEP17 seulement en présence de 6-10 copies du gène HER-2 par noyau.

‡ Utilisation d'une sonde CEP17 seulement en présence de 3-10 copies du gène HER-2 par noyau.

§ Utilisation d'une sonde CEP17 seulement dans les cas limites d'amplification.

TABLEAU 7

Performance du CISH en référence au FISH selon l'interprétation							
INTERPRÉTATION DU CISH	NOMBRE DE SUJETS (NOMBRE D'ÉTUDES)	EXACTITUDE EN % (IC À 95 %)		SENSIBILITÉ EN % (IC À 95 %)		SPÉCIFICITÉ EN % (IC À 95 %)	
		Médiane	Moyenne pondérée	Médiane	Moyenne pondérée	Médiane	Moyenne pondérée
Positif si ≥ 6 copies (sans sonde CEP17)	824 (5)	94,3	93,9 (92,1-95,5)*	90,0	88,8 (84,2-92,4)*	94,0	96,2 (94,3-97,6)
Positif si > 5 , ou si ≥ 5 copies (sans sonde CEP17)	363 (3)	91,3	92,6 (89,4-95,0)	98,4	93,2 (88,6-96,3)*	93,8	91,9 (86,7-95,5)
Avec une sonde CEP17†‡	404 (3)	99,1	96,8 (94,6-98,3)*	100	97,8 (94,6-99,4)	98,8	95,9 (92,3-98,1)*

CEP17 : sonde centromérique du chromosome 17; IC : intervalle de confiance; le test de référence est le FISH (PathVysion®).

* Valeurs de p du chi carré d'hétérogénéité entre 0,001 et 0,026.

† La sonde centromérique du chromosome 17 peut ne pas avoir été utilisée pour tous les cas.

‡ Excluant l'étude de Vocaturo et ses collaborateurs [2006].

Trois sous-analyses ont été effectuées dans le but de vérifier si des tendances se dégagent par rapport à l'interprétation du CISH (tableau 7). Huit études ont comparé le CISH et le FISH sans utiliser de sonde centromérique du chromosome 17. Plus le point seuil est élevé, moins bonne est la sensibilité et meilleure est la spécificité. L'exactitude semble améliorée si le point seuil est élevé, mais cette mesure est affectée par la prévalence des cas avec une amplification du gène HER-2.

Cayre et ses collaborateurs [2007] ainsi que Van de Vijver et ses collègues [2007] ont comparé les résultats obtenus avec deux points seuils différents pour les mêmes patientes. Les deux études ont obtenu une meilleure spécificité avec le point seuil le plus élevé, alors qu'une d'entre elles a obtenu une meilleure sensibilité avec le seuil le plus bas [Van de Vijver *et al.*, 2007] (tableau 6). Cette même étude a obtenu une meilleure exactitude avec le seuil le moins élevé étant donné une prévalence élevée (53,4 %) des cas positifs au FISH.

D'autre part, les quatre études ayant utilisé une sonde centromérique ont dans l'ensemble obtenu une très bonne exactitude, sensibilité et spécificité. Vocaturo et ses collaborateurs [2006] ont rapporté une sensibilité moins élevée que les trois autres études. L'utilisation de la sonde centromérique chez un nombre plus restreint de cas pourrait expliquer à tout le moins en partie cette différence. Cette étude présentait trop d'hétérogénéité pour permettre la combinaison des résultats tels que présentés au tableau 7; elle y est donc exclue.

Par ailleurs, l'étude de Bhargava et ses collaborateurs [2005] a également permis une analyse des résultats en fonction des catégories de résultats de FISH définies dans l'algorithme décisionnel canadien (clairement positif, équivoque et clairement négatif). Tous les cas clairement positifs au FISH (rapport HER-2/CEP17 $> 2,2$) avaient un nombre moyen de copies de gène HER-2 par noyau supérieur à 5,0. Par contre, deux résultats (5,3 %) parmi les 38 cas clairement négatifs au FISH ont été considérés positifs ($> 5,0$ copies par noyau) au CISH, ainsi que deux (50,0 %) des quatre résultats équivoques au FISH (rapport HER-2/CEP17 de 1,8 à 2,2).

4.2.2 Concordance entre le CISH et le FISH par score d'IHC

Trois des études présentées au tableau 6 et une nouvelle étude [Hanna et Kwok, 2006] ont permis de déterminer la concordance entre le CISH et le FISH par score d'IHC. Les résultats présentés dans le tableau 8 montrent que le CISH et le FISH concordent très bien chez les cas négatifs (0 ou 1+) à l'IHC. Cela semble moins certain chez les cas équivoques mais principalement pour les études qui n'ont pas utilisé une sonde centromérique du chromosome 17. Quant à la concordance du CISH et du FISH chez les cas positifs à l'IHC, elle a été très bonne sauf pour l'étude de Vocaturo et ses collaborateurs [2006]. Les auteurs estiment que des problèmes préanalytiques (mauvaise préservation des tissus ou mauvaise méthode de fixation) pourraient avoir été à l'origine de ces mauvais résultats de concordance.

TABEAU 8

Concordance* entre le CISH et le FISH par score d'IHC					
ÉTUDE	N	ANTICORPS†	SCORE D'IHC		
			0 OU 1+	2+	3+
CISH positif si ≥ 6 copies du gène HER-2 par noyau dans > 50 % des cellules					
Hanna et Kwok, 2006	254	HercepTest™	97,1 (67/69)	93,3 (126/135)	98,0 (49/50)
Loring <i>et al.</i> , 2005‡	110	HercepTest™	100 (62/62)	100 (17/17)	96,8 (30/31)
Vocaturo <i>et al.</i> , 2006§	111	HercepTest™	100 (53/53)	100 (36/36)	72,7 (16/22)
		CB11	100 (53/53)	91,7 (33/36)	86,4 (19/22)
Van de Vijver <i>et al.</i> , 2007	72	HercepTest™, CB11 ou TAB250	s. o.	79,2 (57/72)	s. o.
CISH positif si ≥ 5 copies du gène HER-2 par noyau dans > 50 % des cellules					
Van de Vijver <i>et al.</i> , 2007	72	HercepTest™, CB11 ou TAB250	s. o.	80,6 (58/72)	s. o.

N : nombre de sujets; s. o. : sans objet; les études en gras ont utilisé une sonde centromérique du chromosome 17 pour certains cas; le test de référence (FISH) a été effectué à l'aide de la trousse PathVysion®.

* Les résultats sont présentés en pourcentage avec les nombres réels entre parenthèses.

† Anticorps primaire utilisé pour l'IHC.

‡ Pour le CISH, utilisation d'une sonde CEP17 seulement en présence de 3-10 copies du gène HER-2 par noyau.

§ Pour le CISH, utilisation d'une sonde CEP17 seulement en présence de 6-10 copies du gène HER-2 par noyau.

4.2.3 Proportion de résultats CISH positifs par score d'IHC

Dix études regroupant un total de 1 657 patientes ont fourni des résultats de CISH pour chacun des scores d'IHC (tableau 9). Plusieurs anticorps différents ont été utilisés pour effectuer l'IHC; le CB11 provenait notamment de trois compagnies différentes. Deux études ont utilisé l'anticorps CB11 en parallèle avec l'anticorps SP3 [Ricardo *et al.*, 2007] ou TAB250 [Sapino *et al.*, 2003]; les résultats ont été surtout différents pour les cas IHC 2+. L'interprétation du CISH est différente d'une étude à l'autre; celle de Van de Vijver et ses collègues [2007] a comparé deux points seuils différents.

Globalement, pour tous les anticorps et les interprétations confondus, la proportion de résultats détectés comme positifs au CISH est faible (médiane de 0,4 %) parmi les cas négatifs à l'IHC (0 ou 1+) (tableau 10), et ce, malgré quelques valeurs extrêmes obtenues notamment avec l'anticorps TAB250 [Sapino *et al.*, 2003] et par Ricardo et ses

collaborateurs [2007] (tableau 9). Dans cette dernière étude, la proportion de résultats CISH positifs obtenue chez les scores d'IHC 0 a été d'environ 13 % pour les deux anticorps. L'hypothèse que des difficultés techniques aient pu survenir en raison de la fixation des tissus ou de l'utilisation de micromatrices tissulaires pour le CISH n'est pas écartée. Par ailleurs, les proportions de résultats CISH positifs parmi les cas équivoques (2+) et positifs (3+) à l'IHC connaissent davantage de variations que la proportion obtenue pour les cas négatifs (0 ou 1+) (tableau 10).

TABLEAU 9

Proportion* de résultats CISH positifs par score d'IHC					
ÉTUDE	ANTICORPS†	N	SCORE D'IHC		
			0 OU 1+	2+	3+
CISH positif si ≥ 6 copies du gène HER-2 par noyau dans > 50 % des cellules					
Vocaturio <i>et al.</i> , 2006	HercepTest™	111	0,0 (0/53)	52,8 (19/36)	63,6 (14/22)
Loring <i>et al.</i> , 2005	HercepTest™	110	0,0 (0/62)	0,0 (0/17)	90,3 (28/31)
Dandachi <i>et al.</i> , 2004‡	HercepTest™	171	0,0 (0/131)	68,8 (11/16)	91,7 (22/24)
Hyun <i>et al.</i> , 2007	A0485	309	0,0 (0/146)	10,6 (12/113)	92,0 (46/50)
Peiró <i>et al.</i> , 2007b	CB11	159	0,8 (1/121)	35,3 (6/17)	100 (21/21)
Madrid et Lo, 2004	CB11	160	0,0 (0/80)	45,0 (18/40)	100 (40/40)
Sapino <i>et al.</i> , 2003	CB11	106	2,3 (1/44)	21,1 (8/38)	70,8 (17/24)
	TAB250		10,3 (8/78)	57,9 (11/19)	77,8 (7/9)
Van de Vijver <i>et al.</i> , 2007	HercepTest™, CB11 ou TAB250	209	6,1 (3/49)	26,7 (20/75)	91,8 (78/85)
CISH positif si ≥ 5 copies du gène HER-2 par noyau dans > 50 % des cellules					
Van de Vijver <i>et al.</i> , 2007	HercepTest™, CB11 ou TAB250	209	10,2 (5/49)	28,0 (21/75)	92,9 (79/85)
CISH positif si > 5 copies du gène HER-2 par noyau dans > 50 % des cellules					
Di Palma <i>et al.</i> , 2007	HercepTest™	161	0,9 (1/109)	25,0 (4/16)	80,6 (29/36)
Ricardo <i>et al.</i> , 2007	SP3	161	16,2 (21/130)	85,7 (6/7)	95,8 (23/24)
	CB11		16,7 (21/126)	60,0 (6/10)	92,0 (23/25)
Médiane (étendue)§		1 657	0,4 (0-16,7)	31,6 (0-68,8)	91,8 (63,6-100)

N : nombre de sujets; les études en gras ont utilisé une sonde centromérique du chromosome 17 pour certains ou tous les cas (voir annexe E).

* Les résultats sont présentés en pourcentage avec les nombres réels entre parenthèses.

† Anticorps primaire utilisé pour l'IHC.

‡ Ces résultats ont également été publiés en 2002 par Dandachi et ses collaborateurs et par Hauser-Kronberger et Dandachi [2004].

§ Les résultats obtenus avec l'anticorps CB11 ont été utilisés lorsque deux anticorps ont été étudiés parallèlement dans une même étude.

|| Pour l'étude de Van de Vijver et ses collègues [2007], le résultat obtenu pour le point seuil de 5 copies par noyau a été utilisé pour le calcul de la médiane.

TABLEAU 10

Proportion* de résultats CISH positifs par score d'IHC selon l'anticorps utilisé				
ANTICORPS À L'IHC	NOMBRE DE SUJETS (NOMBRE D'ÉTUDES)	SCORE D'IHC		
		0 OU 1+	2+	3+
HercepTest™	553 (4)	0,0 (0-0,9)	38,9 (0-68,8)	85,4 (63,6-91,7)
CB11†	586 (4)	1,6 (0-16,7)	40,2 (21,1-60,0)	96,0 (70,8-100)

* Les valeurs médianes sont présentées en pourcentage avec entre parenthèses les valeurs minimales et maximales.

† L'anticorps CB11 de Novocastra a été utilisé dans deux études, alors que les autres ont utilisé celui de Zymed et de Ylem respectivement.

En comparant les trois proportions médianes de cas CISH positifs présentées au tableau 10 à celles des FISH positifs présentées au tableau 5 (section 4.1.2), on constate qu'elles diffèrent surtout pour la catégorie des cas équivoques à l'IHC (31,6 % *versus* 16,9 %). Les résultats sont toutefois difficilement comparables vu les différences dans les anticorps utilisés dans ces deux séries d'études. Comme les résultats varient non seulement en fonction de l'anticorps utilisé mais aussi en fonction de l'interprétation du CISH, l'estimation des moyennes pondérées n'a pas été effectuée (hétérogénéité importante).

4.2.4 En résumé, pour le CISH

- La modification du point seuil d'interprétation de ≥ 6 copies à > 5 copies du gène HER-2 par noyau augmente la sensibilité du CISH mais diminue légèrement sa spécificité et son exactitude (voir tableau 7);
- L'utilisation d'une sonde centromérique du chromosome 17 en complément de la sonde HER-2 permet l'obtention d'un haut niveau de concordance entre le CISH et le FISH; la sensibilité et la spécificité sont très bonnes (voir tableau 7);
- La concordance entre le CISH et le FISH semble très bonne pour les cas négatifs (0 ou 1+) et positifs (3+) à l'IHC, qu'une sonde CEP17 soit utilisée au non; cette concordance semble moins bonne chez les cas équivoques à l'IHC, à moins qu'une sonde centromérique soit utilisée (voir tableau 8);
- La proportion de résultats CISH positifs par score d'IHC est semblable à celle des résultats FISH positifs sauf pour les cas équivoques (IHC 2+) pour lesquels elle semble plus élevée (voir tableaux 9 et 5).

4.3 Hybridation *in situ* argentique

La technique du SISH est récente, et le nombre d'études disponibles est encore très limité. Dans une étude prospective, Dietel et ses collaborateurs [2007] ont évalué, par SISH et par FISH, 99 échantillons tumoraux obtenus de façon consécutive. Cette étude, de bonne qualité méthodologique, rapporte les résultats de la façon proposée dans les lignes directrices de l'ASCO/CAP, c'est-à-dire séparés en trois catégories : positive, équivoque et négative. Cette façon de présenter les résultats ne permet que le calcul d'une concordance globale entre les deux techniques. Celle-ci est excellente : 96,0 %. Ce n'est qu'en faisant abstraction des trois résultats équivoques³⁵ qu'ont pu être calculées les valeurs de performance présentées au tableau 11. Le SISH s'est avéré très spécifique (97,6 %) mais peu sensible (81,8 %). Toutefois, le calcul de cette dernière valeur porte sur un nombre restreint de cas FISH positifs, conséquence du choix d'une série consécutive de patientes.

35. Ces trois résultats équivoques concordaient toutefois entre le SISH et le FISH.

TABLEAU 11

Performance du SISH à détecter les cas d'amplification au FISH						
ÉTUDE	N	EXACTITUDE EN % (NOMBRES RÉELS)	SENSIBILITÉ EN % (NOMBRES RÉELS)	SPÉCIFICITÉ EN % (NOMBRES RÉELS)	VPP EN % (NOMBRES RÉELS)	VPN EN % (NOMBRES RÉELS)
Dietel <i>et al.</i> , 2007	96*	95,8 (92/96)	81,8 (9/11)	97,6 (83/85)	81,8 (9/11)	97,6 (83/85)
Downs-Kelly <i>et al.</i> , 2005 [†]	94	92,6 [‡]	82,9	100	np	np

N : nombre de sujets; np : non précisé.

* Trois résultats équivoques exclus de l'analyse.

[†] Il n'est pas possible d'extrapoler les nombres réels à partir des pourcentages fournis. L'ensemble de l'échantillon n'a peut-être pas été utilisé pour le calcul de l'exactitude, de la sensibilité et de la spécificité.

[‡] Intervalle de confiance à 95 % : de 85,3 à 97,0 %.

L'étude de Downs-Kelly et ses collègues [2005] fait référence au test EnzMet™ GenePro. Ce test permet d'évaluer sur une même lame le nombre de copies du gène HER-2 (composante SISH ou EnzMet™ du test) et le niveau d'expression de la protéine (par IHC). Contrairement à l'étude de Dietel et ses collègues [2007], aucune sonde centromérique du chromosome 17 n'a été utilisée dans ce cas. Le tableau 11 présente les résultats de performance globale du test EnzMet™ GenePro (c'est-à-dire pour les deux composantes) en référence au FISH (PathVysion®). Les résultats indiquent une excellente spécificité (100 %) de la technique EnzMet™ par rapport au test de référence mais une faible sensibilité (82,9 %). Les auteurs ont aussi comparé le nombre de copies de gène HER-2 obtenu par la composante EnzMet™ du test et celui obtenu par FISH : le coefficient de Pearson obtenu était excellent ($r = 0,95$; $p < 0,001$). Cette étude comporte toutefois certaines faiblesses méthodologiques importantes dont l'absence de description du mode de sélection des patientes et des échantillons tissulaires.

4.4 Réaction en chaîne de la polymérase en temps réel

Quatre études ont évalué la performance du PCR en temps réel à détecter les cas d'amplification du gène HER-2 au FISH (tableau 12). Les résultats du PCR en temps réel étaient considérés comme positifs si le rapport entre le gène HER-2 et le gène de référence était supérieur ou égal à 2,0; une seule étude [Merkelbach-Bruse *et al.*, 2003] n'a pas spécifié l'interprétation d'un résultat égal à 2,0, laissant supposer qu'aucun résultat de ce type n'a été observé. Le FISH a été effectué à l'aide de la trousse pharmDx™ et (ou) PathVysion®. Deux des quatre études ont utilisé des échantillons de convenance. Dans les deux cas, la sélection des cas a été faite en fonction d'un résultat d'IHC préalable. Les détails de ces études sont fournis à l'annexe E.

Pour l'ensemble des quatre études (total de 334 patientes), la sensibilité du PCR en temps réel est faible (médiane de 75,6 %) et sa spécificité très bonne (médiane de 97,8 %) (tableau 12). La prévalence d'une amplification au FISH varie de 16,1 à 38,8 % dans les quatre échantillons. Les valeurs prédictives positive et négative médianes sont bonnes : 92,6 et 90,9 %, respectivement. Ces résultats reflètent la performance du PCR en temps réel sans microdissection au laser préalable. Une seule étude [Merkelbach-Bruse *et al.*, 2003] a retesté les cas PCR/FISH discordants après microdissection au laser et a ainsi réduit ses résultats faux positifs. Cette étude a de cette manière obtenu les valeurs d'exactitude (98,0 %), de sensibilité (100 %) et de VPN (100 %) les plus élevées des quatre études.

TABLEAU 12

Performance du PCR en temps réel à détecter les cas d'amplification au FISH						
ÉTUDE	N	EXACTITUDE EN % (NOMBRES RÉELS)	SENSIBILITÉ EN % (NOMBRES RÉELS)	SPÉCIFICITÉ EN % (NOMBRES RÉELS)	VPP EN % (NOMBRES RÉELS)	VPN EN % (NOMBRES RÉELS)
Ginestier <i>et al.</i> , 2004*	85	84,7 (72/85)	69,7 (23/33)	94,2 (49/52)	88,5 (23/26)	83,1 (49/59)
Schlemmer <i>et al.</i> , 2004†	112	92,0 (103/112)	70,0 (21/30)	100 (82/82)	100 (21/21)	90,1 (82/91)
Suo <i>et al.</i> , 2004†	87	96,6 (84/87)	85,7 (12/14)	98,6 (72/73)	92,3 (12/13)	97,3 (72/74)
Merkelbach-Bruse <i>et al.</i> , 2003**†	50	92,0 (46/50)	81,2 (13/16)	97,1 (33/34)	92,9 (13/14)	91,7 (33/36)
Médiane		92,0	75,6	97,8	92,6	90,9
Moyenne pondérée (IC à 95 %)		91,3 (87,8-94,1)	74,2 (64,1-82,7)	97,9 (95,2-99,3)	93,2 (84,9-97,8)	90,8 (86,6-94,0)

IC : intervalle de confiance; N : nombre de sujets.

* Échantillon de convenance.

† PCR en temps réel effectué à l'aide de la trousse LightCycler-HER2/neu DNA Quantification Kit (Roche Molecular Biochemicals).

Par ailleurs, Monego et ses collaborateurs [2007] ont comparé plus spécifiquement les résultats de PCR en temps réel et de FISH de 71 cas équivoques à l'IHC (score 2+) et n'ont trouvé aucune corrélation significative entre les deux tests (test du chi carré de Yates; $p = 0,14$). Le PCR en temps réel et le FISH ont concordé dans une proportion de 60,6 %. Dans cette étude, on a observé deux fois plus de cas positifs par PCR en temps réel (33) que par FISH (15). La sensibilité et la spécificité du PCR en temps réel par rapport au test de référence (FISH) ont été de 66,7 % et 58,9 %, respectivement. La microdissection au laser n'a toutefois pas été utilisée dans cette étude.

La technique du RT-PCR en temps réel a quant à elle fait l'objet de nombreuses études de petites tailles aux plans d'étude parfois inappropriés. Une seule étude répondait à l'ensemble des critères d'inclusion de la présente évaluation [Ginestier *et al.*, 2004]. Les auteurs de cette étude ont quantifié dans les cellules tumorales des mêmes patientes le gène HER-2 lui-même (par PCR en temps réel) et l'ARN messager transcrit à partir de celui-ci (par RT-PCR en temps réel). Selon eux, le RT-PCR en temps réel performerait un peu mieux que le PCR en temps réel pour détecter les cas d'amplification tels qu'ils sont définis par FISH (test de référence). En effet, la sensibilité passe de 69,7 % (tableau 12) à 78,8 % (tableau D-6).

4.5 Variabilité interobservateurs

4.5.1 IHC

Les données de variabilité interobservateurs peuvent être rapportées de différentes façons. Dans le tableau 13, on présente les mesures de concordance et d'accord kappa entre deux ou trois observateurs pour l'interprétation de l'IHC. Dans chacune des six études présentées, les observateurs ont évalué les mêmes lames de façon indépendante. Les mesures sont calculées pour l'ensemble des scores (non regroupés). Les études ayant uniquement présenté des résultats de concordance ou d'accord interobservateurs pour les scores 0 ou 1+ *versus* 2+ ou 3+ ont été exclues de la présente évaluation. Néanmoins, les études de Santinelli et ses collaborateurs [2002], de McCormick et ses collaborateurs [2002] et de Sáez et ses collaborateurs [2006] avaient des échantillons surreprésentés

par les scores 2+/3+, alors que l'échantillon de Ginestier et ses collègues [2004] était surreprésenté par les scores 1+ et 2+.

Les résultats montrent qu'entre deux ou trois observateurs, l'interprétation des scores d'IHC concorde dans une proportion variant entre 71,3 et 90,5 % (tableau 13). La mesure d'accord kappa prend quant à elle des valeurs entre 0,57 et 0,84. Selon l'échelle de Landis et Koch [1977]³⁶, l'accord kappa interobservateurs serait de moyen à excellent.

Dans l'étude de Santinelli et ses collaborateurs [2002], trois observateurs bien expérimentés dans la lecture d'IHC effectuée à l'aide de l'anticorps TAB250 ont été introduits pour la première fois à l'interprétation du HercepTest™. Deux des trois anatomopathologistes s'étaient préalablement formés à l'aide de quelques (10) lames. La concordance la plus grande a été entre les résultats de ces deux anatomopathologistes (87 %) (tableau 13). L'accord interobservateurs a également été plus grand pour les 63 dernières lames évaluées (93,7 %; k = 0,911, IC à 95 % : de 0,82 à 1,00) que pour les 45 premières (77,8 %; k = 0,70, IC à 95 % : de 0,53 à 0,86). Le résultat de concordance entre deux des trois anatomopathologistes n'est pas présenté dans l'article. Par ailleurs, une relecture des mêmes lames 60 jours plus tard par les mêmes trois anatomopathologistes a donné lieu à des résultats discordants dans des proportions de 5,6, 10,2 et 25 % (concordance intra-observateur).

TABEAU 13

Variabilité interobservateurs de l'IHC				
ÉTUDE	N	ANTICORPS	CAS CONCORDANTS % (NOMBRES RÉELS)	KAPPA (IC À 95 %)
			Entre deux observateurs	
Santinelli <i>et al.</i> , 2002*†	108	HercepTest™	87,0 (94/108) 71,3 (77/108)‡	0,82 (0,71-0,94) 0,61 (0,50-0,73)‡
McCormick <i>et al.</i> , 2002	198§	HercepTest™	78	s. o.
Sáez <i>et al.</i> , 2006†	200§	HercepTest™	86	0,81 (0,75-0,88)
		CB11	84	0,78 (0,71-0,85)
Ricardo <i>et al.</i> , 2007	190	CB11	85,3 (162/190)	s. o.
		SP3	90,5 (172/190)	s. o.
			Entre trois observateurs	
Tsuda <i>et al.</i> , 2001b	101	HercepTest™	85,1 (86/101)	0,845
Ginestier <i>et al.</i> , 2004†	94§	HercepTest™	s. o.	0,57 (0,50-0,66)
		A0485	s. o.	0,71 (0,62-0,80)
		CB11	s. o.	0,62 (0,53-0,71)
		TAB250	s. o.	0,70 (0,63-0,77)

N : nombre de sujets; s. o. : sans objet.

* Résultats pour trois anatomopathologistes comparés deux à deux.

† Biais de sélection lié à la distribution des scores d'IHC ou échantillon de convenance.

‡ Un des deux anatomopathologistes ne s'était pas préalablement entraîné pour l'interprétation du HercepTest™.

§ Il n'est pas mentionné si tout l'échantillon a été utilisé pour le calcul de la variabilité interobservateurs.

36. Interprétation des mesures d'accord kappa selon Landis et Koch [1977] : accord médiocre (< 0,00), faible (0,00-0,20), passable (0,21-0,40), moyen (0,41-0,60), bon (0,61-0,80) et excellent (0,81-1,00).

Dans trois études [Ginestier *et al.*, 2004; McCormick *et al.*, 2002; Tsuda *et al.*, 2001b], la concordance entre les différents observateurs a également été examinée pour chacun des scores d'IHC individuels. McCormick et ses collaborateurs [2002] ont fait état d'une plus grande concordance interobservateurs pour les scores 0 et 3+ (83 et 95 %) que pour les scores 1+ et 2+ (75 et 62 %). De même, Ginestier et ses collaborateurs [2004] ont rapporté un meilleur accord interobservateurs pour les scores 0 ($k = 0,59-0,84$) et 3+ ($k = 0,76-0,91$) que pour les scores 1+ ($k = 0,24-0,49$) et 2+ ($k = 0,39-0,57$). Par ailleurs, dans cette étude, l'accord intra-observateur a été meilleur pour un spécialiste en pathologie du sein que pour deux spécialistes en pathologie chirurgicale.

Dans l'étude de Tsuda et ses collaborateurs [2001b], un accord parfait entre trois observateurs impliqués sur une base quotidienne dans ce genre de tests a été obtenu dans 85,1 % des cas (36 scores 0, 27 scores 1+, 5 scores 2+ et 18 scores 3+). Des accords partiels (deux observateurs en accord et un en désaccord) ont été obtenus neuf fois entre des scores 0 et 1+, cinq fois entre des scores 1+ et 2+ et une fois entre des scores 2+ et 3+.

Une autre étude [Sampatanukul *et al.*, 2005] qui ne figure pas au tableau 13 a évalué l'accord interobservateurs pour l'interprétation de tests d'IHC effectués dans un seul laboratoire selon un protocole standardisé. Neuf anatomopathologistes indépendants ont interprété chacun 274 lames sans connaître l'anticorps utilisé (A0485 ou CB11). La comparaison deux à deux des résultats des neuf anatomopathologistes a donné lieu à 36 mesures d'accord kappa variant entre 0,06 (IC à 95 % : de 0 à 0,14) et 0,75 (IC à 95 % : de 0,68 à 0,82). Selon l'échelle de Landis et Koch [1977], l'accord interobservateurs a été faible, passable, moyen et bon à une, dix, onze et quatorze occasions, respectivement. Les neufs anatomopathologistes pratiquaient dans sept endroits différents et effectuaient de quelques tests à une vingtaine par mois.

Par ailleurs, le groupe INQAT (Italian Network for Quality Assurance of Tumor Biomarkers) publiait en 2005 les résultats d'une étude visant à évaluer auprès de plusieurs laboratoires italiens la reproductibilité du système de scorage de Dako pour des tests d'IHC effectués à l'aide de la trousse HercepTest™ [INQAT, 2005]. Vingt-trois observateurs indépendants ont interprété 17 lames à deux occasions (intervalle de 4 mois). L'accord entre les résultats de chaque observateur et les valeurs de référence a été mesuré par un kappa pondéré³⁷ (K_w médian = 0,73; étendue de 0,42 à 0,97). Seulement quatre (17,4 %) des 23 observateurs ont obtenu un accord vraiment satisfaisant ($K_w \geq 0,80$) avec les valeurs de référence. Généralement, l'accord entre deux observateurs ne s'est pas montré satisfaisant (K_w médian = 0,69; étendue de 0,38 à 0,93). L'accord intra-observateur a été satisfaisant pour 15 (65,2 %) des 23 observateurs (K_w médian = 0,82; étendue de 0,57 à 1,00). Les lames avec les scores de 0 et 3+ ont été les plus facilement identifiables. Bien que cette étude ne réponde pas au critère de taille d'échantillon de la présente évaluation (≥ 50), les résultats sont présentés compte tenu de leur importance. Il en va de même pour l'étude suivante.

Le même groupe publiait en 2004 les premiers résultats du programme de contrôle de la qualité lancé en 2001 [INQAT, 2004]. Dix-neuf lames colorées ont circulé entre les mains de 12 anatomopathologistes. L'accord entre les résultats de chaque observateur et les valeurs de référence a été la plupart du temps satisfaisant ($K_w \geq 0,80$), et ce, pour le pourcentage de cellules marquées (K_w médian = 0,89; étendue de 0,73 à 0,96) et pour

37. La pondération est effectuée en fonction du degré de désaccord entre les observateurs [Landis et Koch, 1977].

l'intensité de la coloration membranaire (K_w médian = 0,84; étendue de 0,72 à 0,92). De même, l'accord entre observateurs comparés deux à deux s'est avéré généralement satisfaisant (K_w médian = 0,80; étendue de 0,51 à 0,98). Enfin, les anatomopathologistes ont su reproduire de façon satisfaisante les mêmes résultats en réinterprétant les mêmes lames six mois plus tard (variabilité intra-observateur; pourcentage de cellules marquées : K_w médian = 0,94, étendue de 0,80 à 0,96; intensité de la coloration membranaire : K_w médian = 0,86; étendue de 0,78 à 0,96). L'interprétation des catégories intermédiaires a toutefois été problématique pour les deux variables (cellules marquées et intensité de la coloration).

Enfin, dans une étude de Rhodes et ses collaborateurs [2002], 67 laboratoires participant au United Kingdom National External Quality Assessment Scheme for Immunocytochemistry (UK NEQAS-ICC) ont effectué selon leur méthode respective des tests d'IHC sur leurs tumeurs témoins respectives et sur quatre lignées cellulaires fournies par le UK NEQAS-ICC. Après coloration et interprétation par les laboratoires participants, les lames ont été interprétées par cinq évaluateurs indépendants du UK NEQAS-ICC. Tous les scores obtenus par les laboratoires participants ont été comparés aux scores médians obtenus par les cinq évaluateurs du UK NEQAS-ICC. Pour les 26 laboratoires qui ont utilisé le HercepTest™, il y a eu un accord total de 87 % ($k = 0,81$; IC à 95 % : de 0,67 à 0,95; $n = 45$) pour les tumeurs témoins et de 86 % ($k = 0,81$; IC à 95 % : de 0,72 à 0,90; $n = 104$) pour les lignées cellulaires. Pour 41 laboratoires participants ayant utilisé une autre méthode que le HercepTest™, l'accord a été significativement moins élevé, soit de 62 % ($k = 0,48$; IC à 95 % : de 0,30 à 0,65) pour les tumeurs témoins et de 66 % ($k = 0,53$; IC à 95 % : de 0,43 à 0,63; $n = 164$) pour les lignées cellulaires (valeurs de p du chi carré $< 0,001$ dans les deux cas).

4.5.2 FISH

La présente évaluation inclut seulement deux études qui ont rapporté des résultats de concordance interobservateurs pour le FISH (PathVysion®). La première étude a comparé dans deux laboratoires centraux les résultats de deux observateurs différents (concordance interobservateurs intra-laboratoire) [Press *et al.*, 2005]. Pour ce qui est de la deuxième étude, elle compare les résultats d'interprétation de deux anatomopathologistes indépendants [Tsuda *et al.*, 2001a]. Ces deux études ont obtenu des concordances et accords interobservateurs très élevés, c'est-à-dire de 96,6 % (57/59) ($k = 0,93$; IC à 95 % : de 0,84 à 1,00) et de 98,6 % (213/216) ($k = 0,94$), respectivement.

4.5.3 CISH

Trois études ont évalué l'accord interobservateurs pour le CISH. Sáez et ses collaborateurs [2006] ont évalué la concordance entre les résultats d'interprétation obtenus par deux observateurs indépendants. Vingt-deux des 200 lames ont été jugées non interprétables, dont deux par un seul observateur. Quarante-six résultats ont été interprétés positifs par les deux observateurs, alors que 129 ont été interprétés négatifs, pour une concordance globale de 97,5 % (195/200) ($k = 0,95$; IC à 95 % : de 0,91 à 0,99). De la même façon, Isola et ses collaborateurs [2004] ont rapporté des résultats de concordance entre deux observateurs pour 192 cas. Six lames (3,1 %) ont été jugées non interprétables par un seul des observateurs et une lame (0,5 %) a été interprétée positive par l'un et négative par l'autre. Cent lames ont été interprétées positives et 86 lames, négatives, par les deux observateurs, ce qui correspond à une concordance globale de 96,9 % (186/192). Par ailleurs, Vocaturo et ses collaborateurs [2006] ont rapporté une

mesure d'accord kappa entre deux observateurs jugée excellente ($k = 0,94$; IC à 95 % : de 0,94 à 1,00).

4.5.4 SISH

Pour Dietel et ses collaborateurs [2007], l'étude de corrélation de lecture par cinq anatomopathologistes a montré un bon niveau global d'accord interobservateurs pour 96 % (95/99) des cas testés ($k = 0,75$, IC à 95 % : de 0,52 à 0,99). Une interprétation à l'insu des résultats des autres anatomopathologistes a été utilisée. Quant à Downs-Kelly et ses collègues [2005], ils ont obtenu un excellent accord global entre cinq anatomopathologistes indépendants pour les résultats de SISH ($k = 0,96$). L'accord kappa entre observateurs comparés deux à deux variait de 0,93 à 1,00.

4.5.5 En résumé, pour la variabilité interobservateurs des tests

- Le niveau d'accord interobservateurs pour l'interprétation de l'IHC est très variable d'une étude à l'autre; d'après la statistique kappa, il serait de faible à excellent, mais la proportion de résultats concordants entre deux observateurs ne dépassent généralement pas 90 %;
- L'accord interobservateurs semble plus faible pour les scores 1+ et 2+ à l'IHC;
- L'accord interobservateurs des tests d'ISH (FISH, CISH et SISH) semble très bon.

4.6 Reproductibilité interlaboratoires

Cette section rapporte les résultats de variabilité interlaboratoires de l'IHC, du FISH et du CISH d'une manière surtout narrative étant donné que les plans d'étude et la façon dont les résultats sont présentés diffèrent grandement d'une étude à l'autre. Les détails des plans d'étude sont présentés en annexe E.

4.6.1 IHC

Dans cette section sont rapportés les résultats de neuf études qui ont examiné la reproductibilité interlaboratoires de l'IHC. La plus récente est une étude circulaire interlaboratoires (*ring study*) incluant cinq centres de référence internationaux [Dowsett *et al.*, 2007b]. Un consensus complet entre les cinq centres a été atteint pour neuf (45,0 %) des 20 échantillons évalués à l'aide de la trousse HercepTest™. Pour huit échantillons, au moins un centre a rapporté un résultat négatif (0/1+) alors que les autres ont rapporté un résultat équivoque (2+), et pour trois échantillons, au moins un centre a rapporté un résultat positif (3+) alors que les autres ont rapporté un résultat équivoque (2+).

Fitzgibbons et ses collaborateurs [2006] ont analysé les résultats d'une enquête du CAP qui consistait à envoyer des coupes de fragments tissulaires montés sur micromatrices (TMAs) à des centres participants pour qu'ils effectuent un test d'IHC selon la méthode employée dans leur laboratoire respectif. En 2004 et en 2005, un total de 160 échantillons (16 TMAs) ont été envoyés. Il y a eu 111 (69,4 %) échantillons pour lesquels un résultat consensuel a été obtenu auprès d'au moins 90 % des participants. Seulement ces 111 échantillons ont été utilisés pour l'analyse officielle de la performance. En 2004, 95,1 % des 102 laboratoires participants ont obtenu une performance satisfaisante (≥ 90 % de résultats corrects); en 2005, cette proportion a été de 91,5 % pour les 141 laboratoires participants. Trois des cinq participants qui ont obtenu une performance insatisfaisante en 2004 ont participé à nouveau en 2005;

deux de ces trois laboratoires ont obtenu un score de performance parfait en 2005. Il faut toutefois noter que la concordance des résultats a été calculée en comparant des scores négatifs (0 ou 1+) ou des scores positifs (2+ ou 3+), évitant ainsi la difficulté de différencier les équivoques des vrais positifs.

L'étude de Hashizume et ses collaborateurs [2003] a comparé les résultats d'IHC (HercepTest™) obtenus par deux laboratoires pour les mêmes 76 cas. La concordance globale pour les quatre scores d'IHC a été de 84,2 % (k = 0,78). En regroupant les deux scores négatifs (0 et 1+) en une seule catégorie, la concordance aurait été de 94,7 %.

Dowsett et ses collaborateurs [2003] ont comparé les résultats d'IHC de trois laboratoires centraux. La concordance globale des résultats a été de 71,7, 76,7 et 85,0 % pour chacune des comparaisons deux à deux. Aucun score 0 n'était inclus dans cet échantillon de 60 cas.

Cinq études ont évalué la concordance entre les résultats d'IHC de plusieurs laboratoires locaux *versus* ceux d'un laboratoire central, dont trois pour des résultats positifs (3+) uniquement. Les résultats des cinq études sont présentés au tableau 14. Deux de ces études [Perez *et al.*, 2006; Roche *et al.*, 2002] concernaient uniquement des cas initialement testés IHC 3+ par des laboratoires locaux pour l'entrée dans l'étude NCCTG Intergroup Trial N9831 sur le traitement adjuvant par trastuzumab. Roche et ses collaborateurs [2002] ont présenté les résultats des 119 premières patientes retestées par un laboratoire central, alors que Perez et ses collègues [2006] ont rapporté les résultats de concordance avec le laboratoire central obtenus après un amendement au protocole³⁸ de cet essai clinique. Perez et ses collègues [2006] ont rapporté une concordance moyenne entre le laboratoire central et les laboratoires locaux pour les scores 3+ (tableau 14). Celle-ci était toutefois meilleure lorsque le laboratoire local utilisait, comme le laboratoire central, la trousse HercepTest™, plutôt que d'autres anticorps. Roche et ses collègues [2002] n'ont aussi rapporté qu'un niveau moyen de concordance entre les scores 3+ (HercepTest™) d'un laboratoire local et ceux d'un laboratoire central.

TABEAU 14

Proportion* de résultats d'IHC obtenus dans des laboratoires locaux concordant avec ceux d'un laboratoire central					
ÉTUDE	N	SCORE D'IHC			
		0	1+	2+	3+
Perez <i>et al.</i> , 2006	1 063	s. o.	s. o.	s. o.	81,6 (867/1063) [†]
		s. o.	s. o.	s. o.	75,0 (477/636) [‡]
Roche <i>et al.</i> , 2002 [§]	59	s. o.	s. o.	s. o.	74,6 (44/59)
Paik <i>et al.</i> , 2002 [§]	104	s. o.	s. o.	s. o.	78,8 (82/104)
Reddy <i>et al.</i> , 2006	973	33,9 (76/224)	53,7 (101/188)	26,1 (48/184)	76,9 (290/377)
Papadopoulos <i>et al.</i> , 2007	369	85,0 (17/20)		80,5 (272/338)	63,6 (7/11)

N : nombre de sujets; s. o. : sans objet.

* Les proportions sont rapportées en pourcentage avec les nombres réels entre parenthèses; le dénominateur des nombres réels est le résultat obtenu par les laboratoires locaux.

[†] La trousse HercepTest™ a été utilisée dans le laboratoire central et dans les laboratoires locaux.

[‡] La trousse HercepTest™ a été utilisée dans le laboratoire central mais pas dans les laboratoires locaux.

[§] La trousse HercepTest™ a été utilisée dans le laboratoire central mais pas toujours dans les laboratoires locaux.

^{||} La trousse HercepTest™ a été utilisée dans le laboratoire central mais l'information n'est pas connue pour les laboratoires locaux.

38. L'amendement au protocole exigeait la confirmation du statut HER-2 positif par le laboratoire central pour l'entrée dans l'étude.

De façon similaire, Paik et ses collègues [2002] ont retesté dans un laboratoire central les 104 premières patientes IHC 3+ à entrer dans l'étude NSABP Protocole B-31 sur le traitement adjuvant par trastuzumab. Seulement une proportion moyenne des patientes initialement testées positives dans un laboratoire local ont été confirmées positives par le laboratoire central (tableau 14) et, en plus, 18,3 % des patientes n'ont pu être confirmées positives ni par IHC ni par FISH par le laboratoire central. Par ailleurs, il y a eu moins de discordance entre les résultats d'IHC lorsque le laboratoire local effectuait au moins 100 tests par mois que s'il en effectuait moins de 100 (24,0 % *versus* 3,4 % de résultats négatifs d'IHC et de FISH). Par contre, 31 % des tests effectués dans des laboratoires de petit volume ont utilisé une méthode autre que le HercepTest™ *versus* 3 % pour les laboratoires de plus grand volume. La plus grande discordance observée par les laboratoires ayant un petit volume de tests pourrait être en partie attribuable à la méthode utilisée.

Reddy et ses collaborateurs [2006] ont comparé les résultats d'IHC avec la trousse HercepTest™ de plusieurs laboratoires locaux à ceux obtenus par un laboratoire central. La concordance pour les quatre scores d'IHC obtenus était globalement de médiocre à faible (de 26,1 à 76,9 %), comme on peut le constater au tableau 14.

Enfin, Papadopoulos et ses collaborateurs [2007] ont comparé les résultats d'IHC de plusieurs laboratoires régionaux effectuant moins de 100 tests par an à ceux d'un laboratoire central. Les cas étaient référés par les laboratoires régionaux pour un examen au FISH par le laboratoire central. Les cas soumis au laboratoire central étaient surtout des cas 2+ à l'IHC (91,6 %), mais le laboratoire central ne connaissait pas les résultats obtenus par les laboratoires régionaux. Il y a eu seulement 63,6 % des cas IHC 3+ qui ont concordé avec les résultats du laboratoire central (tableau 13). Il est possible que les différences dans les protocoles utilisés puissent être à l'origine de certains résultats discordants.

4.6.2 FISH

Le nombre d'études qui ont évalué la reproductibilité interlaboratoires du FISH est plus restreint; six font l'objet de notre évaluation. La plus récente présente les résultats d'une étude pilote du United Kingdom National External Quality Assessment Scheme (UK NEQAS) [Bartlett *et al.*, 2007]. En 2004 et en 2005 et pour trois rondes, des échantillons provenant de cinq lignées cellulaires ont été envoyés à six laboratoires de référence et à 31 autres laboratoires participants dans 12 pays différents pour être testés par FISH. Aucun des 116 résultats de FISH retournés par les laboratoires de référence n'a été incorrect. Parmi les résultats obtenus par les autres laboratoires, 60 % étaient appropriés, 18 % étaient acceptables et 22,4 % étaient inappropriés³⁹. La plupart des résultats inappropriés référaient à une lignée cellulaire de faible amplification.

La deuxième étude est l'étude circulaire interlaboratoires (*ring study*) de Dowsett et ses collaborateurs [2007] impliquant cinq centres de référence internationaux. Un consensus parfait entre les cinq centres a été atteint pour 16 (80,0 %; 6 négatifs et 10 positifs) des 20 échantillons évalués à l'aide de la trousse PathVysion®. Pour les quatre cas discordants, le rapport HER-2/CEP17 se situait entre 1,7 et 2,3 à au moins un des centres.

Une troisième étude a présenté les résultats des cinq premières années (2000-2004) d'un programme d'enquête du CAP sur la compétence à réaliser et à interpréter un FISH

39. Définitions d'un résultat « approprié », « acceptable » et « inapproprié » fournies dans le résumé d'article à l'annexe E.

[Persons *et al.*, 2006]. Celui-ci consistait à l'envoi biennuel aux laboratoires participants d'une lame à tester par FISH. Au total, les participants (entre 35 et 139 selon l'année) ont dû analyser quatre cas de forte amplification et quatre cas nettement négatifs. Ces lames ont été interprétées correctement dans une proportion de 94 % et de 97 %, respectivement. En 2002, un échantillon de faible amplification a été utilisé pour tester les participants; seulement 56 % des 89 participants ont obtenu un résultat positif. En 2003, le même échantillon qu'en 2002 a été soumis à nouveau aux participants, mais en ajoutant pour la première fois une nouvelle catégorie d'interprétation (équivoque/ limite). Parmi les 83 participants aux deux rondes, 8,4 % ont interprété la lame comme équivoque, 60,2 % ont obtenu un résultat identique et 31,3 % ont obtenu un résultat différent (23 sur 26 sont passés d'un résultat négatif à un résultat nettement positif). Seulement trois laboratoires ont changé leur résultat dans la mauvaise direction. En 2004, deux échantillons présentant un rapport HER-2/CEP17 de 1,5 et 1,2 (négatifs) ont été classés de façon inappropriée comme positifs par respectivement 8,3 et 1,8 % des 108 laboratoires, ou comme équivoques par 19,5 et 7,4 % des participants. Dans cette étude, les sondes et les points seuils d'interprétation utilisés variaient toutefois d'un laboratoire à l'autre.

En 2006, Perez et ses collaborateurs [2006] rapportaient les résultats de 813 cas d'abord testés positifs dans un laboratoire local (parmi plusieurs faisant partie de l'étude) et ensuite retestés par un laboratoire central après un amendement au protocole pour l'admissibilité à l'étude NCCTG N9831 pour le traitement adjuvant au trastuzumab. Le laboratoire central a pu confirmer que le résultat était positif dans 716 (88,1 %) de ces 813 cas. Pour cette étude, la trousse PathVysion® a été utilisée dans le laboratoire central mais pas toujours dans les laboratoires locaux.

Une autre étude [Press *et al.*, 2005] comparant les résultats de plusieurs laboratoires locaux à ceux d'un laboratoire central a rapporté une mesure d'accord kappa de 0,83 (IC à 95 % : de 0,73 à 0,93) et une concordance globale de 92,4 %. Cette concordance était plus élevée pour les cas testés négatifs (98,8 %; 80 cas sur 81) que pour les cas testés positifs (82,0 %; 41 cas sur 50) dans les laboratoires locaux. La méthode de détection employée par les laboratoires locaux n'était pas spécifiée. Cette même étude a également rapporté une concordance globale de 98,7 % ($k = 0,97$; IC à 95 % : de 0,91 à 1,00) pour 76 cas testés dans deux laboratoires centraux à l'aide de la trousse PathVysion®.

Dans la dernière étude, Dybdal et ses collaborateurs [2005] ont obtenu une concordance de 91,8 % et une mesure d'accord kappa de 0,79 (IC à 95 % : de 0,72 à 0,85) pour 488 cas classés positifs ou négatifs à l'aide de la trousse PathVysion® par deux laboratoires dont au moins un de référence.

4.6.3 CISH

Une étude circulaire interlaboratoires (*ring study*), impliquant cinq centres internationaux mais différente de celle présentée pour l'IHC et le FISH (sections 4.6.1 et 4.6.2), a évalué la reproductibilité du CISH pour 211 cas [Van de Vijver *et al.*, 2007]. En ne tenant pas compte de quatre résultats insatisfaisants (aucun signal) obtenus dans l'un ou l'autre des laboratoires, on obtient une concordance de 90,7 % (185/204) entre les résultats positifs et négatifs (≥ 6 copies du gène HER-2 par noyau *versus* ≤ 5 copies). Si on utilise plutôt ≥ 5 copies du gène HER-2 par noyau comme résultat positif *versus* < 5 copies pour un résultat négatif, la corrélation augmente à 92,2 %.

4.6.4 En résumé, pour la reproductibilité interlaboratoires des tests

- La reproductibilité interlaboratoires de l'IHC est globalement de faible à moyenne et semble meilleure entre les laboratoires qui utilisent le même anticorps;
- Globalement, la reproductibilité des résultats de FISH est bonne entre les laboratoires locaux *versus* les laboratoires centraux et excellente entre laboratoires centraux;
- Les résultats sur la reproductibilité interlaboratoires du CISH sont limités mais semblent bons;
- Aucune étude n'a évalué la reproductibilité interlaboratoires du SISH, du PCR ou du RT-PCR en temps réel.

On reconnaît maintenant la nécessité de déterminer le statut HER-2 de toutes les femmes diagnostiquées avec un cancer infiltrant du sein. Dans les lignes directrices publiées, l'IHC et le FISH sont les techniques systématiquement recommandées comme outil diagnostique. L'IHC vise à détecter une surexpression de la protéine HER-2 et le FISH, l'amplification du gène. Certains pays ont adopté l'une ou l'autre de ces deux techniques comme test initial, alors que d'autres comme le Canada maintiennent à ce titre l'IHC⁴⁰. De façon universelle, un résultat équivoque d'IHC (score 2+) nécessite la confirmation d'une amplification du gène par hybridation *in situ* (ISH) avant d'établir l'admissibilité d'une patiente au trastuzumab. Au Canada, dans le contexte clinique actuel, on peut envisager l'utilisation d'une des trois méthodes suivantes : le FISH, le CISH ou le SISH [Hanna *et al.*, 2007a]. Le PCR en temps réel est une option utilisée en recherche. Bien qu'imparfait, et il en sera discuté plus loin, le test de référence généralement reconnu est le FISH. Le présent rapport analyse donc la performance de chacun des tests par rapport à ce dernier.

La distribution des scores d'IHC

Dans un premier temps, la distribution des scores d'IHC pour une population de cas de cancer du sein a été estimée. Les résultats de l'analyse montrent que près des trois quarts (73,1 %) des patientes obtiennent des scores 0 ou 1+ à l'IHC. Ce résultat est semblable à celui (71,7 %) obtenu dans une méta-analyse bayésienne réalisée par Dendukuri et ses collaborateurs [2007]. Dans un rapport plus détaillé de cette étude [Dendukuri et Brophy, 2006], les auteurs avaient également rapporté une proportion de 75,3 % de scores 0 ou 1+ chez 304 nouveaux cas ou récidives de cancer du sein testés au Centre universitaire de santé McGill (CUSM) sur une période d'un an.

Quant à la proportion de patientes surexprimant la protéine HER-2 (score 3+) estimée dans la présente évaluation (13,7 %)⁴¹, elle est inférieure à celle obtenue dans la méta-analyse bayésienne de Dendukuri et ses collègues [2007] (16,2 %). Par contre, la proportion de score 3+ rapportée pour les patientes testées au CUSM était de 11,2 % [Dendukuri et Brophy, 2006].

La concordance entre les résultats IHC négatifs et ceux du FISH

La présente évaluation a aussi montré que cette majorité de cas testés négatifs (scores 0 ou 1+) à l'IHC se révèlent également négatifs au test FISH. En considérant ce dernier résultat (FISH) comme la valeur de référence, on parlerait d'une proportion médiane de « faux négatifs » à l'IHC d'environ 2,6 % (2,0 % pour les scores 0 et 3,6 % pour les scores 1+). Deux autres études secondaires (méta-analyse et revue systématique) menées par des unités d'évaluation des technologies de la santé [Dendukuri *et al.*, 2007; LBI-HTA, 2007] ont également examiné la proportion de résultats FISH positifs chez les cas négatifs à l'IHC et ont rapporté des résultats similaires (résultats résumés au tableau D-7).

40. Les raisons pour maintenir un test d'IHC en première intention incluent le fait que la protéine constitue la cible du traitement, ainsi que certains enjeux organisationnels et économiques (D^{re} Wedad Hanna, communication personnelle, mars 2008).

41. La moyenne pondérée a toutefois été de 11,7 %.

Il est toutefois difficile de confirmer si les cas négatifs à l'IHC mais positifs au FISH représentent tous de véritables faux négatifs. L'interprétation du résultat de FISH inclut une zone équivoque et l'analyse a été effectuée en considérant positifs tous les résultats compris dans la moitié supérieure de cette zone équivoque (rapport HER-2/CEP17 entre 2,0 et 2,2). De plus, il y aurait actuellement peu de preuves disponibles permettant d'établir si ces cas discordants (IHC-/FISH+) répondent au trastuzumab [Wolff *et al.*, 2007]. Il est nécessaire de rappeler dans ce contexte que le trastuzumab cible la protéine et non le gène.

La concordance entre les résultats IHC positifs et ceux du FISH

Comparés aux résultats négatifs, les résultats positifs d'IHC (score 3+) corrélaient moins bien avec les résultats de FISH. La présente évaluation a montré qu'environ 89,9 % des cas rapportés positifs à l'IHC obtiennent un résultat FISH positif. Cette valeur se situe entre celle obtenue par le LBI-HTA [2007] (87,9 %) et celle obtenue par Dendukuri et ses collaborateurs [2007] (92,4 %) (tableau D-7). Il y aurait donc environ 10,1 % des cas testés positifs à l'IHC (score 3+) qui ne concorderaient pas avec le « test de référence ».

Toutefois, le fait de considérer les cas IHC 3+ systématiquement comme de faux positifs s'ils ne présentent pas d'amplification au FISH est controversé [Leong et Leong, 2006; Sorscher *et al.*, 2004]. Bien que les anatomopathologistes s'entendent pour dire que les cas IHC 3+ ne présentant pas d'amplification du gène HER-2 au FISH sont souvent de faux positifs résultant de difficultés techniques (mauvaise calibration de la méthode) ou d'interprétation, ils concèdent qu'une vraie surexpression de la protéine HER-2 puisse s'observer sans amplification du gène. Cette surexpression protéique pourrait être causée entre autres par des mécanismes d'activation transcriptionnels [Hollywood et Hurst, 1993; Pasleau *et al.*, 1993] ou par une polysomie 17 [Hyun *et al.*, 2007; Ma *et al.*, 2005; Varshney *et al.*, 2004; Lal *et al.*, 2003], quoique cette dernière hypothèse ait été contestée [Corzo *et al.*, 2007; Dal Lago *et al.*, 2006].

D'après l'ASCO et le CAP, les données cliniques portant spécifiquement sur la réponse au trastuzumab des patientes présentant une surexpression de la protéine sans amplification du gène (IHC 3+/FISH-) ne sont toujours pas disponibles [Wolff *et al.*, 2007]. Théoriquement, comme la cible visée par le traitement est la protéine et que les patientes testées IHC 3+ ont été admises dans les essais cliniques sur le trastuzumab sans qu'il ait été nécessaire de confirmer leur statut HER-2 par ISH, la littérature actuelle ne justifie pas l'exclusion de ces femmes au traitement par le trastuzumab. Certains auteurs suggèrent par contre que l'expression de la protéine HER-2 et l'amplification du gène soient toutes deux systématiquement évaluées jusqu'à ce que de telles données probantes soient disponibles [Varshney *et al.*, 2004].

Par ailleurs, pour les scores 3+ à l'IHC, la vaste majorité des études évaluées dans ce rapport (24/27) n'ont pas obtenu le niveau de concordance avec le FISH suggéré (95 %) dans les lignes directrices pour la validation d'un test [Hanna *et al.*, 2007b; Wolff *et al.*, 2007]. Par contre, cette concordance attendue vise probablement davantage les résultats d'amplification non équivoques (rapport HER-2/CEP17 > 2,2) que les résultats de rapport HER-2/CEP17 supérieur ou égal à 2,0 utilisés dans la présente analyse.

La concordance des tests selon leur lieu d'exécution

La discordance entre les résultats d'IHC et de FISH tend toutefois à s'atténuer lorsque les tests sont effectués dans des laboratoires centraux ou de référence plutôt que dans des laboratoires locaux. Les résultats récemment publiés par O'Malley et ses collègues [2008] confirment également les conclusions de la présente évaluation. Dans cette

nouvelle étude d'envergure menée au Canada, entre 88,9 et 90,3 % des résultats IHC 3+ obtenus de laboratoires centraux (d'après l'interprétation traditionnelle et selon l'anticorps utilisé) ont concordé avec le résultat du FISH, comparativement à 86,1 % des résultats positifs de laboratoires locaux.

De plus, plusieurs études ont montré qu'une proportion importante (entre 18,4 et 36,4 %) des résultats positifs (3+) d'IHC obtenus dans des laboratoires locaux ne concordaient pas avec les résultats d'IHC réalisés dans un laboratoire central. L'utilisation de protocoles et d'anticorps différents est probablement responsable en partie de cette discordance. Elle demeure néanmoins importante même en utilisant une trousse standardisée, d'une part parce que le protocole n'est pas toujours scrupuleusement suivi à la lettre par les laboratoires et, d'autre part, en raison de la subjectivité des critères d'interprétation du test (intensité et hétérogénéité de la coloration membranaire et pourcentage de cellules positives). D'ailleurs, dans l'étude récente de O'Malley et ses collaborateurs [2008], l'écart entre les résultats des laboratoires locaux *versus* ceux des laboratoires centraux ne diminue pas avec l'utilisation d'une trousse HercepTest™.

La reproductibilité interobservateurs et interlaboratoires

La présente évaluation montre que le niveau d'accord interobservateurs pour l'interprétation de l'IHC est variable. En tenant compte de l'échelle d'interprétation de la statistique kappa, l'accord peut être de faible à excellent. Et si la proportion de résultats concordants est examinée, l'accord ne paraît pas très bon puisqu'il ne dépasse généralement pas 90 %. Toutefois, la variabilité entre observateurs pourrait diminuer avec l'expérience.

Contrairement à celle de l'IHC, l'interprétation des tests d'ISH semble moins sujette à une variabilité interobservateurs, probablement en raison de sa nature quantitative. Il en est de même pour la reproductibilité interlaboratoires des tests d'ISH. Ces tests seraient possiblement moins affectés par les variations au protocole. Le nombre minimal de tests à effectuer annuellement par laboratoire recommandé dans les lignes directrices canadiennes est d'ailleurs moins élevé pour le FISH que pour l'IHC (100 *versus* 250) [Hanna *et al.*, 2007a]. Les résultats rapportés montrent toutefois que la reproductibilité des résultats de FISH est plus faible dans la zone équivoque. Les lignes directrices canadiennes recommandent d'ailleurs de refaire le compte des signaux ou de reprendre le test sur un autre échantillon lorsque celui-ci est équivoque (rapport HER-2/CEP17 de 1,8 à 2,2) [Hanna *et al.*, 2007a].

L'analyse coût-efficacité des algorithmes décisionnels

Face à la problématique de la variabilité des résultats des tests d'IHC, des chercheurs se sont interrogés sur l'efficacité de tester d'emblée toutes les patientes à l'aide du FISH, option performante mais également coûteuse selon une étude montréalaise menée par Dendukuri et ses collaborateurs [2007]. Selon leur analyse, la stratégie la plus efficace serait de retester tous les cas IHC 2+ et 3+ à l'aide du FISH. Dans cette étude, le coût du test FISH utilisé pour effectuer l'analyse économique était toutefois de 467 \$ CA, ce qui est plus élevé que le coût actuel du test.

Or, dans le rapport plus détaillé de cette étude, Dendukuri et Brophy [2006] ont estimé que si le coût du FISH diminuait sous les 200 \$, ce qui est environ le coût actuel du test, la stratégie de tester tous les cas uniquement à l'aide du FISH serait la plus efficace.

On peut toutefois émettre certaines réserves par rapport à une analyse qui ne tient pas compte des possibilités de discordances biologiques, c'est-à-dire d'une véritable

surexpression protéique sans amplification du gène. D'ailleurs, l'analyse coût-efficacité de Elkin et ses collaborateurs [2004] avait été critiquée [Sorscher *et al.*, 2004] pour avoir considéré faux positifs l'ensemble des cas IHC 3+/FISH-.

Lidgren et ses collaborateurs [2008] viennent toutefois de publier une nouvelle étude coût-efficacité des différentes stratégies. Ils concluent que de tester initialement par FISH tous les cas de cancer du sein de stade précoce est une option efficiente du point de vue sociétal. Il faudrait toutefois voir si la prévalence des cas d'amplification (25 %) utilisée dans cette analyse n'est pas trop élevée et voir comment elle peut affecter les résultats. Il faut également noter que les paramètres de concordance entre le FISH et l'IHC utilisés proviennent de l'étude de Elkin et ses collaborateurs [2004], une étude qui porte uniquement sur les cancers du sein métastatiques.

La présente évaluation n'avait pas pour objectif d'effectuer une analyse économique des stratégies utilisées pour tester le statut HER-2. L'AETMIS est toutefois d'avis que les paramètres de base (prévalence, discordance) à utiliser dans une analyse économique sont très importants et doivent refléter autant que possible la situation québécoise. Or, ce type de données ne semblent pas avoir été systématiquement comptabilisées au Québec.

La prévalence de l'amplification du gène HER-2

L'ASCO et le CAP sont d'avis que la prévalence de l'amplification du gène HER-2 chez les cas de cancer du sein se situe entre 18 et 20 %. Ces chiffres sont fondés sur les résultats de deux études [Owens *et al.*, 2004; Yaziji *et al.*, 2004] comportant possiblement des biais de sélection (voir annexe E). Néanmoins, Tubbs et ses collaborateurs [2007] ont obtenu dans leur étude une prévalence de 19 % parmi 742 cas consécutifs soumis à un test FISH de première intention.

Par contre, la prévalence d'un test FISH positif calculée chez les cas inclus dans les études sélectionnées pour estimer la distribution des scores d'IHC (section 4.1.1) est de seulement 14,6 %.

Le CISH comme technique alternative au FISH

Comme option de rechange au FISH, les lignes directrices canadiennes laissent place depuis 2007 à une technique moins coûteuse et qui ne requiert pas d'équipement spécialisé : le CISH. Elle doit toutefois avoir été préalablement validée par le laboratoire à l'aide du FISH.

Bien que peu nombreuses, les études qui ont comparé ces deux techniques ont obtenu une très bonne concordance lorsque les sondes du gène HER-2 et du centromère du chromosome 17 ont été utilisées conjointement (sensibilité de 100 % et spécificité de 98,8 %). Dans les études où aucune correction pour l'aneusomie 17 n'a été appliquée, la concordance du CISH et du FISH a généralement été sous le seuil des 95 %. Or, il semble qu'en pratique, la sonde centromérique du chromosome 17 ne soit pas systématiquement utilisée dans les laboratoires puisqu'elle nécessite une seconde réaction d'hybridation, impliquant coûts et temps supplémentaires.

Certes, les lignes directrices canadiennes n'interdisent pas l'utilisation du FISH à une seule sonde (sans sonde centromérique). Mais, les points seuils définis par le fabricant pour l'interprétation du CISH à une seule sonde sont différents de ceux recommandés pour le FISH [Hanna *et al.*, 2007a]. L'utilisation de seuils différents a été soulignée par certains auteurs comme facteur de discordance entre les résultats de CISH et de FISH [Cayre *et al.*, 2007]. Bien que les résultats rapportés dans le présent rapport semblent indiquer que l'ajout d'une sonde centromérique du chromosome 17 en complément de

la sonde HER-2 est justifié, il n'a pas été évalué si l'utilisation des mêmes seuils pour le CISH et le FISH à une seule sonde aurait permis d'obtenir des résultats de meilleure concordance.

Le SISH comme technique alternative au FISH

Comme le CISH, la technique du SISH a récemment été incluse dans les lignes directrices canadiennes [Hanna *et al.*, 2007a]. Cette recommandation est probablement davantage fondée sur l'expérience des experts, puisque seulement deux études publiées dans des revues scientifiques avec comité de lecture ont été repérées. Parmi ces deux études, une seule fait référence à la technique automatisée de Ventana, une technique qui permettrait de diminuer considérablement le temps technique nécessaire.

À première vue, le SISH semble prometteur compte tenu de sa concordance élevée (96 %) avec le FISH. Cependant, étant donné que la majorité des patientes incluses dans les deux études rapportées sont négatives au FISH (valeur de référence), ce résultat reflète surtout l'excellente spécificité de la technique. La performance du SISH semble toutefois moins fiable lorsqu'il s'agit de détecter les cas positifs au FISH. En effet, bien que la sensibilité de la technique ne soit calculée que sur un petit échantillon, elle paraît faible (de l'ordre de 82 %).

Les techniques utilisées en recherche

En dernier lieu, la performance du PCR en temps réel à détecter une amplification du gène HER-2 telle qu'elle est définie par FISH a été évaluée. Les résultats ont montré que cette technique est très spécifique (97,8 %) mais peu sensible (75,6 %). Il est très probable que les proportions élevées de faux négatifs soient attribuables à la contamination des échantillons par des cellules stromales [Hauser-Kronberger et Dandachi, 2004]. La nécessité d'utiliser diverses techniques telles que la microdissection au laser pour isoler les cellules cancéreuses alourdit la technique et limite son utilisation aux centres spécialisés. C'est d'ailleurs le principal obstacle à l'utilisation du PCR en temps réel dans un contexte clinique. Toutefois, si les échantillons de cellules tumorales à analyser sont isolés, le PCR en temps réel semble offrir une très bonne performance (sensibilité de 100 % et spécificité de 97,1 %). Cependant, ce résultat a été tiré d'une seule étude de petite taille [Merkelbach-Bruse *et al.*, 2003]. D'ailleurs, l'intérêt suscité par le PCR en temps réel semble s'amoinrir avec le temps, comme en témoigne le déclin du nombre de publications à son sujet dans les dernières années. De plus, aucune ligne directrice nationale incluant cette technique n'a été repérée dans la littérature.

Il est trop tôt pour se prononcer sur la performance du RT-PCR en temps réel et sur sa place dans le diagnostic du statut HER-2. Cette technique devra faire l'objet d'études de bonne qualité méthodologique sur un plus grand nombre de sujets.

Les tests effectués au Québec

Les cinq techniques diagnostiques relatives à la détermination du statut HER-2 évaluées dans ce rapport (IHC, FISH, CISH, SISH et RT-PCR en temps réel) sont utilisées au Québec soit dans un contexte clinique, soit dans un contexte de recherche. En ce qui concerne les tests d'IHC, la pratique est répartie dans plus d'une trentaine de laboratoires⁴² dont une bonne proportion effectueraient un nombre de tests annuel en deçà du seuil recommandé dans les lignes directrices canadiennes (voir sections 2.4.2 et 2.5). Afin d'atteindre le nombre minimal de tests recommandé (250 cas testés annuellement), les laboratoires pourraient songer à centraliser davantage leurs

42. C'est trois fois plus de laboratoires qu'en Ontario.

activités. D'autant plus que les anticorps et protocoles utilisés varient actuellement d'un laboratoire à l'autre. Une meilleure centralisation des tests d'IHC permettrait fort probablement d'en améliorer la qualité. Plus un laboratoire effectue d'analyses de ce type, meilleure est sa performance. Quant aux six établissements de la province qui effectuent des tests FISH, ils atteindraient le nombre minimal de tests (pour 100 cas) recommandé dans les lignes directrices canadiennes.

L'algorithme à deux tests d'IHC et deux anticorps

Plusieurs laboratoires au Québec effectueraient, pour chaque cas de cancer du sein, deux tests d'IHC avec des anticorps dirigés contre des épitopes différents de la protéine HER-2. Lorsqu'un des deux résultats d'IHC s'avère équivoque (2+) ou lorsque les deux résultats sont discordants (un négatif et un positif), un test d'ISH est alors effectué (figure A-5, annexe A). Cette approche aurait pour objectif de réduire le nombre de résultats d'IHC faux positifs et faux négatifs en augmentant le nombre de cas retestés par ISH. Par ailleurs, elle permettrait tout de même d'offrir le trastuzumab aux patientes qui présentent une « véritable surexpression » de la protéine HER-2 sans présenter d'amplification du gène.

Le principe de l'algorithme à deux anticorps (de sensibilité et spécificité complémentaires) avait été proposé dans les lignes directrices canadiennes de 2002 [Hanna et O'Malley, 2002]. Bien que celles de 2007 [Hanna *et al.*, 2007a] n'aient pas repris cet algorithme, plusieurs laboratoires du Québec⁴³ et de l'Ontario [Test Review Committee QMPLS, 2006] continueraient à l'appliquer. D'après Bilous et ses collaborateurs [2003a], la Suède en ferait également usage.

Bien qu'il apparaisse raisonnable de croire qu'un algorithme à deux anticorps puisse contrôler dans une certaine mesure le nombre de faux positifs et de faux négatifs, il y a actuellement peu de données probantes disponibles concernant la performance et l'efficacité d'une telle approche.

Il n'y avait jusqu'à tout récemment que quelques études de petite taille qui avaient abordé cette question [Ginestier *et al.*, 2004; Sapino *et al.*, 2003; O'Malley *et al.*, 2001]. Toutefois, une nouvelle étude publiée en 2008 par O'Malley et ses collaborateurs a évalué l'algorithme à deux anticorps sur un nombre plus important de patientes (549) testées dans deux laboratoires de référence canadiens. Dans cette étude, la concordance la plus élevée entre les résultats positifs d'IHC et ceux de FISH a été obtenue lorsque au moins deux anticorps différents ont donné un score 3+. Par contre, on remarque que les intervalles de confiance présentés se chevauchent. Les auteurs concluent tout de même que l'exactitude du diagnostic par IHC pourrait possiblement être améliorée si deux tests d'IHC plutôt qu'un étaient utilisés. Comme la sensibilité et la spécificité des anticorps commercialisés varient, la combinaison optimale serait un anticorps très sensible et un autre très spécifique.

La confirmation des tests d'IHC par ISH au Québec

Malgré la recommandation canadienne de ne retester à l'aide d'un test d'ISH que les cas équivoques (2+) à l'IHC, les anatomopathologistes de la province ont des positions diverses à cet égard. Certains appliquent la ligne directrice à la lettre, d'autres l'appliquent en complément d'un algorithme à deux anticorps (IHC), d'autres encore estiment qu'il est préférable de retester tous les cas équivoques (IHC 2+) et positifs (IHC 3+), position adoptée entre autres par la Suède et la Finlande selon Bilous et ses

43. Dr Louis Gaboury, anatomopathologiste, communication personnelle, juillet 2007.

collègues [2003a]. Enfin, certains autres jugent que le résultat d'amplification du gène HER-2 est nécessaire pour tous les cas.

Le principal argument avancé par les défenseurs d'un test d'ISH pour toutes les patientes est que la qualité des échantillons est indispensable au test d'IHC mais qu'elle est difficilement contrôlable dans un contexte clinique, particulièrement lorsque les échantillons proviennent d'hôpitaux où il n'y a pas d'anatomopathologiste sur place. Dans ces cas, les échantillons sont fixés par le chirurgien lui-même et transmis au laboratoire de pathologie souvent quelques jours plus tard. Ils peuvent donc parfois ne pas respecter les conditions idéales de préparation recommandées dans les lignes directrices canadiennes. Or, la réactivité des anticorps utilisés en IHC serait facilement modifiée par ces facteurs préanalytiques.

L'assurance qualité

En ce qui concerne la qualité des tests effectués, tous les laboratoires d'anatomopathologie adopteraient certaines mesures internes de contrôle de la qualité (usage de lames témoins, etc.) pour la réalisation des tests visant à établir le statut HER-2. Quant à l'assurance qualité externe, aucun programme formel n'a encore été mis sur pied à l'échelle provinciale pour s'assurer du maintien de la compétence des laboratoires dans la réalisation de ce genre de tests⁴⁴. Pourtant, les lignes directrices canadiennes recommandent la participation des laboratoires à un tel programme [Hanna *et al.*, 2007a].

Certains laboratoires participent d'une façon volontaire aux programmes d'assurance qualité externe de l'Ontario ou des États-Unis, mais ceux-ci ne représentent qu'une minorité des laboratoires qui effectuent des tests pour le HER-2 au Québec⁴⁵. Le manque de temps et de ressources financières⁴⁶ peuvent être des raisons évoquées pour ne pas participer aux programmes d'un autre pays ou province. L'organisation d'un programme provincial adapté à la réalité et aux besoins des anatomopathologistes du Québec apparaît essentiel, d'une part, pour rappeler l'importance de l'assurance qualité et, d'autre part, pour s'assurer d'un haut niveau de compétence.

Au Québec, l'assurance qualité externe tarde à s'implanter dans le domaine de l'anatomopathologie⁴⁷. Avec la multiplication des thérapies ciblées, les laboratoires de pathologie seront de plus en plus appelés à faire face à ce type de tests qui nécessitent une expertise particulière. Le soutien des anatomopathologistes par un laboratoire de référence et un programme d'échange de lames pourrait contribuer à assurer aux patientes atteintes de cancer du sein le traitement le plus approprié.

44. Le MSSS est néanmoins à mettre en place un programme d'agrément (basé sur la norme ISO 15189) qui définit les exigences de compétence et de qualité propres aux laboratoires de biologie médicale.

45. D' Louis Gaboury, anatomopathologiste, communication personnelle, juillet 2007.

46. Par exemple, il en coûte 5 000 \$ par an à un laboratoire québécois pour prendre part au programme de l'Ontario.

47. Des programmes d'assurance qualité externe sont déjà implantés dans les domaines de la microbiologie médicale et de la biochimie.

6.1 Conclusions

Les lignes directrices canadiennes recommandent l'IHC comme test initial pour déterminer le statut HER-2 chez les patientes atteintes d'un cancer du sein. Ce choix tient compte à la fois de l'absence de preuves formelles de la supériorité de l'ISH sur l'IHC comme facteur prévisionnel de la réponse au trastuzumab, du fait que la cible du traitement est la protéine et non le gène, et d'enjeux organisationnels et économiques (faibles effectifs en anatomopathologie, expertise nécessaire et équipement requis).

Conformément à ces lignes directrices, lorsque le résultat d'IHC obtenu est négatif (scores 0 ou 1+), le traitement au trastuzumab n'est pas indiqué; il est toutefois prescrit d'emblée lorsque le résultat est positif (score 3+). Les résultats équivoques (2+) nécessitent une confirmation par le FISH ou par une autre technique d'ISH (CISH ou SISH) préalablement validée par le laboratoire.

Les résultats de la présente évaluation montrent qu'environ 73,1 % des patientes testées à l'IHC sont négatives (0 ou 1+), alors que le résultat est positif (3+) chez environ 13,7 % d'entre elles. Comme la majorité des cas sont négatifs et que peu d'entre eux s'avèrent positifs lorsque confrontés au test FISH, l'IHC semble un bon test initial pour identifier rapidement et à moindre coût les patientes non susceptibles de bénéficier du trastuzumab.

À l'inverse, la proportion de résultats FISH négatifs chez les cas positifs à l'IHC (score 3+) (environ de 10,1 %) paraît considérable compte tenu des enjeux cliniques. Peu d'études (3 sur 27) ont obtenu un taux de concordance supérieur à 95 %. Certains résultats discordants peuvent constituer de faux positifs, mais leur proportion est inconnue. Certains mécanismes biologiques peuvent mener à la surexpression d'une protéine sans qu'il y ait amplification du gène. Même si le FISH est un test plus fiable en terme de reproductibilité, il n'y a actuellement pas de preuves suffisantes qui indiquent que les patientes testées IHC 3+/FISH- ne répondent pas au trastuzumab. Comme le trastuzumab cible la protéine, ces patientes sont jugées admissibles au traitement.

Par contre, pour pouvoir juger si une patiente est susceptible de bénéficier du trastuzumab sur la base d'un test d'IHC, il est primordial de s'assurer qu'il soit bien effectué et interprété. Or, la reproductibilité des résultats d'IHC entre observateurs et entre laboratoires peut parfois être faible. Elle peut être associée à l'inexpérience des observateurs et à l'utilisation de protocoles différents ou non validés. Les laboratoires qui effectuent plus de tests, notamment les laboratoires centraux et de référence, performant mieux à l'IHC. Ils obtiennent entre autres moins de faux positifs, résultats qui entraînent des dépenses considérables pour le système de santé en plus d'exposer inutilement les patientes à un traitement potentiellement risqué.

Au Québec, plusieurs laboratoires locaux qui effectuent des tests d'IHC ne semblent pas atteindre le nombre annuel minimal de cas recommandé dans les lignes directrices canadiennes. Les protocoles et les approches décisionnelles varient également d'un laboratoire à l'autre. De plus, la qualité des échantillons soumis aux tests peut ne pas être toujours optimale, ce qui peut affecter les résultats des tests et plus particulièrement ceux d'IHC.

Par ailleurs, pour diminuer le risque d'obtenir un résultat d'IHC faussement positif ou négatif, plusieurs laboratoires québécois effectuent pour chaque patiente deux tests d'IHC à l'aide de deux anticorps différents, les cas discordants étant retestés par ISH. Cela augmente toutefois le nombre de cas à retester. L'efficacité et l'efficience de cette approche reposent sur peu de données probantes mais mériteraient qu'on s'y attarde. Il serait souhaitable que les résultats obtenus par les utilisateurs de cette approche soient mis en commun et fassent l'objet d'une évaluation.

En ce qui concerne le FISH, la technique est moins sujette à la variabilité interobservateurs et interlaboratoires, mais les laboratoires de référence semblent encore une fois performer un peu mieux. Pour cette technique, les laboratoires québécois satisfont aux normes canadiennes en termes de nombre minimal de cas à tester annuellement.

Le CISH est recommandé dans les lignes directrices canadiennes comme une option de rechange au FISH. Cette technique produirait des résultats concordants avec le FISH lorsqu'on utilise un marquage parallèle à l'aide d'une sonde centromérique pour le chromosome 17. Cet ajout permet une correction pour la polysomie 17, et est d'autant plus important que la majorité des cas qui sont susceptibles d'être retestés par CISH sont des cas équivoques à l'IHC.

Le SISH est une technique relativement nouvelle et peu de publications en font l'objet. Elle est toutefois recommandée dans les lignes directrices canadiennes. Les résultats analysés montrent une concordance élevée avec le FISH. Toutefois, celle-ci est attribuable à une grande spécificité du test, puisque à première vue, sa sensibilité apparaît faible. Cette dernière a toutefois été estimée à partir d'un nombre restreint de patientes. La poursuite des recherches sur la performance de cette technique est souhaitable, puisqu'elle est en voie d'être utilisée au Québec.

Dans le cadre du HER-2, le PCR et le RT-PCR en temps réel demeurent du domaine de la recherche. Il serait toutefois intéressant que plus d'études soient menées dans le but d'établir si les techniques préalables d'isolation cellulaire, telles que la microdissection au laser, améliorent de façon significative la performance diagnostique des PCR et RT-PCR en temps réel, et si ces techniques sont applicables en milieux cliniques spécialisés.

Il existe différentes façons d'atteindre un haut niveau de qualité des tests, dont le recours à des laboratoires centraux et à un programme d'assurance qualité. Au Québec, les laboratoires qui effectuent des tests pour déterminer le statut HER-2 ne se soumettent pas systématiquement à des mesures d'assurance qualité externe comme c'est le cas en Ontario, aux États-Unis ou dans d'autres pays, puisque aucun programme formel chapeauté par un laboratoire de référence n'a été implanté dans la province. Pour répondre aux exigences des lignes directrices canadiennes, certains laboratoires ont choisi d'adhérer de façon volontaire aux programmes d'une autre province ou d'un pays étranger, mais ces laboratoires ne représentent qu'une minorité de l'ensemble des laboratoires qui effectuent des tests pour la détermination du statut HER-2. Compte tenu de l'importance du statut HER-2 dans la prise en charge des patientes atteintes d'un cancer du sein, il est indispensable que des mesures soient prises afin d'assurer la qualité des tests effectués dans les laboratoires de la province.

6.2 Recommandations

À la lumière de ces considérations, l'AETMIS recommande :

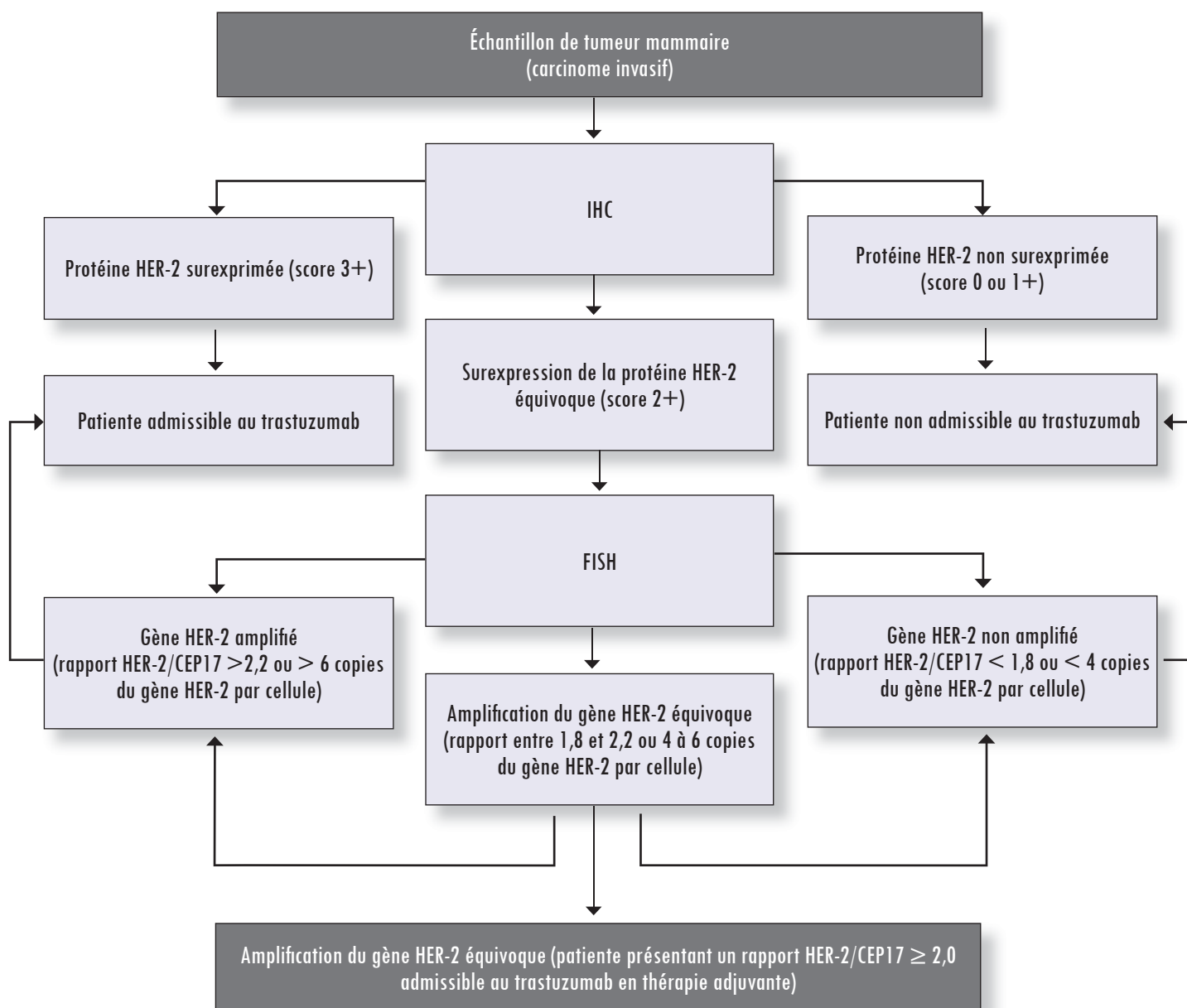
- 1) que les autorités concernées mettent en place un programme d'assurance qualité relatif aux tests de détermination du statut HER-2 au Québec et que, dans le cadre de ce programme, les mesures suivantes soient introduites :
 - la désignation d'au moins un laboratoire de référence;
 - l'élaboration et l'application par ce ou ces laboratoires de référence de mesures d'assurance qualité interne;
 - la validation périodique des résultats de ce ou ces laboratoires avec ceux d'autres laboratoires de référence provinciaux et canadiens ou étrangers;
 - l'affiliation à un laboratoire de référence de tous les laboratoires qui effectuent les tests concernés et leur participation obligatoire au programme d'assurance qualité externe établi;
 - la validation initiale et périodique des méthodes utilisées dans tous les laboratoires qui effectuent les tests concernés et l'obligation pour ces laboratoires de satisfaire aux exigences de qualité définies par le ou les laboratoires de référence;
 - l'obligation pour les laboratoires de satisfaire au nombre minimal de cas à tester annuellement recommandé par les normes canadiennes, soit 250 pour l'immunohistochimie (IHC) et 100 (idéalement 200) pour les tests d'hybridation *in situ* (ISH), tout en limitant le nombre d'anatomopathologistes chargés de leur interprétation de façon à maintenir leur expertise;
 - la formation continue des anatomopathologistes et du personnel de laboratoire impliqué;
 - la préparation conforme aux meilleures pratiques des échantillons à soumettre par les hôpitaux aux laboratoires qui effectuent les tests concernés;
 - l'évaluation de la faisabilité de mettre sur pied une banque de données centrale regroupant les résultats de ces tests ainsi que d'autres données pertinentes pour l'ensemble des patientes atteintes d'un cancer infiltrant du sein;
- 2) que les recommandations canadiennes relatives à l'utilisation des tests d'IHC et d'hybridation *in situ* fluorescente (FISH) soient suivies par les laboratoires, notamment le recours initial au test d'IHC suivi du test FISH (ou autres tests d'ISH validés) pour les résultats équivoques;
- 3) que le test FISH puisse être le test initial effectué lorsque la qualité de l'échantillon reçu par le laboratoire est mise en doute;
- 4) que l'utilisation du test d'hybridation *in situ* chromogénique (CISH) dans le but de confirmer un résultat équivoque obtenu par IHC se fasse à l'aide de deux sondes : l'une pour le gène HER-2 et l'autre pour le centromère du chromosome 17;
- 5) que la performance diagnostique de l'hybridation *in situ* argentique (SISH) fasse l'objet d'une veille documentaire jusqu'à ce que les données probantes confirment la validité de cette technique.

ANNEXE A

ALGORITHMES DÉCISIONNELS

FIGURE A-1

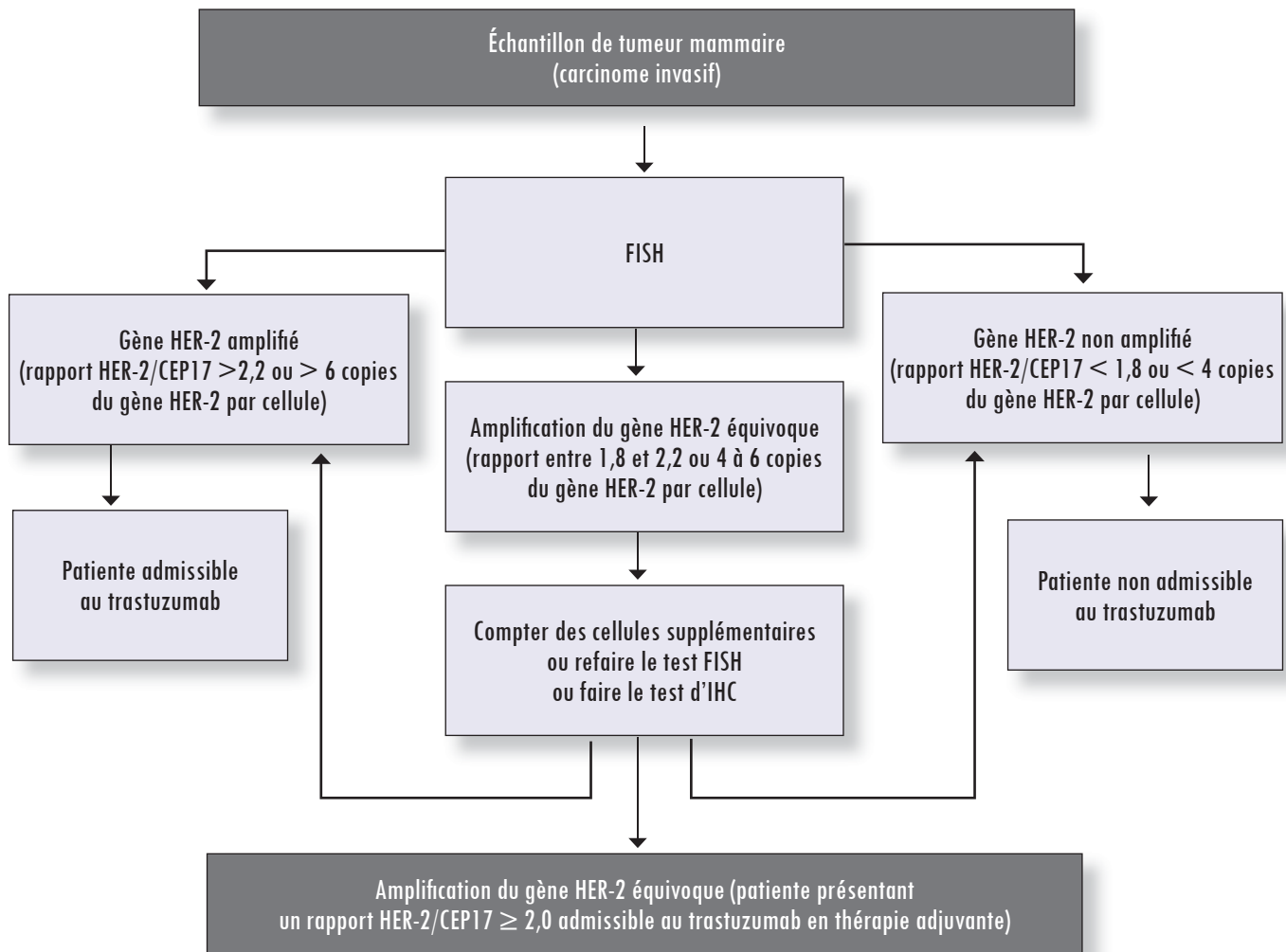
Algorithme de l'ASCO/CAP pour l'évaluation du statut HER-2 — IHC comme test initial



Source : Wolff et ses collaborateurs [2007].

FIGURE A-2

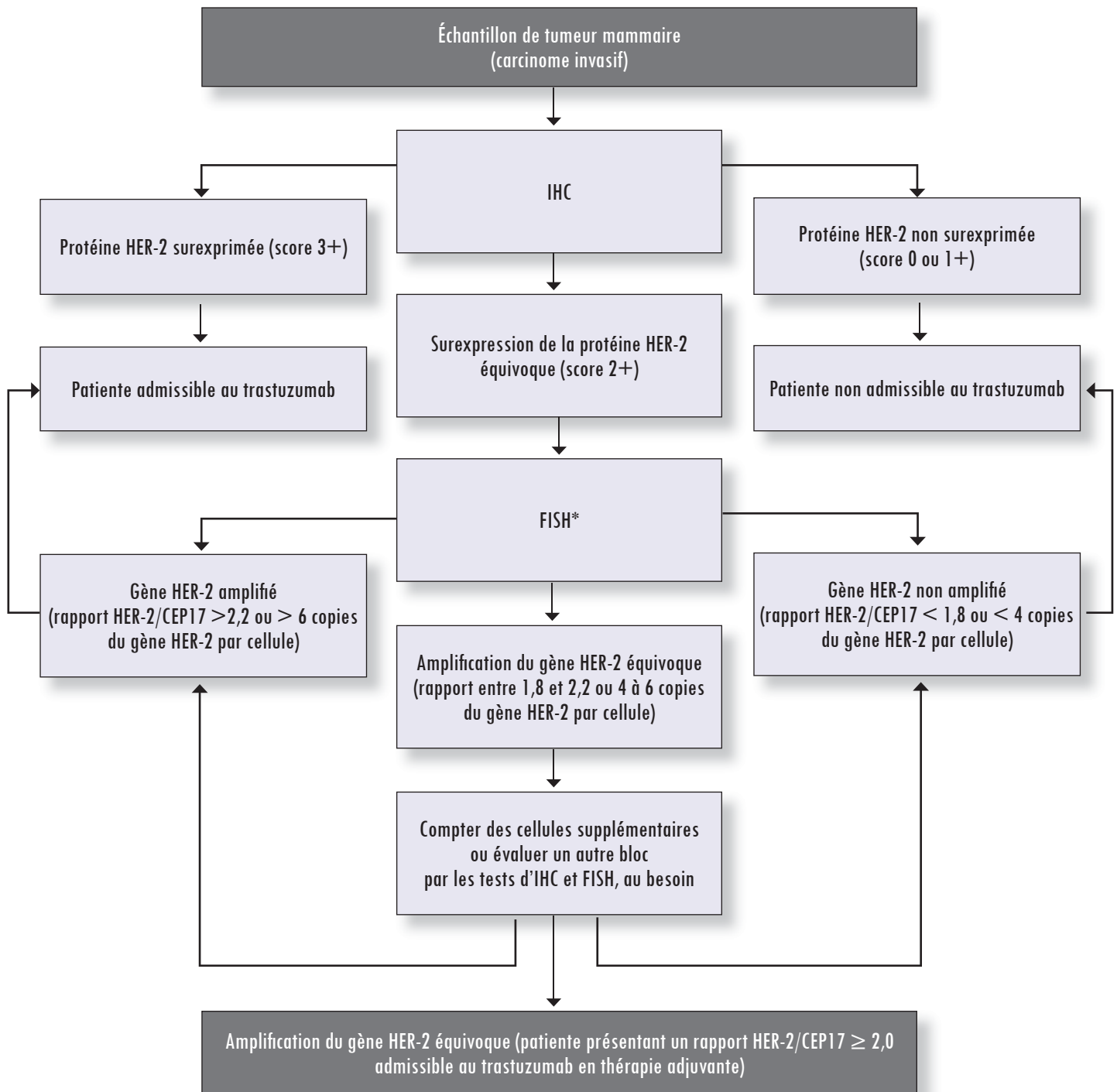
Algorithme de l'ASCO/CAP pour l'évaluation du statut HER-2 — FISH comme test initial



Source : Wolff et ses collaborateurs [2007].

FIGURE A-3

Algorithme consensuel canadien pour l'évaluation du statut HER-2

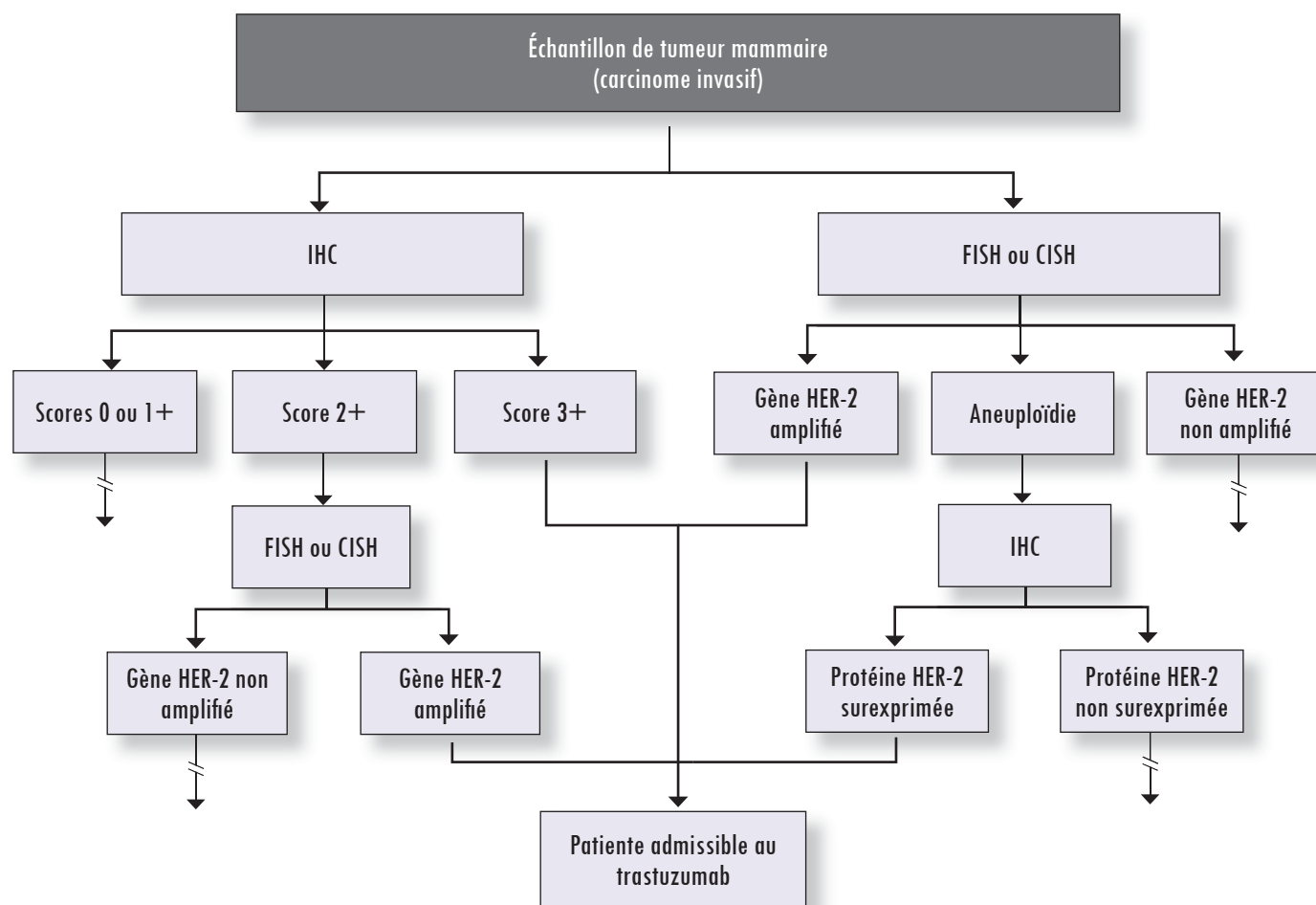


* Le test FISH peut être remplacé par les tests CISH ou SISH s'ils sont préalablement validés.

Source : Hanna et ses collaborateurs [2007a].

FIGURE A-4

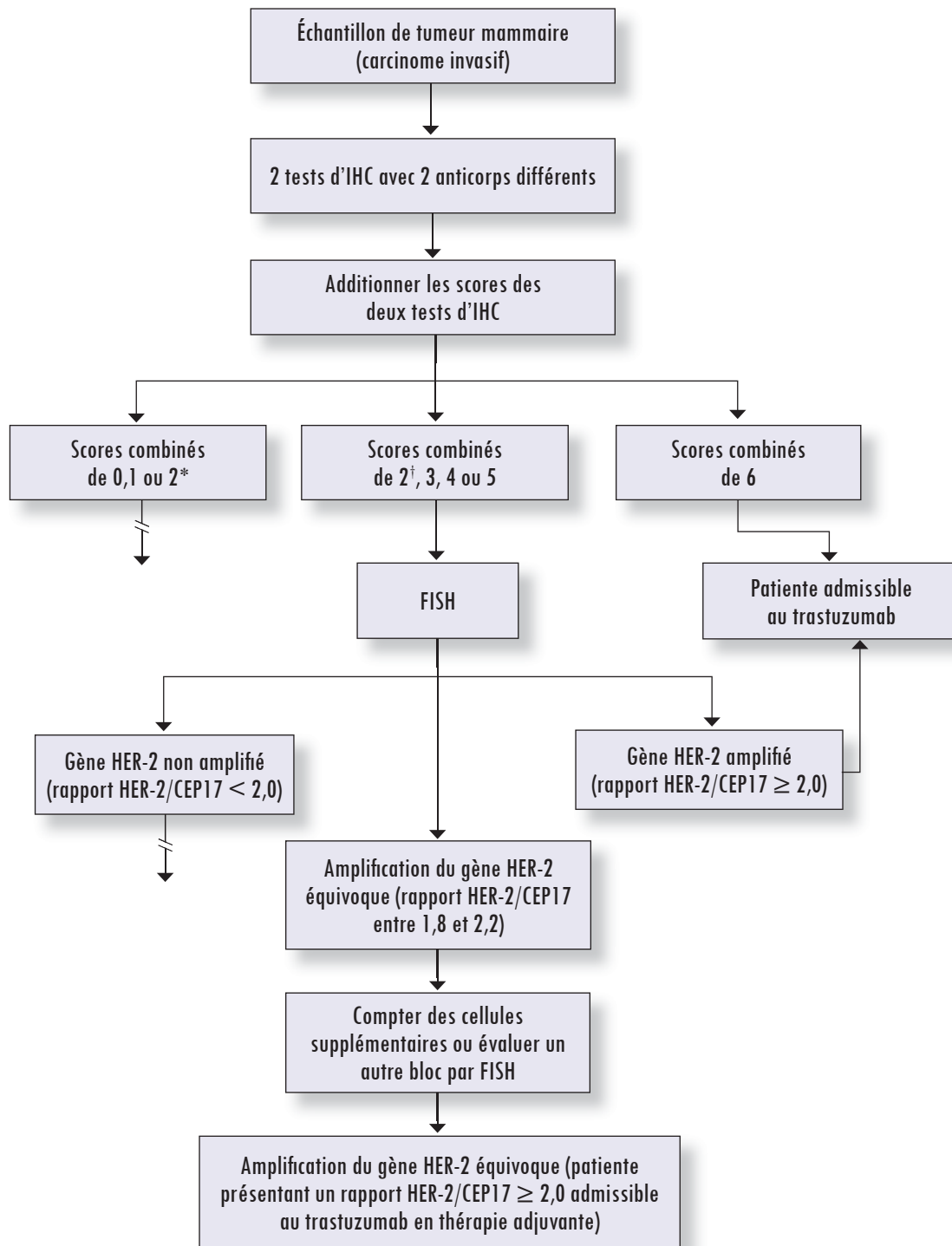
Algorithme de la Commission européenne pour l'évaluation du statut HER-2



Source : Penault-Llorca [2005].

FIGURE A-5

Processus décisionnel (non consensuel) utilisé par plusieurs laboratoires québécois pour l'évaluation du statut HER-2



* Score de 2 issu de la combinaison de deux résultats 1+.

† Score de 2 issu de la combinaison d'un résultat 0 et d'un résultat 2+.

ANNEXE B

STRATÉGIES DE RECHERCHE DOCUMENTAIRE

BASES DE DONNÉES BIBLIOGRAPHIQUES

PubMed

Recherche effectuée le 20 décembre 2007

Limites : de 2000 à 2007

- #1 breast neoplasms[mh] OR ((breast[tw] OR mammary[tw]) AND (neoplasm*[tw] OR tumor[tw] OR tumors[tw] OR tumour*[tw] OR cancer[tw] OR cancers[tw] OR carcinoma*[tw] OR adenocarcinoma*[tw]))
- #2 “human epidermal growth factor 2”[tw] OR “human epidermal growth factor receptor 2”[tw] OR “receptor, erbb-2”[mh] OR “genes, erbb-2”[mh] OR “erbb-2”[tw] OR erbb2[tw] OR “c-erbb-2”[tw] OR “c-erbb2”[tw] OR “cerbb-2”[tw] OR cerbb2[tw] OR her2*[tw] OR HER-2*[tw] OR “neu/erbb-2”[tw] OR “neu/erbb2”[tw] OR “neu/c-erbb-2”[tw] OR “neu/c-erbb2”[tw]
- #3 “fluorescence in situ hybridization”[tw] OR “fluorescence in situ hybridisation”[tw] OR “in situ hybridization, fluorescence”[mh] OR FISH[tw] OR “fluorescent in situ hybridization”[tw] OR “fluorescent in situ hybridisation”[tw] OR pharmDx*[tw] OR “pharm Dx”[tw] OR PathVysion*[tw]
- #4 immunohistochemistry[mh] OR immunohistochemistry[tw] OR IHC[tw] OR “immunoperoxidase staining”[tw] OR immunohistochemical[tw] OR HercepTest*[tw] OR “Hercep Test”[tw] OR (Pathway[tw] AND Ventana[tw]) OR CB11[tw] OR TAB250[tw] OR A0485[tw]
- #5 CISH[tw] OR “chromogenic in situ hybridization”[tw] OR “chromogenic in situ hybridisation”[tw] OR (“in situ hybridization”[mh] AND “chromogenic compounds”[mh])
- #6 SISH[tw] OR (silver[tw] AND (“in situ hybridization”[tw] OR “in situ hybridisation”[tw] OR ISH[tw])) OR EnzMet*[tw]
- #7 (((“polymerase chain reaction”[mh] OR “polymerase chain reaction”[tw] OR PCR[tw]) AND (realtime[tw] OR real-time[tw] OR quantitative[tw])) OR “LightCycler”[tw] OR “Light Cyclers”[tw] OR qPCR[tw] OR “Q-PCR”[tw] OR “qRT-PCR”[tw] OR “Q-RT-PCR”[tw])
- #8 “observer variation”[mh] OR interobserver*[tw] OR “inter-observer”[tw] OR “inter-observers”[tw] OR interlaborator*[tw] OR “inter-laboratory”[tw] OR “inter-laboratories”[tw] OR “multicenter study”[pt] OR “multicenter study”[tw] OR “multicenter studies”[mh] OR “multicenter studies”[tw]
- #9 #1 AND #2 AND #3 AND #4
- #10 #1 AND #2 AND #5 AND (#3 OR #4)
- #11 #1 AND #2 AND #7 AND (#3 OR #4)

- #12 #1 AND #2 AND #6
- #13 #1 AND #2 AND (#3 OR #4 OR #5 OR #6 OR #7) AND #8
- #14 #9 OR #10 OR #11 OR #12 OR #13

EMBASE par Ovid

Recherche effectuée le 28 novembre 2007

Limites : de 2000 à 2007

- #1 exp breast cancer/
- #2 (breast OR mammary) AND (neoplasm\$ OR tumor OR tumors OR tumour\$ OR cancer OR cancers OR carcinoma\$ OR adenocarcinoma\$).tw.
- #3 #1 OR #2
- #4 Epidermal Growth Factor Receptor 2/ OR exp proto oncogene/
- #5 (“human epidermal growth factor 2” OR “human epidermal growth factor receptor-2” OR erbb-2 OR erbb2 OR cerbb-2 OR cerbb2 OR her2\$).tw.
- #6 #4 OR #5
- #7 exp Fluorescence in Situ Hybridization/
- #8 (“fluorescence in situ hybridization” OR “fluorescence in situ hybridisation” OR FISH OR “fluorescent in situ hybridization” OR “fluorescent in situ hybridisation” OR pharmDx\$ OR “pharmDx” OR PathVysion\$).tw.
- #9 #7 OR #8
- #10 immunohistochemistry/
- #11 ((Pathway AND Ventana) OR immunohistochemistry OR IHC OR “immunoperoxidase staining” OR immunohistochemical OR HercepTest\$ OR “HercepTest” OR CB11 OR TAB250 OR A0485).tw
- #12 #10 OR #11
- #13 exp in situ hybridization/ AND exp chromogenic substrate/
- #14 (CISH OR “chromogenic in situ hybridization” OR “chromogenic in situ hybridisation”).tw.
- #15 #13 OR #14
- #16 exp polymerase chain reaction/
- #17 ((“polymerase chain reaction” OR PCR) AND (realtime OR real-time OR quantitative)).tw. OR (“LightCycler” OR “Light Cyclex” OR qPCR OR “Q-PCR”).tw.
- #18 #16 OR #17
- #19 (SISH OR (silver AND (“in situ hybridization” OR “in situ hybridisation” OR ISH)) OR EnzMet\$).tw.

- #20 observer variation/ OR multicenter study/
- #21 (interobserver\$ OR “inter-observer” OR “inter-observers” OR interlaborator\$ OR “inter-laboratory” OR “inter-laboratories” OR “multicenter study” OR “multicenter studies”).tw.
- #22 #20 OR #21
- #23 #3 AND #6 AND #9 AND #12
- #24 #3 AND #6 AND #15 AND (#9 OR #12)
- #25 #3 AND #6 AND #18 AND (#9 OR #12)
- #26 #3 AND #6 AND #19
- #27 #3 AND #6 AND (#9 OR #12 OR #15 OR #18 OR #19) AND #22
- #28 #23 OR #24 OR #25 OR #26 OR #27

The Cochrane Library 2007, issue 4

Recherche effectuée le 28 novembre 2007

- #1 Human next epidermal next growth next factor next 2 OR human next epidermal next growth next factor next receptor next 2 OR “receptor, erbb-2”[mh] OR “genes, erbb-2”[mh] OR “erbb-2” OR erbb2 OR “c-erbb-2” OR “c-erbb2” OR “cerbb-2” OR cerbb2 OR her2* OR HER-2* OR “neu/erbb-2” OR “neu/erbb2” OR “neu/c-erbb-2” OR «neu/c-erbb2»

RECHERCHE DANS LE WEB

Les recherches les plus récentes ont été effectuées le 28 janvier 2008.

Les sites Web dans le domaine du cancer, de l'évaluation des technologies de la santé et des guides de pratique clinique ont été explorés, notamment :

- American Society of Clinical Oncology (www.asco.org)
- BC Cancer Agency (www.bccancer.bc.ca)
- Cancer Care Ontario (www.cancercare.on.ca)
- Centre for Reviews and Dissemination (www.york.ac.uk/inst/crd/crddatabases.htm)
- Clinical Oncology International Network (www.rcr.ac.uk/index.asp?PageID=667)
- Fédération Nationale des Centres de Lutte contre le Cancer (www.fnclcc.fr)
- Haute Autorité de Santé (www.has-sante.fr/portail/display.jsp)
- Infobanque AMC : guides de pratique (www.mdm.ca/cpgsnew/cpgs-f)
- International Network of Agencies of Health Technology Assessment (www.inahta.org)

National Breast Cancer Centre (www.nbcc.org.au/resources/resource.php?code=HERG)

National Guidelines Clearinghouse (www.guideline.gov)

NHS Guidelines Finder (www.library.nhs.uk/guidelinesFinder/Default.aspx)

NHS HTA (www.hta.nhsweb.nhs.uk)

National Institute for Clinical Evidence (www.nice.org.uk/guidance/index.jsp)

National Library of Guidelines Specialist Library (www.library.nhs.uk/guidelinesFinder)

Office canadien de coordination de l'évaluation des technologies de la santé (www.ccohta.ca)

Scottish Intercollegiate Guidelines Network (www.sign.ac.uk/guidelines/published/index.html)

ANNEXE C

LISTE DES ÉTUDES EXCLUES ET RAISONS D'EXCLUSION

TABEAU C-1

Liste des études exclues et raisons d'exclusion par comparaison ou objectif d'évaluation*								
ÉTUDE	COMPARAISON OU OBJECTIF D'ÉVALUATION	RAISONS D'EXCLUSION						
		TAILLE DE L'ÉCHANTILLON	TECHNIQUE UTILISÉE (TROUSSE, ANTICORPS, ETC.)	BIAIS DE SÉLECTION ET (OU) ANALYSE D'UN SOUS-GROUPE UNIQUEMENT	INTERPRÉTATION (AUTOMATISÉE, POINT SEUIL, ETC.)	PRÉSENTATION DES RÉSULTATS	PUBLICATION MULTIPLE	AUTRES RAISONS
Acs <i>et al.</i> , 2003	IHC et FISH				x			
Anttinen <i>et al.</i> , 2003	IHC et CISH				x			
Bartlett <i>et al.</i> , 2001	IHC et FISH IHC : variabilité interobservateurs FISH : variabilité interobservateurs				x x	x x		inclut des tissus congelés inclut des tissus congelés inclut des tissus congelés
Bilous <i>et al.</i> , 2003b	IHC et FISH IHC : variabilité interobservateurs	x		x	x	x		objectif
Birner <i>et al.</i> , 2001	IHC et FISH				x			
Bloom et Harrington, 2004	IHC et FISH IHC : variabilité interobservateurs		x			x		
Bloom <i>et al.</i> , 2001	IHC et FISH				x			
Cell Markers and Cytogenetics Committees, 2002	IHC : variabilité interobservateurs (interlaboratoires) FISH : reproductibilité interlaboratoires					x	Persons <i>et al.</i> , 2006	microphotographies
Chang <i>et al.</i> , 2004	IHC et CISH				x			
Dal Lago <i>et al.</i> , 2006	IHC et FISH					x		
Edgerton <i>et al.</i> , 2003	IHC et FISH IHC : variabilité interobservateurs		x		x x	x x		
Ellis <i>et al.</i> , 2005	IHC et FISH				x	x		

TABLEAU C-1 (SUITE)

Liste des études exclues et raisons d'exclusion par comparaison ou objectif d'évaluation*								
ÉTUDE	COMPARAISON OU OBJECTIF D'ÉVALUATION	RAISONS D'EXCLUSION						
		TAILLE DE L'ÉCHANTILLON	TECHNIQUE UTILISÉE (TROUSSE, ANTICORPS, ETC.)	BIAS DE SÉLECTION ET (OU) ANALYSE D'UN SOUS-GROUPE UNIQUEMENT	INTERPRÉTATION (AUTOMATISÉE, POINT SEUIL, ETC.)	PRÉSENTATION DES RÉSULTATS	PUBLICATION MULTIPLE	AUTRES RAISONS
Falo <i>et al.</i> , 2003	IHC et FISH		x					
Field <i>et al.</i> , 2001	IHC et FISH				x			
Francis <i>et al.</i> , 2007	IHC : reproductibilité interlaboratoires					x		
Gancberg <i>et al.</i> , 2002	IHC et FISH				x			
	IHC : reproductibilité interlaboratoires				x			
Gancberg <i>et al.</i> , 2000	IHC et FISH				x			
Günhan <i>et al.</i> , 2004	IHC : variabilité interobservateurs		x					
Harris <i>et al.</i> , 2001	IHC et FISH		x					
Hoang <i>et al.</i> , 2000	IHC et FISH				x			
	IHC : variabilité interobservateurs				x			
Jacobs <i>et al.</i> , 2000	IHC : reproductibilité interlaboratoires				x			
Kay <i>et al.</i> , 2004	FISH : reproductibilité interlaboratoires		x		x			
Kaya <i>et al.</i> , 2001	IHC et FISH	x			x			
Kostopoulou <i>et al.</i> , 2007	IHC et FISH			x				
	IHC et CISH			x				
	FISH et CISH			x				
	RT-PCR et FISH			x		x		
Kulka <i>et al.</i> , 2006	IHC et FISH	x	x					
	PCR et FISH	x	x					
Labuhn <i>et al.</i> , 2006	RT-PCR et FISH		x					
Lacroix-Triki <i>et al.</i> , 2006	IHC : variabilité interobservateurs					x		fixateur, tumeurs congelées
Lal <i>et al.</i> , 2004	IHC et FISH						Lal <i>et al.</i> , 2005	
Lal <i>et al.</i> , 2003	IHC et FISH						Lal <i>et al.</i> , 2005	

TABLEAU C-1 (SUITE)

Liste des études exclues et raisons d'exclusion par comparaison ou objectif d'évaluation*								
ÉTUDE	COMPARAISON OU OBJECTIF D'ÉVALUATION	RAISONS D'EXCLUSION						
		TAILLE DE L'ÉCHANTILLON	TECHNIQUE UTILISÉE (TROUSSE, ANTICORPS, ETC.)	BIAS DE SÉLECTION ET (OU) ANALYSE D'UN SOUS-GROUPE UNIQUEMENT	INTERPRÉTATION (AUTOMATISÉE, POINT SEUIL, ETC.)	PRÉSENTATION DES RÉSULTATS	PUBLICATION MULTIPLE	AUTRES RAISONS
Lamy <i>et al.</i> , 2006	IHC et FISH PCR et FISH					x x		
Larsimont <i>et al.</i> , 2002	IHC et FISH				x			
Leong <i>et al.</i> , 2006	IHC et FISH CISH et FISH IHC et CISH	x x x		x x x				
Lopez-Guerrero <i>et al.</i> , 2003	IHC et FISH		x		x			
Lottner <i>et al.</i> , 2005	IHC et FISH				x			
Murthy <i>et al.</i> , 2005	PCR et FISH	x						types d'échantillons
Ni <i>et al.</i> , 2007	IHC et CISH CISH et FISH				x x			
Onody <i>et al.</i> , 2001	IHC et FISH		x			x		
Park <i>et al.</i> , 2003	CISH et FISH				x			
Pauletti <i>et al.</i> , 2000	IHC et FISH	x	x					
Peiró <i>et al.</i> , 2007a	CISH et FISH IHC et CISH	x		x			Peiró <i>et al.</i> , 2007b	
Persons <i>et al.</i> , 2000	FISH : reproductibilité interlaboratoires					x		
Powell <i>et al.</i> , 2007b	IHC et FISH IHC : reproductibilité interlaboratoires	x			x	x		
Ridolfi <i>et al.</i> , 2000	IHC et FISH		x					
Salido <i>et al.</i> , 2005	IHC et FISH			x				
Sartelet <i>et al.</i> , 2005	CISH et FISH IHC et CISH	x x	x	x				

TABLEAU C-1 (SUITE)

Liste des études exclues et raisons d'exclusion par comparaison ou objectif d'évaluation*								
ÉTUDE	COMPARAISON OU OBJECTIF D'ÉVALUATION	RAISONS D'EXCLUSION						
		TAILLE DE L'ÉCHANTILLON	TECHNIQUE UTILISÉE (TROUSSE, ANTICORPS, ETC.)	BIAS DE SÉLECTION ET (OU) ANALYSE D'UN SOUS-GROUPE UNIQUEMENT	INTERPRÉTATION (AUTOMATISÉE, POINT SEUIL, ETC.)	PRÉSENTATION DES RÉSULTATS	PUBLICATION MULTIPLE	AUTRES RAISONS
Simon <i>et al.</i> , 2001	IHC et FISH				x	x		
Tanner <i>et al.</i> , 2001	IHC et CISH	x			x			
Tanner <i>et al.</i> , 2000	IHC et FISH				x			FISH : tumeurs congelées
	CISH et FISH							FISH : tumeurs congelées
	IHC et CISH				x			
Thomson <i>et al.</i> , 2001	IHC et FISH	x		x				
	IHC : variabilité interobservateurs			x				
Torrissi <i>et al.</i> , 2007	IHC et FISH				x			
Tse <i>et al.</i> , 2005	IHC et FISH	x	x		x			
	PCR et FISH		x					
Tsuda <i>et al.</i> , 2002	IHC : variabilité interobservateurs					x		
Tubbs <i>et al.</i> , 2001	IHC et FISH				x	x		
Vera-Roman et Rubio-Martinez, 2004	IHC et FISH	x	x					
	CISH et FISH		x					
	IHC et CISH	x						
Vinatzer <i>et al.</i> , 2005	IHC et FISH	x						
	RT-PCR et FISH	x						
Wang <i>et al.</i> , 2001	IHC et FISH				x			
Wixom <i>et al.</i> , 2004	CISH et FISH	x		x				
	IHC et CISH	x						
Zhao <i>et al.</i> , 2002	IHC et FISH	x	x					
	CISH et FISH		x					
	IHC et CISH	x						

* Cette liste n'inclut pas les études exclues à la lecture du résumé.

ANNEXE D

RÉSULTATS

TABLEAU D-1

Distribution* des scores d'IHC dans une population de cas de cancer du sein						
ÉTUDE	ANTICORPS	N	SCORE D'IHC EN % (n)			
			0	1+	2+	3+
Lal <i>et al.</i> , 2005	HercepTest™	3 655	37,2 (1 360)	35,9 (1 312)	16,0 (585)	10,9 (398)
Ogura <i>et al.</i> , 2003	HercepTest™	110	24,5 (27)	48,2 (53)	9,1 (10)	18,2 (20)
Tsuda <i>et al.</i> , 2001a	HercepTest™	101	41,6 (42)	34,7 (35)	5,9 (6)	17,8 (18)
			0 OU 1+		2+	3+
Egervari <i>et al.</i> , 2007*	HercepTest™	174	70,7 (123)		17,8 (31)	11,5 (20)
Dandachi <i>et al.</i> , 2004†	HercepTest™	173	75,7 (131)		9,8 (17)	14,5 (25)
Varshney <i>et al.</i> , 2004	HercepTest™	687	76,1 (523)		11,1 (76)	12,8 (88)
Egervari <i>et al.</i> , 2007*	CB11	174	52,3 (91)		28,2 (49)	19,5 (34)
Kakar <i>et al.</i> , 2000	CB11	117	71,8 (84)		14,5 (17)	13,7 (16)

N : nombre de sujets.

* Cette étude a aussi utilisé un autre anticorps.

† Ces résultats ont également été publiés en 2002 par Dandachi et ses collaborateurs et par Hauser-Kronberger et Dandachi [2004].

TABLEAU D-2

Proportion* de résultats FISH positifs par score d'IHC					
ÉTUDE	ANTICORPS	N	SCORE D'IHC		
			0 OU 1+	2+	3+
Egervari <i>et al.</i> , 2007 [†]	HercepTest™	174	4,9 (6/123)	29,0 (9/31)	80,0 (16/20)
Hofmann <i>et al.</i> , 2007 [‡]	HercepTest™	289	0,0 (0/100)	12,2 (10/82)	91,6 (98/107)
Ciampa <i>et al.</i> , 2006	HercepTest™	108	8,7 (2/23)	7,0 (3/43)	52,4 (22/42)
Reddy <i>et al.</i> , 2006 [‡]	HercepTest™	1 289	2,6 (17/650)	16,9 (39/231)	85,5 (349/408)
Sáez <i>et al.</i> , 2006 [†]	HercepTest™	181	1,7 (2/115)	6,7 (1/15)	76,5 (39/51)
Vocaturro <i>et al.</i> , 2006	HercepTest™	111	0,0 (0/53)	52,8 (19/36)	90,9 (20/22)
Ainsworth <i>et al.</i> , 2005	HercepTest™	165	8,6 (12/140)	92,3 (12/13)	91,7 (11/12)
Dolan et Snover, 2005	HercepTest™	129	0,0 (0/23)	7,5 (7/93)	38,5 (5/13)
Lal <i>et al.</i> , 2005	HercepTest™	3 655	1,7 (46/2 672)	21,9 (128/585)	91,2 (363/398)
Loring <i>et al.</i> , 2005	HercepTest™	110	0,0 (0/62)	0,0 (0/17)	87,1 (27/31)
Prati <i>et al.</i> , 2005	HercepTest™	198	5,1 (7/136)	25,7 (9/35)	81,5 (22/27)
Press <i>et al.</i> , 2005	HercepTest™	842	4,2 (19/457)	16,9 (21/124)	78,2 (204/261)
Olsen <i>et al.</i> , 2004 [§]	HercepTest™	120	2,8 (2/72)	6,2 (1/16)	84,4 (27/32)
Owens <i>et al.</i> , 2004	HercepTest™	6 556	6,1 (163/2 690)	23,3 (736/3 159)	91,7 (648/707)
Varshney <i>et al.</i> , 2004	HercepTest™	687	0,0 (0/523)	11,8 (9/76)	78,4 (69/88)
Dowsett <i>et al.</i> , 2003	HercepTest™	426	0,7 (2/270)	48,1 (26/54)	94,1 (96/102)
Hammock <i>et al.</i> , 2003	HercepTest™	102	4,2 (1/24)	6,1 (2/33)	48,9 (22/45)
Ogura <i>et al.</i> , 2003	HercepTest™	110	3,8 (3/80)	10,0 (1/10)	100 (20/20)
McCormick <i>et al.</i> , 2002	HercepTest™	198	6,2 (7/112)	42,2 (19/45)	100 (41/41)
Roche <i>et al.</i> , 2002 [‡]	HercepTest™	119	0,0 (0/19)	0,0 (0/12)	89,8 (79/88)
Tsuda <i>et al.</i> , 2001a	HercepTest™	101	2,6 (2/77)	0,0 (0/6)	83,3 (15/18)
Papadopoulos <i>et al.</i> , 2007 [‡]	HercepTest™ ou CB11	375	11,5 (6/52)	23,7 (69/291)	90,6 (29/32)
Hyun <i>et al.</i> , 2007	A0485	309	0,0 (0/146)	13,3 (15/113)	90,0 (45/50)
Sapino <i>et al.</i> , 2006	A0485	237	0,6 (1/176)	27,8 (10/36)	92,0 (23/25)
Yaziji <i>et al.</i> , 2004	A0485	2 913	2,8 (40/1 428)	17,0 (196/1 151)	91,6 (306/334)
Egervari <i>et al.</i> , 2007 [†]	CB11	174	2,2 (2/91)	16,3 (8/49)	61,8 (21/34)
Sáez <i>et al.</i> , 2006 [†]	CB11	182	2,0 (2/101)	0,0 (0/25)	71,4 (40/56)
Ma <i>et al.</i> , 2005	CB11	584	9,1 (10/110)	31,4 (85/271)	96,6 (196/203)
Kakar <i>et al.</i> , 2000	CB11	112	1,3 (1/79)	35,3 (6/17)	87,5 (14/16)

N : nombre de sujets; la trousse PathVysion® a été utilisée à moins d'une spécification contraire; un résultat FISH est positif lorsque le rapport HER-2/CEP17 est de $\geq 2,0$.

* Les résultats sont présentés en pourcentage avec les nombres réels entre parenthèses.

† Cette étude a aussi comparé le FISH à l'IHC effectuée à l'aide d'un autre anticorps.

‡ Résultats d'IHC et de FISH du laboratoire central.

§ FISH effectué à l'aide de la trousse pharmDx™.

TABLEAU D-3

Proportion* de résultats FISH positifs par score d'IHC 0 et 1+				
ÉTUDE	ANTICORPS	N	SCORE D'IHC	
			0	1+
Hofmann <i>et al.</i> , 2007†	HercepTest™	289	0,0 (0/48)	0,0 (0/52)
Ciampa <i>et al.</i> , 2006	HercepTest™	108	12,5 (1/8)	6,7 (1/15)
Reddy <i>et al.</i> , 2006‡	HercepTest™	1 289	1,5 (3/203)	3,1 (14/447)
Sáez <i>et al.</i> , 2006‡	HercepTest™	181	0,0 (0/55)	3,3 (2/60)
Vocaturio <i>et al.</i> , 2006	HercepTest™	111	0,0 (0/38)	0,0 (0/15)
Ainsworth <i>et al.</i> , 2005	HercepTest™	165	6,7 (9/134)	50,0 (3/6)
Dolan et Snover, 2005	HercepTest™	129	0,0 (0/2)	0,0 (0/21)
Lal <i>et al.</i> , 2005	HercepTest™	3 655	1,0 (13/1 360)	2,5 (33/1 312)
Prati <i>et al.</i> , 2005	HercepTest™	198	3,4 (2/58)	6,4 (5/78)
Press <i>et al.</i> , 2005	HercepTest™	842	3,6 (11/307)	5,3 (8/150)
Olsen <i>et al.</i> , 2004§	HercepTest™	120	0,0 (0/43)	6,9 (2/29)
Owens <i>et al.</i> , 2004	HercepTest™	6 556	4,1 (44/1 075)	7,4 (119/1 615)
Ogura <i>et al.</i> , 2003	HercepTest™	110	3,7 (1/27)	3,8 (2/53)
McCormick <i>et al.</i> , 2002	HercepTest™	198	3,8 (2/53)	8,5 (5/59)
Roche <i>et al.</i> , 2002†	HercepTest™	119	0,0 (0/9)	0,0 (0/10)
Tsuda <i>et al.</i> , 2001a	HercepTest™	101	2,4 (1/42)	2,9 (1/35)
Sapino <i>et al.</i> , 2006	A0485	237	0,0 (0/79)	1,0 (1/97)
Ma <i>et al.</i> , 2005	CB11	584	8,3 (5/60)	10,0 (5/50)
Sáez <i>et al.</i> , 2006‡	CB11	182	2,2 (1/45)	1,8 (1/56)
Médiane (étendue)		14 992	2,0 (0-12,5)	3,6 (0-50,0)
Moyenne pondérée (IC à 95 %)			2,6 (2,1-3,1)¶	4,9 (4,3-5,6)¶

IC : intervalle de confiance; N : nombre de sujets; la trousse PathVysion® a été utilisée pour le FISH à moins d'une spécification contraire; un résultat FISH positif représente un rapport HER-2/CEP17 de $\geq 2,0$.

* Valeur en % (nombres réels) présentée pour chaque score d'IHC.

† Résultats d'IHC et de FISH du laboratoire central.

‡ Cette étude a aussi comparé le FISH à l'IHC effectuée à l'aide d'un autre anticorps.

§ FISH effectué à l'aide de la trousse pharmDx™.

¶ Valeur de p du chi carré d'hétérogénéité de 0,000 (très hétérogène).

TABLEAU D-4

Performance de l'IHC à détecter les cas d'amplification au FISH						
ÉTUDE	ANTICORPS	N	IHC 3+ = POSITIFS		IHC 2+ / 3+ = POSITIFS	
			SENSIBILITÉ EN % (NOMBRES RÉELS)	SPÉCIFICITÉ EN % (NOMBRES RÉELS)	SENSIBILITÉ EN % (NOMBRES RÉELS)	SPÉCIFICITÉ EN % (NOMBRES RÉELS)
Egervari <i>et al.</i> , 2007*	HercepTest™	174	51,6 (16/31)	97,2 (139/143)	80,6 (25/31)	81,8 (117/143)
Hofmann <i>et al.</i> , 2007†	HercepTest™	289	90,7 (98/108)	95,0 (172/181)	100 (108/108)	55,2 (100/181)
Ciampa <i>et al.</i> , 2006	HercepTest™	108	81,5 (22/27)	75,3 (61/81)	92,6 (25/27)	25,9 (21/81)
Reddy <i>et al.</i> , 2006†	HercepTest™	1 289	86,2 (349/405)	93,3 (825/884)	95,8 (388/405)	71,6 (633/884)
Sáez <i>et al.</i> , 2006*‡	HercepTest™	181	92,9 (39/42)	91,4 (127/139)	95,2 (40/42)	81,3 (113/139)
Vocaturro <i>et al.</i> , 2006‡	HercepTest™	111	51,3 (20/39)	97,2 (70/72)	100 (39/39)	73,6 (53/72)
Ainsworth <i>et al.</i> , 2005	HercepTest™	165	31,4 (11/35)	99,2 (129/130)	65,7 (23/35)	98,5 (128/130)
Dolan et Snover, 2005	HercepTest™	129	41,7 (5/12)	93,2 (109/117)	100 (12/12)	19,7 (23/117)
Lal <i>et al.</i> , 2005	HercepTest™	3 655	67,6 (363/537)	98,9 (3 083/3 118)	91,4 (491/537)	84,2 (2 626/3 118)
Loring <i>et al.</i> , 2005	HercepTest™	110	100 (27/27)	95,2 (79/83)	100 (27/27)	74,7 (62/83)
Prati <i>et al.</i> , 2005	HercepTest™	198	57,9 (22/38)	96,9 (155/160)	81,6 (31/38)	80,6 (129/160)
Press <i>et al.</i> , 2005	HercepTest™	842	83,6 (204/244)	90,5 (541/598)	92,2 (225/244)	73,2 (438/598)
Olsen <i>et al.</i> , 2004§	HercepTest™	120	90,0 (27/30)	94,4 (85/90)	93,3 (28/30)	77,8 (70/90)
Owens <i>et al.</i> , 2004	HercepTest™	6 556	41,9 (648/1 547)	98,8 (4 950/5 009)	89,5 (1 384/1 547)	50,4 (2 527/5 009)
Varshney <i>et al.</i> , 2004	HercepTest™	687	88,5 (69/78)	96,9 (590/609)	100 (78/78)	85,9 (523/609)
Dowsett <i>et al.</i> , 2003	HercepTest™	426	77,4 (96/124)	98,0 (296/302)	98,4 (122/124)	88,7 (268/302)
Hammock <i>et al.</i> , 2003	HercepTest™	102	88,0 (22/25)	70,1 (54/77)	96,0 (24/25)	29,9 (23/77)
Ogura <i>et al.</i> , 2003	HercepTest™	110	83,3 (20/24)	100 (86/86)	87,5 (21/24)	89,5 (77/86)
McCormick <i>et al.</i> , 2002	HercepTest™	198	61,2 (41/67)	100 (131/131)	89,6 (60/67)	80,2 (105/131)
Roche <i>et al.</i> , 2002	HercepTest™	119	100 (79/79)	77,5 (31/40)	100 (79/79)	47,5 (19/40)
Tsuda <i>et al.</i> , 2001a	HercepTest™	101	88,2 (15/17)	96,4 (81/84)	88,2 (15/17)	89,3 (75/84)
Papadopoulos <i>et al.</i> , 2007†	HercepTest™ ou CB11	375	27,9 (29/104)	98,9 (268/271)	94,2 (98/104)	17,0 (46/271)
Hyun <i>et al.</i> , 2007‡	A0485	309	75,0 (45/60)	98,0 (244/249)	100 (60/60)	58,6 (146/249)
Sapino <i>et al.</i> , 2006	A0485	237	67,6 (23/34)	99,0 (201/203)	97,1 (33/34)	86,2 (175/203)
Yaziji <i>et al.</i> , 2004	A0485	2 913	56,5 (306/542)	98,8 (2 343/2 371)	92,6 (502/542)	58,5 (1 388/2 371)
Egervari <i>et al.</i> , 2007*	CB11	174	67,7 (21/31)	90,9 (130/143)	93,5 (29/31)	62,2 (89/143)
Sáez <i>et al.</i> , 2006*‡	CB11	182	95,2 (40/42)	88,6 (124/140)	95,2 (40/42)	70,7 (99/140)
Ma <i>et al.</i> , 2005	CB11	584	67,4 (196/291)	97,6 (286/293)	96,6 (281/291)	34,1 (100/293)
Kakar <i>et al.</i> , 2000	CB11	112	66,7 (14/21)	97,8 (89/91)	95,2 (20/21)	85,7 (78/91)

N : nombre de sujets; le test de référence (FISH) a été effectué à l'aide de la trousse PathVysion® à moins d'une spécification contraire; un résultat positif de FISH est défini par un rapport HER-2/CEP17 de $\geq 2,0$.

* Cette étude a aussi comparé le FISH à l'IHC effectuée à l'aide d'un autre anticorps.

† Résultats d'IHC et de FISH du laboratoire central.

‡ Échantillon de convenance.

§ FISH effectué à l'aide de la trousse pharmDx™.

TABLEAU D-5

Proportion* de résultats FISH positifs par score d'IHC selon le lieu d'exécution des tests					
ÉTUDE	ANTICORPS	N	SCORE D'IHC		
			0 OU 1+	2+	3+
Papadopoulos <i>et al.</i> , 2007	HercepTest™, CB11 ou autre†	311‡	13,3 (2/15)	26,6 (77/289)	57,1 (4/7)
	HercepTest™ ou CB11	375§	11,5 (6/52)	23,7 (69/291)	90,6 (29/32)
Reddy <i>et al.</i> , 2006	HercepTest™	903‡	4,2 (16/383)	33,1 (58/175)	73,6 (254/345)
		1 289§	2,6 (17/650)	16,9 (39/231)	85,5 (349/408)

N : nombre de sujets; la trousse PathVysion® a été utilisée; un résultat FISH est positif lorsque le rapport HER-2/CEP17 est de $\geq 2,0$.

* Les résultats sont présentés en pourcentage avec les nombres réels entre parenthèses.

† L'autre anticorps est un anticorps polyclonal, probablement le A0485.

‡ IHC effectuée dans plusieurs laboratoires locaux et FISH effectué dans un laboratoire central/de référence.

§ IHC et FISH effectués dans un seul laboratoire central.

TABLEAU D-6

Performance du RT-PCR en temps réel à détecter les cas d'amplification au FISH						
ÉTUDE	N	EXACTITUDE EN % (NOMBRES RÉELS)	SENSIBILITÉ EN % (NOMBRES RÉELS)	SPÉCIFICITÉ EN % (NOMBRES RÉELS)	VPP EN % (NOMBRES RÉELS)	VPN EN % (NOMBRES RÉELS)
Ginestier <i>et al.</i> , 2004*†	83	88,0 (73/83)	78,8 (26/33)	94,0 (47/50)	89,7 (26/29)	87,0 (47/54)

N : nombre de sujets.

* FISH effectué à l'aide des trousse PathVysion® et pharmDx™ pour chaque échantillon.

† Échantillon de convenance.

TABLEAU D-7

Proportion de résultats FISH positifs par score d'IHC obtenue dans trois revues systématiques et méta-analyses				
SCORE D'IHC	PRÉSENT RAPPORT*		LBI-HTA [2007]†	DENDUKURI ET AL., [2007]‡
	Médiane en %	Moyenne pondérée en %	Moyenne pondérée en %	Médiane pondérée en %
0	2,0	2,6	s. o.	1,6
1+	3,6	4,9	s. o.	4,9
0 ou 1+	2,6	3,4	2,7	s. o.
2+	16,9	21,7	s. o.	29,8
3+	89,9	87,9	87,9	92,4

LBI-HTA : Ludwig Boltzmann Institute for Health Technology Assessment; s. o. : sans objet.

* Le présent rapport inclut 20 200 sujets issus de 27 études.

† Les résultats de cette revue systématique sont issus de 11 études.

‡ Cette méta-analyse bayésienne inclut 8 419 sujets issus de 17 études.

ANNEXE E

RÉSUMÉS DES ÉTUDES INCLUSES

TABLEAU E-1

Résumé des études incluses dans la présente revue systématique				
ÉTUDE	NOMBRE DE PATIENTES (OU D'ÉCHANTILLONS ANALYSÉS)	MÉTHODOLOGIE	TECHNIQUE ET INTERPRÉTATION	COMMENTAIRES
Ainsworth <i>et al.</i> , 2005 Royaume-Uni	165	Carcinomes mammaires réséqués entre 1984 et 1998 chez des patientes pour lesquelles il y a eu un suivi prospectif. Échantillons : tissus FFPE archivés.	IHC : HercepTest™ selon les instructions du manufacturier; coloration automatisée des lames; démasquage antigénique : tampon citrate 10 mmol/L dans un bain-marie à 95 °C 40 min; point seuil de 10 %. FISH : PathVysion®, 20 cellules analysées dans chaque région; amplification si rapport HER-2/CEP17 ≥ 2.	Étude visant à comparer les résultats d'IHC effectuée avec l'anti-corps CBE356 et HercepTest™, à évaluer la performance de l'IHC en référence au FISH et la valeur pronostique des tests. La méthode d'échantillonnage ainsi que les critères d'inclusion et d'exclusion des échantillons ne sont pas clairement mentionnés; étude exclue de la distribution des scores d'IHC en raison d'un biais de sélection. Il n'est pas mentionné qui, ni combien d'observateurs ont interprété les tests, ni si cela s'est fait en connaissant les résultats cliniques ou d'autres tests; selon les auteurs, l'inexpérience avec la technique et l'interprétation du HercepTest™ pourraient expliquer le haut taux de résultats FISH positifs dans la catégorie IHC 0 ou 1+. Conclusion : CBE356 prédit mieux l'amplification du gène que le HercepTest™.
Bartlett <i>et al.</i> , 2007 Royaume-Uni	5 (428)	Étude prospective. Échantillons provenant de cinq lignées cellulaires différentes de carcinomes du sein de statut HER-2 connu (3 négatifs, 1 positif, 1 faiblement positif) analysés par six laboratoires de référence et 31 autres laboratoires participants (Royaume-Uni, Australie, Danemark, République d'Irlande, France, Norvège, Portugal, Slovaquie, Suisse, Pays-Bas, Hong-Kong et République populaire de Chine). Échantillons : culots de cellules fixés à la formaline et inclus en paraffine, montés sur lames non colorées (Novocastra).	FISH : dans les laboratoires de référence : PathVysion®, pharmDx™ ou INFORM®, dans les autres laboratoires participants : non mentionné.	Étude visant à évaluer la performance de différents laboratoires à effectuer le FISH. Échantillons envoyés lors de trois rondes sur une période de 12 mois (2004-2005); résultats de 428 analyses rapportés pour cinq lignées cellulaires. Un résultat est « approprié » lorsqu'il est à l'intérieur des limites des résultats (rapport HER-2/CEP17) obtenus par les laboratoires de référence, « acceptable » lorsqu'il est à l'intérieur des 10 % de ces limites et « inapproprié » lorsque hors limites. Les résultats étaient présentés en rapport HER-2/CEP17 ou en nombre de copies de HER-2 par noyau. Les laboratoires ne connaissaient pas le statut HER-2 associé à la lignée cellulaire lorsqu'ils effectuaient les tests. Conclusion : les laboratoires de référence et une bonne proportion des autres centres obtiennent des résultats acceptables.

TABLEAU E-1 (SUITE)

Résumé des études incluses dans la présente revue systématique				
ÉTUDE	NOMBRE DE PATIENTES (OU D'ÉCHANTILLONS ANALYSÉS)	MÉTHODOLOGIE	TECHNIQUE ET INTERPRÉTATION	COMMENTAIRES
Bhargava <i>et al.</i> , 2005 États-Unis	102	Cancers du sein invasifs préalablement testés par FISH et sélectionnés dans une cohorte de 2 000 cas. Échantillons : blocs de tissus FFPE archivés; TMA's construites à partir de 4 fragments tissulaires de 0,6 mm de diamètre par tumeur.	FISH : Path Vysion [®] , ≥ 30 cellules analysées; amplification si rapport HER-2/CEP17 ≥ 2,0. CISH : sonde marquée à la DIG + CISH Polymer Detection Kit (Zymed [®]); sonde CEP17 marquée à la biotine + CISH Centromere Detection Kit (Zymed); amplification si > 5 copies de HER-2 par noyau ou rapport HER-2/CEP17 ≥ 2,0.	Étude visant à comparer le CISH et le FISH. La méthode d'échantillonnage ainsi que les critères d'inclusion et d'exclusion ne sont pas mentionnés; biais associé à la sélection volontaire d'un échantillon avec une forte proportion de cas de faible amplification. Interprétation du CISH sans connaître les résultats de FISH. Conclusion : le CISH performe aussi bien que le FISH.
Cayre <i>et al.</i> , 2007 France	55	Échantillons tumoraux de patientes atteintes d'un cancer du sein invasif recueillis entre janvier 2001 et avril 2003. Échantillons : tissus FFPE.	FISH : Path Vysion [®] et pharmDx [™] avec modifications mineures aux instructions des manufacturiers : amplification si rapport HER-2/CEP17 ≥ 2; INFORM [®] : amplification si > 4, > 5 ou ≥ 6 signaux par noyau; ≥ 30 cellules analysées. CISH : trousse SPoT-Light (Zymed [®]); ≥ 30 cellules analysées; amplification si > 5 ou ≥ 6 signaux par noyau dans > 50 % des cellules, ou gros agrégats.	Étude visant à comparer les différentes troupes disponibles pour le FISH et le CISH. La méthode d'échantillonnage ainsi que les critères d'inclusion et d'exclusion ne sont pas clairement mentionnés; biais associé à la sélection d'un échantillon composé d'une proportion représentative de cas équivoques à l'IHC (HercepTest [™] : 22 % 2+; 45 % 3+); étude exclue de la distribution des scores d'IHC. Résultats de comparaison IHC (HercepTest et A0485) versus FISH et CISH exclus en raison de la taille d'échantillon. Interprétation de chaque échantillon par deux anatomopathologistes indépendants. Conclusion : le diagnostic des cas comportant > 5-10 signaux par noyau au CISH doit être confirmé par une sonde centromérique (FISH à deux sondes ou CISH).

TABLEAU E-1 (SUITE)

Résumé des études incluses dans la présente revue systématique				
ÉTUDE	NOMBRE DE PATIENTES (OU D'ÉCHANTILLONS ANALYSÉS)	MÉTHODOLOGIE	TECHNIQUE ET INTERPRÉTATION	COMMENTAIRES
Ciampa <i>et al.</i> , 2006 États-Unis	108	Étude portant sur des échantillons de cancers du sein primitifs (carcinomes canalaux infiltrants) sélectionnés dans les archives de pathologie d'un centre hospitalier. Échantillons : prélevés par exérèses et biopsies au trocart; tissus fixés en formol tamponné 10 % et inclus en paraffine.	IHC : HercepTest™ selon les instructions du manufacturier; coloration automatisée des lames; analyse manuelle et par ACIS (données exclues); point seuil de 10 %. FISH : PathVysion® selon les instructions du manufacturier; 30 cellules analysées; amplification si rapport HER-2/CEP17 $\geq 2,0$.	Étude visant à comparer les résultats d'IHC, obtenus par système ACIS, à ceux du FISH. Les données d'interprétation manuelle sont disponibles et incluses dans la présente évaluation. La méthode d'échantillonnage ainsi que les critères d'inclusion et d'exclusion des échantillons ne sont pas clairement mentionnés. Biais de sélection probable (78,7 % de scores d'IHC 2+/3+); étude exclue de la distribution des scores d'IHC. Interprétation manuelle de l'IHC par un seul anatomopathologiste, à l'insu des résultats du FISH et IHC (ACIS). Conclusions : bonne corrélation de l'amplification du gène HER-2 par FISH avec les scores ACIS $\leq 1,5$ et $\geq 2,6$; le FISH n'est pas nécessaire dans ces cas.
Dandachi <i>et al.</i> , 2004; 2002; Hauset-Kronberger; Dandachi, 2004* Australie	171	Étude rétrospective de cohorte incluant des patientes atteintes d'un cancer primitif et invasif du sein diagnostiqué entre 1993 et 1999; échantillons archivés réévalués par IHC et CISH. Interprétation du CISH par deux des auteurs de façon indépendante et à l'insu des résultats cliniques et ceux des autres essais [Dandachi <i>et al.</i> , 2002]. Échantillons : tissus FFPE.	IHC : HercepTest™; protocole et interprétation selon les instructions du manufacturier. CISH : sonde HER-2 marquée à la DIG (Zymed®) + anti-DIG de souris + anti-souris de chèvre couplé à la biotine + complexe biotine-streptavidine-HRP (Dako) + DAB; ≥ 60 cellules analysées; amplification si ≥ 6 copies de HER-2 par noyau ou si des agrégats sont présents dans > 50 % des cellules.	Étude visant à déterminer l'utilité clinique du CISH pour la détermination du statut HER-2 dans le cancer du sein primitif. La présence ou l'absence de critères d'exclusion n'est pas mentionnée. Les échantillons ayant obtenu des résultats discordants d'IHC et de CISH ou un résultat positif d'IHC (2+/3+) ont été réévalués par FISH; ces résultats ont été exclus de l'analyse en raison d'un biais de sélection. La technique du PCR différentiel a également été comparée à l'IHC (résultats exclus du présent rapport). Conclusion : le CISH offre une approche idéale pour la détection de l'amplification du gène HER-2 en permettant un examen morphologique simultané.

* Les mêmes résultats ont été publiés trois fois.

TABLEAU E-1 (SUITE)

Résumé des études incluses dans la présente revue systématique				
ÉTUDE	NOMBRE DE PATIENTES (OU D'ÉCHANTILLONS ANALYSÉS)	MÉTHODOLOGIE	TECHNIQUE ET INTERPRÉTATION	COMMENTAIRES
Di Palma <i>et al.</i> , 2007 Angleterre	161	Étude rétrospective incluant des patientes avec un cancer du sein pour qui un échantillon et un résultat d'IHC et (ou) de FISH était disponible. Un test de CISH est effectué à l'aide du matériel archivé. Le test est interprété par deux anatomopathologistes indépendants et le résultat est comparé aux résultats antérieurs d'IHC et de FISH. Échantillons : prélevés entre autres par biopsies au trocart.	IHC : HercepTest™ selon les instructions du manufacturier. CISH : essai de Zymed® (Invitrogen) selon les instructions du manufacturier; amplification si > 5 copies de HER-2 par noyau et (ou) si des agrégats sont présents dans > 50 % des cellules.	Étude visant à valider le CISH pour une implantation dans un hôpital. La méthode d'échantillonnage ainsi que les critères d'inclusion et d'exclusion ne sont pas clairement mentionnés; étude exclue de la distribution des scores d'IHC. Le résultat du CISH a été reconfirmé par FISH (PathVysion®) lorsque différent de celui de l'IHC ou lorsque de 3 à 10 copies de HER-2 étaient présentes par noyau (n = 24); les résultats comparant le CISH et le FISH sont exclus du présent rapport mais concordent parfaitement. Le CISH a été interprété par deux anatomopathologistes indépendants, mais il n'est pas mentionné s'ils connaissaient les résultats d'IHC et (ou) de FISH. Conclusion : le CISH est aussi efficace que le FISH comme outil diagnostique.
Dietel <i>et al.</i> , 2007 Allemagne	99	Série consécutive de cancers du sein invasifs diagnostiqués et opérés en 2005 et en 2006 dans un seul centre. Échantillons : biopsies-exérèses; tissus fixés au formol tamponné 4 % (6-24 h) et inclus en paraffine.	FISH : Path Vysion®; ≥ 20 cellules analysées; rapport HER-2/CEP 17 positif si > 2,2, équivoque si = 1,8 à 2,2 et négatif si < 1,8; ou positif si > 6 copies de HER-2 par noyau et négatif si < 4 copies. SISH : sondes INFORM® HER-2 et du centromère du chromosome 17 marquées au DNP + anti-DNP de lapin + ultra-View™ SISH Detection Kit (Ventana); technique automatisée (Benchmark®, Ventana); rapport HER-2/CEP 17 positif si > 2,2, équivoque si = 1,8 à 2,2 et négatif si < 1,8.	Étude visant à comparer la concordance entre l'amplification du gène HER-2 déterminée par FISH et par SISH. Le plan de l'étude, la méthode d'échantillonnage et les critères d'inclusion sont bien décrits. Évaluation en aveugle effectuée par cinq anatomopathologistes indépendants suivant les lignes directrices de l'ASCO/CAP pour la détermination de la variabilité interobservateurs. Conclusions : la concordance globale entre le SISH et le FISH est élevée; la variabilité interobservateurs du SISH est faible.

TABLEAU E-1 (SUITE)

Résumé des études incluses dans la présente revue systématique				
ÉTUDE	NOMBRE DE PATIENTES (OU D'ÉCHANTILLONS ANALYSÉS)	MÉTHODOLOGIE	TECHNIQUE ET INTERPRÉTATION	COMMENTAIRES
Dolan et Snover, 2005 États-Unis	129	Étude prospective. Série de 275 cas de cancer du sein reçus dans un laboratoire de référence pour FISH entre octobre 2001 et mars 2004; les 129 cas ayant un résultat d'IHC disponible ont été inclus. Échantillons : prélevés par biopsie au trocart, excision/biopsie-exérèse ou culots de cellules; tissus FFPE.	IHC : HercepTest™ selon les instructions du manufacturier; démasquage antigénique : incubation dans un tampon citrate 20 min à 90-95 °C. FISH : PathVysion®; 60 cellules analysées lorsque possible; amplification si rapport $\geq 2,0$.	Étude visant à déterminer les taux de concordance entre des tests d'IHC effectués par plusieurs anatomopathologistes dans un même laboratoire central et des FISH effectués dans un laboratoire de référence. Le plan de l'étude n'est pas clairement mentionné. Biais de sélection (82,2 % de scores d'IHC 2+/3+) possiblement dû à la référence au test FISH; étude exclue de la distribution des scores d'IHC. FISH : une méthode alternative de pré-traitement a été utilisée dans certains cas, mais le laboratoire a reçu une certification de compétence par Vysis. Conclusion : il est recommandé de tester chaque cas IHC 2+ par FISH et d'utiliser le FISH seul si le nombre de cas IHC 2+/3+ est de 1,6 à 2,6 fois le nombre de cas 0/1+.
Downs-Kelly et al., 2005 États-Unis	94	Fragments tissulaires provenant de 80 cas de carcinome invasif du sein obtenus dans un seul établissement. Échantillons : pièces de résection ou biopsies-exérèses; tissus FFPE; « <i>midarrays</i> » construits à partir de fragments tissulaires de 3 mm de diamètre.	SISH : EnzMet™; 2 x 20 cellules analysées; amplification positive si ≥ 6 copies du gène HER-2 par noyau, et négative si 1 à 2 copies par noyau ou polysomie 17 (3 à 5 copies dans > 30 % des noyaux). IHC : CB11 + phosphatase alcaline + substrat <i>fast red K</i> (Ventana) selon les instructions du manufacturier. FISH : PathVysion®; 2 x 20 cellules analysées; amplification si rapport HER-2/CEP17 $\geq 2,0$.	Étude de validation de la technique EnzMet™ GenePro combinant la détection du nombre de copies du gène HER-2 et l'expression de la protéine. Les résultats sont comparés à ceux du FISH. Le plan de l'étude, la méthode d'échantillonnage ainsi que les critères d'inclusion et d'exclusion ne sont pas mentionnés. L'énumération de tous les signaux du test SISH (composante EnzMet™) n'a pas été effectuée par tous les anatomopathologistes (5) pour chaque fragment tissulaire. Un anatomopathologiste a énuméré les signaux EnzMet™ de tous les fragments tissulaires sans connaître les résultats de FISH et d'IHC. Le nombre de copies par noyau du gène HER-2 obtenu par la composante EnzMet™ du test concorde de façon excellente avec celui obtenu par FISH (coefficient de Pearson = 0,95). La reproductibilité interobservateurs (cinq anatomopathologistes) est excellente pour la composante EnzMet™ du test EnzMet™ GenePro (k = 0,96). Chaque observateur a évalué les lames sans connaître les résultats des autres observateurs. La corrélation entre la composante IHC du test et la composante EnzMet™ du test EnzMet™ GenePro a été de 97,9 % (92/94).

TABLEAU E-1 (SUITE)

Résumé des études incluses dans la présente revue systématique				
ÉTUDE	NOMBRE DE PATIENTES (OU D'ÉCHANTILLONS ANALYSÉS)	MÉTHODOLOGIE	TECHNIQUE ET INTERPRÉTATION	COMMENTAIRES
Dowsett <i>et al.</i> , 2007b Étude internationale (Pays-Bas, Canada, France, Belgique et Allemagne)	40	Étude circulaire interlaboratoires incluant cinq rondes à intervalles d'environ 2 mois; à chaque ronde, un des centres envoie 8 échantillons différents, préalablement testés par IHC (4) ou FISH (4), aux quatre autres centres. Échantillons : coupes de tissus fixés à la formaline (12-48h) et inclus en paraffine.	IHC : HercepTest™ selon les instructions du manufacturier. FISH : PathVysion® selon les instructions du manufacturier; amplification si rapport HER-2/CEP17 $\geq 2,0$.	Étude visant à évaluer le consensus interlaboratoires de l'IHC et du FISH entre cinq centres de pathologie hautement expérimentés dans le cancer du sein, à identifier les facteurs qui contribuent aux résultats discordants et à évaluer un programme d'échange de lames comme outil d'assurance qualité. La méthode d'échantillonnage ainsi que les critères d'inclusion et d'exclusion ne sont pas clairement mentionnés; biais associé à la sélection volontaire d'un échantillon composé d'une forte proportion de cas équivoques. Tous les cas testés équivoques à l'IHC ont été retestés par FISH par tous les centres; résultats exclus du présent rapport. Conclusion : les cas équivoques à l'IHC et au FISH sont difficiles à interpréter même pour des centres expérimentés, ce qui vient étayer l'importance des procédures d'assurance qualité.
Dowsett <i>et al.</i> , 2003 Royaume-Uni	468 (426)	Échantillons provenant de patientes atteintes d'un cancer du sein métastatique envoyés par 37 hôpitaux dans trois laboratoires de référence contrôlant l'accès au trastuzumab avant son approbation en Europe. Échantillons : blocs histopathologiques ou coupes histologiques.	IHC : HercepTest™ selon les instructions du manufacturier; démasquage antigénique : immersion des lames dans un tampon citrate (fourni dans la trousse) préchauffé à 95-99 °C; point seuil de 10 %. FISH : PathVysion®, 60 cellules analysées; amplification si rapport HER-2/CEP17 $\geq 2,0$.	Étude visant à établir la corrélation entre les résultats d'IHC et de FISH, ainsi que la variabilité interlaboratoires de l'IHC. Étude exclue de la distribution des scores d'IHC en raison de l'inclusion de patientes atteintes d'un cancer du sein métastatique seulement. Dans chaque centre, l'interprétation de l'IHC a été effectuée par tout au plus deux anatomopathologistes; pour les deux techniques, il n'est pas mentionné si l'interprétation du FISH s'est faite sans connaître le résultat d'IHC et vice-versa. Vingt lames (IHC 1+, 2+ ou 3+) ont été sélectionnées par chacun des centres pour déterminer la variabilité interlaboratoires; les lames colorées par chacun des centres ont circulé; tous les cas discordants impliquaient un score 2+. Conclusion : les cas IHC 2+ uniquement nécessitent d'être testés par FISH dans un centre de référence.

TABLEAU E-1 (SUITE)

Résumé des études incluses dans la présente revue systématique				
ÉTUDE	NOMBRE DE PATIENTES (OU D'ÉCHANTILLONS ANALYSÉS)	MÉTHODOLOGIE	TECHNIQUE ET INTERPRÉTATION	COMMENTAIRES
Dybdal <i>et al.</i> , 2005 États-Unis	529	Échantillons tumoraux obtenus de participantes à un examen d'admissibilité à l'une des trois études de base du trastuzumab (Clinical Trial Assay); inclusion restreinte aux cas ayant suffisamment de matériel archivé disponible pour effectuer des tests dans deux laboratoires. Échantillons : tumeurs primaires; coupes archivées de tissus fixés et inclus en paraffine, non colorées (laboratoire de référence) ou préalablement utilisées pour une IHC (autre laboratoire).	FISH : Path Vysion [®] , laboratoire de référence : 40 cellules analysées en moyenne (20 supplémentaires si rapport HER-2/CEP17 = 1,8 à 2,2; autre laboratoire : 60 cellules analysées; amplification si rapport HER-2/CEP17 $\geq$ 2.	Étude visant entre autres à évaluer la reproductibilité interlaboratoires du FISH effectué à partir de tissus archivés. IHC effectuée à l'aide des anticorps CB11 ou 4D5 (résultats indissociables); résultats de comparaison de l'IHC et du FISH exclus du présent rapport. Tests FISH effectués dans un laboratoire central (de référence) et dans le laboratoire du Cancer International Research Group. Interprétation du FISH au laboratoire de référence effectuée sans connaître les résultats d'IHC. Conclusion : très bonne reproductibilité entre les deux laboratoires.
Egervari <i>et al.</i> , 2007 Hongrie	174	Série consécutive de cas de cancer du sein invasif sélectionnés dans les archives d'un département de pathologie. Nouvelles lames d'IHC construites à partir des tissus FFPE archivés et évaluées par deux observateurs indépendants. TMAs construites prospectivement pour l'IHC et le FISH.	IHC : HercepTest [™] selon les instructions du manufacturier et CB11 (Novocastra); coloration automatisée des lames; point seuil de 10 %. FISH : Path Vysion [®] , 30 cellules analysées (+ 20 si rapport HER-2/CEP17 = 1,8 à 2,2); amplification si rapport HER-2/CEP17 $\geq$ 2,0.	Étude visant à déterminer l'applicabilité d'une utilisation clinique de routine des micromatrices tissulaires. Les auteurs ont comparé les coupes histologiques classiques et les TMAs d'IHC au FISH (effectué à partir de TMAs). Les résultats présentés dans le présent rapport font référence aux tests d'IHC effectués sur coupes histologiques classiques. Taux d'échec de 10,2 % avec les TMAs. Il n'est pas mentionné si le ou les observateurs du FISH connaissent les résultats d'IHC. Conclusions : l'utilisation des TMAs de 20 cas ou moins ne demande pas de coûts ou de temps supplémentaire excessifs et permet d'atteindre de hauts niveaux de standardisation; les établissements effectuant beaucoup de tests devraient considérer leur utilisation en clinique.

TABLEAU E-1 (SUITE)

Résumé des études incluses dans la présente revue systématique				
ÉTUDE	NOMBRE DE PATIENTES (OU D'ÉCHANTILLONS ANALYSÉS)	MÉTHODOLOGIE	TECHNIQUE ET INTERPRÉTATION	COMMENTAIRES
Fitzgibbons <i>et al.</i> , 2006 États-Unis	160	Carcinomes mammaires obtenus d'un seul établissement. En 2004 et en 2005, les laboratoires participants (102 et 141, respectivement) ont reçu 8 TMAs (80 cas) non colorées sur lesquelles ils ont dû effectuer un test d'IHC selon leur propre méthode. Échantillons : tissus fixés à la formaline; TMAs construites à partir de fragments tissulaires de 3 mm de diamètre.	IHC : HercepTest™ dans > 50 % des laboratoires et presque tous les autres ont utilisé un anticorps monoclonal (principalement le CB11, Ventana); la plupart des laboratoires ont utilisé un appareil de coloration automatisée des lames et un démasquage antigénique à la chaleur à pH < 7,0 pour 30 à 45 min; interprétation selon le système de scoring du HercepTest™.	Analyse des résultats d'enquête du CAP (Immunohistochemistry Tissue Microarray Survey) de 2004 et 2005 pour évaluer la faisabilité d'utiliser des TMAs pour évaluer la performance des laboratoires à effectuer des IHC. La méthode d'échantillonnage n'est pas clairement mentionnée; les cas sélectionnés devaient avoir été préalablement testés par IHC (CB11) et leur résultat devait concorder avec celui du FISH (PathVysion®). Pour qu'un échantillon soit pris en compte pour évaluer la performance des laboratoires, il devait obtenir un résultat (négatif 0/1+ vs positif 2+/3+) consensuel chez ≥ 90 % des participants. La plupart des laboratoires (80 %) avaient une expérience préalable avec les TMAs. Conclusions : la capacité à effectuer des IHC est excellente parmi les laboratoires; l'utilisation des TMAs est valide pour l'évaluation de la performance interlaboratoires.

TABLEAU E-1 (SUITE)

Résumé des études incluses dans la présente revue systématique				
ÉTUDE	NOMBRE DE PATIENTES (OU D'ÉCHANTILLONS ANALYSÉS)	MÉTHODOLOGIE	TECHNIQUE ET INTERPRÉTATION	COMMENTAIRES
Ginestier <i>et al.</i> , 2004 France	85	Sélection de tumeurs mammaires provenant de femmes traitées dans un institut; inclut seulement les cas pour lesquels un échantillon congelé était disponible. Échantillons : TMAs construites à partir de fragments tissulaires de 2 mm de diamètre provenant de tissus FFPE pour l'IHC et le FISH; tumeurs congelées pour le PCR et le RT-PCR.	IHC : HercepTest™, A0485, CB11 (Novocastra) et TAB250; anti-lapin biotinylé + streptavidine conjuguée à la HRP (Dako LSAB™ 2 kit) + DAB; point seuil de 10 %. FISH : PathVysion® et pharmDx™, environ 40 cellules analysées; amplification si rapport HER-2/CEP17 $\geq 2,0$; négatif si < 10 % des tumeurs montrent une amplification. PCR : gène de référence : APP. RT-PCR : gène de référence : TBP.	Étude visant à comparer différentes méthodes de détermination du statut HER-2. Biais associé à la sélection volontaire d'un échantillon composé d'une proportion anormalement élevée de cas IHC 1+ ou 2+. Chaque test FISH a été évalué deux fois par deux observateurs; interprétation en aveugle de l'IHC par un spécialiste en pathologie du sein et deux autres spécialistes en pathologie chirurgicale. Selon les auteurs : aucune différence entre le PathVysion® et le pharmDx™ pour le FISH ($k = 0,92$). Résultats de comparaison entre l'IHC et le FISH exclus du présent rapport en raison de la taille d'échantillon inférieure à 100. Conclusion : le PCR en temps réel ne donne pas de meilleurs résultats que l'IHC et le FISH combinés.

TABLEAU E-1 (SUITE)

Résumé des études incluses dans la présente revue systématique				
ÉTUDE	NOMBRE DE PATIENTES (OU D'ÉCHANTILLONS ANALYSÉS)	MÉTHODOLOGIE	TECHNIQUE ET INTERPRÉTATION	COMMENTAIRES
Gong <i>et al.</i> , 2005 États-Unis	80	Série consécutive de carcinomes mammaires infiltrants pour lesquels un résultat de FISH est disponible dans les archives d'un centre. CISH effectué à partir de coupes archivées provenant des mêmes blocs de tissus FFPE utilisés pour le FISH. Échantillons : prélevés par biopsie-exérèse.	FISH : PathVysion®; ≥ 60 cellules analysées; amplification si rapport HER/CEP17 ≥ 2,0. CISH : sonde marquée à la DIG + anti-DIG de souris + anti-souris couplé à la HRP + DAB (Zymed®); amplification si ≥ 6 copies de HER-2 par noyau ou présence d'agregats dans > 50 % des cellules.	Étude visant à comparer le CISH et le FISH et à évaluer la reproductibilité interobservateurs. Les critères d'inclusion et d'exclusion ne sont pas clairement mentionnés. Interprétation indépendante du CISH par trois anatomopathologistes; résultats de reproductibilité interobservateurs exclus du présent rapport en raison des erreurs typographiques ou d'incohérences. Conclusions : la concordance entre les résultats de CISH et de FISH est presque parfaite, et le CISH est hautement reproductible entre trois anatomopathologistes; le FISH est recommandé pour confirmer les résultats équivoques ou limites au CISH.
Hammock <i>et al.</i> , 2003 États-Unis	102	Cas de carcinome du sein invasif diagnostiqués ou référés dans un laboratoire universitaire en 2002.	IHC : HercepTest™ selon les instructions du manufacturier; coloration automatisée des lames; point seuil de 10 %. FISH : PathVysion®; ≥ 60 cellules analysées; amplification si rapport HER-2/CEP17 ≥ 2,0.	Étude visant à comparer les résultats des tests d'IHC et de FISH d'un seul établissement pour une année. Le plan de l'étude, la méthode d'échantillonnage ainsi que les critères d'inclusion et d'exclusion ne sont pas clairement spécifiés. Les cas IHC 2+ et 3+ sont de routine retestés au FISH dans cet établissement. Biais de sélection relatif à la référence au test FISH (proportion de cas IHC 2+/3+ = 76,5 %); 20 des 24 cas IHC 0 ou 1+ retestés au FISH étaient des cas de cancer apparemment plus agressif; étude exclue de la distribution des scores d'IHC. Interprétation du FISH par deux observateurs indépendants; il n'est pas mentionné si les observateurs connaissaient ou non les résultats d'IHC et vice-versa. Plusieurs échantillons provenaient d'autres laboratoires et pourraient avoir été fixés à l'aide de fixateur autre que le formol tamponné 10 %. Conclusion : les cas IHC 2+ et 3+ devraient être retestés au FISH.

TABLEAU E-1 (SUITE)

Résumé des études incluses dans la présente revue systématique				
ÉTUDE	NOMBRE DE PATIENTES (OU D'ÉCHANTILLONS ANALYSÉS)	MÉTHODOLOGIE	TECHNIQUE ET INTERPRÉTATION	COMMENTAIRES
Hanna et Kwok, 2006 Canada	254	Étude portant sur des patientes avec un carcinome du sein invasif. Tous les cas ont été évalués par les deux expérimentateurs; l'interprétation du CISH s'est faite sans connaître les résultats d'IHC et de FISH.	IHC : HercepTest™ selon les instructions du manufacturier; point seuil non précisé. FISH : PathVysion® selon les instructions du manufacturier; 60 cellules analysées; amplification si rapport HER-2/CEP17 $\geq 2,0$. CISH : selon le protocole du SWCHSC; Zyomed® Spot-Light CISH Polymer Detection Kit; amplification si > 5 copies du gène HER-2 par noyau.	Étude visant à valider le CISH pour évaluer l'amplification du gène HER-2 chez les cas positifs (3+), négatifs (0/1+) et équivoques (2+) à l'IHC. La concordance entre le CISH et le FISH a été calculée pour chacun de ces groupes. Le plan de l'étude, la méthode d'échantillonnage ainsi que les critères d'inclusion et d'exclusion ne sont pas mentionnés. Biais de sélection probable puisque 72,8 % des scores d'IHC étaient de 2+/3+; étude exclue de la distribution des scores d'IHC. Il n'est pas mentionné si l'interprétation du FISH s'est faite en connaissant le résultat d'IHC et vice-versa. La majorité (11/12) des cas discordants entre le CISH et le FISH étaient très faiblement amplifiés (ou sur la limite) avec le FISH. Il n'a pas été possible d'extraire la proportion de cas FISH et CISH positifs dans la catégorie IHC 2+ ni d'extraire les valeurs de sensibilité et de spécificité du CISH pour ce même groupe. Conclusion : le CISH est une option de rechange viable au FISH; elle est recommandée comme test initial ou test confirmatoire pour les cas 2+ à l'IHC.
Hashizume et al., 2003 Japon	76	Cas de carcinome du sein invasif en provenance d'un seul laboratoire. Échantillons : tumeurs réséquées et fixées dans du formol tamponné 15 %.	IHC : HercepTest™ selon les instructions du manufacturier; point seuil de 10 %.	Étude ayant comme objectif secondaire d'évaluer la concordance des résultats d'IHC entre deux laboratoires. Le plan de l'étude, la méthode d'échantillonnage ainsi que les critères d'inclusion et d'exclusion ne sont pas clairement mentionnés. Il n'est pas mentionné si les résultats des lames envoyées du premier au second laboratoire étaient connus de ce dernier. Conclusion : l'accord entre les deux laboratoires pour les quatre scores d'IHC a été bon (substantiel).
Hauser-Kronberger et Dandachi, 2004 Australie	171	Voir Dandachi et al., 2004.		

TABLEAU E-1 (SUITE)

Résumé des études incluses dans la présente revue systématique				
ÉTUDE	NOMBRE DE PATIENTES (OU D'ÉCHANTILLONS ANALYSÉS)	MÉTHODOLOGIE	TECHNIQUE ET INTERPRÉTATION	COMMENTAIRES
Hofmann <i>et al.</i> , 2007 Allemagne	289	Patientes atteintes d'un cancer du sein métastatique participant à l'étude WO16229 sur l'efficacité du trastuzumab [Baselga <i>et al.</i>, 2005] et dont le statut HER-2 a été déterminé par IHC et FISH dans un même laboratoire central. Échantillons : tumeurs primitives ou biopsies de sites métastatiques.	IHC : HercepTest™ selon les instructions du manufacturier; point seuil de 10 %. FISH : PathVysion® selon les instructions du manufacturier; 60 cellules analysées; amplification si rapport HER-2/CEP17 $\geq 2,0$.	Étude visant à déterminer la corrélation entre les résultats d'IHC et de FISH obtenus dans un laboratoire central et la réponse au trastuzumab. Le plan de l'étude et la méthode d'échantillonnage ne sont pas clairement mentionnés. Il n'est pas clair si l'échantillon comprend toutes les patientes soumises au test d'admissibilité au laboratoire central. Biais de sélection dû en partie à l'inclusion de patientes avec un stade métastatique seulement résultant en une proportion élevée de scores d'IHC 2+/3+ (65,4 %); étude exclue de la distribution des scores d'IHC. Aucune information n'est disponible au sujet des observateurs et de leur connaissance des résultats cliniques ou des autres tests effectués. Conclusions : les cas IHC 2+ devraient être retestés par FISH ou CISH. Si le statut HER-2 est initialement obtenu par FISH, les cas négatifs mais avec une polysomie du chromosome 17 (≥ 3 copies par noyau) devraient être retestés par IHC et les cas positifs (IHC 3+) devraient être considérés pour le trastuzumab.

TABLEAU E-1 (SUITE)

Résumé des études incluses dans la présente revue systématique				
ÉTUDE	NOMBRE DE PATIENTES (OU D'ÉCHANTILLONS ANALYSÉS)	MÉTHODOLOGIE	TECHNIQUE ET INTERPRÉTATION	COMMENTAIRES
Hyun <i>et al.</i> , 2007 Corée du Sud	309	Cas de cancer du sein invasif recueillis dans un hôpital entre mai 2003 et décembre 2005 : 216 cas consécutifs pour la validation + 93 cas sélectionnés (IHC 1+ et 2+) pour évaluer l'effet de la polysomie 17 dans ce groupe. Échantillons : fixés dans du formol tamponné 10 % et inclus en paraffine; TMAs : 3 fragments tissulaires de 2,0 mm de diamètre par tumeur.	IHC : A0485 (DakoCytomation) dilué 1:700; démasquage antigénique : acide citrique 0,1 M, pH 7,2, 15 min au four à micro-ondes; coloration automatisée des lames; point seuil de 10 %. FISH : PathVysion® selon les instructions du manufacturier; 60 cellules analysées; amplification si rapport HER-2/CEP17 ≥ 2, faible si ≥ 2 ou < 5 et élevée si ≥ 5. CISH : sonde marquée à la DIG + anti-DIG de souris + HRP anti-souris polymérisé + DAB (Zymed®); amplification si ≥ 6 copies, ou présence d'agregats, dans > 50 % des cellules (élevée si > 10 copies ou agrégats importants).	Étude visant à étudier l'effet de la polysomie 17 sur le statut HER-2 évalué par IHC, FISH et CISH. Le plan de l'étude ainsi que les critères d'inclusion et d'exclusion ne sont pas clairement spécifiés; méthode d'échantillonnage non mentionnée pour 93 cas; étude exclue de l'analyse de la distribution des scores d'IHC. Il n'est pas mentionné qui a procédé à l'interprétation des tests ni si elle a été effectuée sans connaître les résultats des autres tests. Polysomie au CISH si $> 2,25$ signaux par cellule. Conclusions : une hausse du nombre de copies du gène HER-2 se condait à une polysomie 17 peut mener à une surexpression de la protéine HER-2 chez certains cas IHC 2+/3+, sans amplification du gène. CISH est une solution de rechange au FISH. Cependant, les cas où le CISH indique la présence d'un nombre de copies limites ou une faible amplification nécessiteraient une confirmation par FISH pour éliminer la possibilité d'une polysomie 17.

TABLEAU E-1 (SUITE)

Résumé des études incluses dans la présente revue systématique				
ÉTUDE	NOMBRE DE PATIENTES (OU D'ÉCHANTILLONS ANALYSÉS)	MÉTHODOLOGIE	TECHNIQUE ET INTERPRÉTATION	COMMENTAIRES
INQAT, 2005 Italie	17	Dix-sept lames provenant de 17 cas de cancer du sein ont circulé entre les mains de 23 anatomopathologistes indépendants travaillant dans différents laboratoires italiens. Échantillons : tissus FFPE.	IHC : HercepTest™.	Cette étude rapporte les résultats d'un programme de contrôle de la qualité qui a débuté en 2003 pour déterminer la reproductibilité interobservateurs et intra-observateur des résultats d'interprétation du HercepTest™. Les lames ont été sélectionnées et interprétées par quatre évaluateurs (groupe de référence) avant le début de l'étude. La méthode d'échantillonnage n'est pas bien rapportée. Les mêmes lames ont été réinterprétées par les mêmes anatomopathologistes environ quatre mois plus tard sans connaître le premier résultat. Conclusions : la reproductibilité intra-observateur est satisfaisante, alors que la reproductibilité interobservateurs ne l'est pas. Le HercepTest™ ne permet pas de distinguer les scores 2+ et 3+ de façon optimale.
INQAT, 2004 Italie	19	Vingt lames provenant de cas de cancer du sein ont circulé entre les mains de 12 anatomopathologistes. Les 12 laboratoires participants (centres de recherche, départements universitaires ou hôpitaux) devaient avoir au moins un an d'expérience dans la détermination du statut HER-2. Échantillons : tissus fixés dans du formol tamponné.	IHC : non spécifié.	Cette étude rapporte les principaux résultats d'un programme national de contrôle de la qualité lancé en 2001. Elle vise à évaluer la reproductibilité intra-observateur et interobservateurs. Les 20 lames ont été choisies aléatoirement parmi un grand nombre de lames soumises par les différents laboratoires durant les six mois précédant l'étude. Une lame a été endommagée en cours d'étude. Les valeurs de référence pour chacune des lames sont issues d'un consensus de trois experts du comité d'enquête. Les mêmes lames ont été réinterprétées par les mêmes anatomopathologistes six mois plus tard sans connaître le premier résultat. Conclusion : la reproductibilité interobservateurs de l'IHC est satisfaisante, quoique la classification des catégories intermédiaires soit problématique, pour le pourcentage de cellules marquées comme pour l'intensité de la coloration membranaire.

TABLEAU E-1 (SUITE)

Résumé des études incluses dans la présente revue systématique				
ÉTUDE	NOMBRE DE PATIENTES (OU D'ÉCHANTILLONS ANALYSÉS)	MÉTHODOLOGIE	TECHNIQUE ET INTERPRÉTATION	COMMENTAIRES
Isola <i>et al.</i> , 2004 Finlande	192	Cas de cancer du sein sélectionnés; environ la moitié sont nouvellement diagnostiqués et analysés par CISH dans un laboratoire universitaire, l'autre moitié sont des cas préalablement testés par FISH et IHC dans un autre laboratoire. Échantillons : coupes archivées de tissus FFPE.	FISH : PathVysion® avec des modifications mineures au protocole de pré-traitement; amplification si rapport HER/CEP17 ≥ 2 . CISH : sonde marquée à la DIG (Zymed®) + anti-DIG de souris + peroxydase anti-souris polymérisée (Powervision+; Immunovision Inc.) + DAB; sonde CEP17 (Zymed®) a été utilisée pour les cas ayant un résultat limite; amplification si ≥ 6 copies de HER-2 par noyau dans $> 50\%$ des cellules ou présence d'agrégats importants.	Étude visant à faire la comparaison interlaboratoires du CISH avec le FISH. Biais associé à la sélection des cas selon leur résultat initial de CISH ou de FISH (50 % chacun) (amplifié ou non amplifié) mais sans connaître le nombre de copies de HER-2 ou le rapport HER-2/CEP17. Trois personnes ont effectué les tests de FISH, et 50 % des tests ont été interprétés par deux observateurs; deux personnes ont effectué les tests de CISH; tous les CISH ont été interprétés sans connaître le résultat du FISH et vice-versa. La sonde CEP17 a été utilisée en CISH pour sept cas. Sept des 12 résultats CISH/FISH discordants étaient dus à l'absence de sonde CEP17 pour le CISH. Conclusions : le CISH et le FISH sont hautement concordants; le CISH pourrait être une option de rechange pratique au FISH.
Kakar <i>et al.</i> , 2000 États-Unis	117	Série consécutive de patientes atteintes d'un carcinome du sein invasif traitées et suivies pour au moins 50 mois dans un centre universitaire. Échantillons : tissus FFPE archivés; FISH : blocs multi-tumeurs (3-5 mm ³ de tissu par tumeur).	IHC : CB11 (Ventana); démasquage antigénique : immersion dans un tampon citrate (0,1 M, pH 6,4) et chauffage au four à micro-ondes pour 40 min; coloration automatisée des lames; point seuil de 10 % pour le score 2+. FISH : PathVysion®, ≥ 60 cellules analysées; amplification si rapport HER-2/CEP17 ≥ 2 .	Étude visant à comparer les résultats d'IHC et de FISH et la survie des patientes par rapport aux résultats. Les critères d'inclusion et d'exclusion ne sont pas clairement détaillés. L'IHC a été interprétée en aveugle; le nombre d'observateurs n'est pas mentionné. Conclusions : l'IHC est idéale comme test initial; les scores 2+ devraient être testés par FISH.

TABLEAU E-1 (SUITE)

Résumé des études incluses dans la présente revue systématique				
ÉTUDE	NOMBRE DE PATIENTES (OU D'ÉCHANTILLONS ANALYSÉS)	MÉTHODOLOGIE	TECHNIQUE ET INTERPRÉTATION	COMMENTAIRES
Lal <i>et al.</i> , 2005 États-Unis	3 655	Étude rétrospective d'une série consécutive de patientes atteintes d'un cancer du sein invasif non sélectionné (primitif ou métastatique) dont le statut HER-2 a été établi dans un même laboratoire sur une période de 3 ans. Échantillons : tissus FFPE.	IHC : HercepTest™ selon les instructions du manufacturier; point seuil de 10 %. FISH : PathVysion®, ≥ 30 cellules analysées; amplification si rapport HER-2/CEP17 ≥ 2,0.	Étude visant à faire la corrélation entre le statut HER-2 et d'autres caractéristiques des tumeurs primitives ou métastatiques. Aucune information n'est fournie sur les observateurs et sur leur connaissance des résultats cliniques ou des autres tests effectués. Conclusion : la surexpression et l'amplification de HER-2 sont liées essentiellement aux carcinomes canalaux invasifs de grade intermédiaire à élevé.
Loring <i>et al.</i> , 2005 Irlande	110	Série consécutive de tumeurs du sein archivées et évaluées par IHC entre août 2000 et avril 2003 dans un hôpital. Résultats d'IHC effectuée sur coupes histologiques classiques et extraits des dossiers. TMAs construites pour le CISH et le FISH à partir des tumeurs archivées. Échantillons : prélevés par exérèse; tissus FFPE; TMAs : 4 fragments tissulaires de 0,6 mm de diamètre par tumeur.	IHC : HercepTest™; point seuil non précisé. CISH : sonde HER-2 marquée à la DIG + Spot-Light CISH Polymer Detection Kit (Zymed®); sonde CEP17 marquée à la biotine + Spot-Light CISH Centromere Detection Kit (Zymed®); amplification si ≥ 6 copies de HER-2 par noyau ou si des agrégats sont présents dans > 50 % des cellules (correction pour la polysomie 17 chez ceux ayant obtenu de 3 à 10 copies par noyau). FISH : PathVysion®, ≥ 60 cellules analysées dans ≥ 3 fragments; amplification si rapport > 2,0 et aucune amplification si rapport < 2,0.	Étude visant à déterminer si le CISH peut remplacer le FISH pour confirmer l'amplification du gène HER-2. Biais de sélection probable (43,6 % de scores d'IHC 2+/3+) possiblement dû à la référence au test pour le statut HER-2; étude exclue de la distribution des scores d'IHC même si la série de patientes est consécutive. Aucune information n'est disponible au sujet des observateurs ou de leur connaissance des résultats cliniques ou des autres tests effectués. Conclusions : tous les cas IHC 2+ et 3+ devraient être retestés par FISH ou CISH; correction pour la polysomie 17 recommandée pour les cas de faible amplification au CISH.

TABLEAU E-1 (SUITE)

Résumé des études incluses dans la présente revue systématique				
ÉTUDE	NOMBRE DE PATIENTES (OU D'ÉCHANTILLONS ANALYSÉS)	MÉTHODOLOGIE	TECHNIQUE ET INTERPRÉTATION	COMMENTAIRES
Ma <i>et al.</i> , 2005 Belgique et Italie	584	Série de patientes atteintes d'un cancer du sein invasif dépistées pour le statut HER-2 dans une institution et ensuite par FISH dans cette même institution entre avril 2001 et juin 2004. Échantillons : tissus FFPE de tumeurs primitives ou métastatiques.	IHC : CB11 (Novocastra) dilué 1:40; démasquage antigénique : incubation dans un tampon citrate 10 mmol/L, pH 6 pour 30 min dans un bain-marie bouillant; DAB Detection Kit (Ventana); coloration automatisée des lames; point seuil de 10 %. FISH : PathVysion [®] , 60 cellules analysées; amplification si rapport HER-2/CEP17 ≥ 2 mais nombre de copies du gène HER-2 > 4 aussi utilisé comme critère de positivité aux fins de comparaison.	Étude visant à évaluer l'effet du nombre de copies du chromosome 17 sur la détermination du statut HER-2. Le plan de l'étude n'est pas clairement spécifié. La méthode d'échantillonnage ainsi que les critères d'inclusion et d'exclusion sont toutefois bien décrits. Biais de sélection (81,2 % de scores d'IHC 2+/3+) dû en partie à la référence au test pour le statut HER-2; les cas avec un score d'IHC 0/1+ ont été référés pour le FISH uniquement comme témoin ou pour confirmation à la demande d'un clinicien; étude exclue de la distribution des scores d'IHC. Aucune information n'est disponible au sujet des observateurs; il n'est pas mentionné si l'interprétation du FISH a été réalisée à l'insu d'autres résultats. Conclusion : une nette augmentation du nombre de copies par cellule du gène HER-2 due à une polysomie du chromosome 17 en absence d'amplification spécifique du gène peut mener à une forte surexpression chez un petit groupe de carcinomes.
Madrid et Lo, 2004 Philippines	160	Patientes hospitalisées pour un cancer du sein primitif, canalaire invasif et pour lesquelles un test d'IHC a été effectué antérieurement (2000-2001) dans un laboratoire (n = 681). CISH effectué à partir d'échantillons de tissus archivés et pour un échantillon (n = 160) composé à parts égales de cas IHC 0, 1+, 2+ et 3+ (sélection aléatoire pour chacune des catégories). Échantillons : tumeurs primitives; tissus FFPE.	IHC : CB11 (Zymed [®]); démasquage antigénique; point seuil de 10 %. CISH : sonde marquée à la DIG + anti-DIG de mouton marqué à la FITC + anti-FITC de chèvre marquée par une HRP + DAB (Zymed [®]); amplification si ≥ 6 copies de HER-2 par noyau ou si des agrégats sont présents dans > 50 % des cellules.	Étude visant à comparer les résultats de CISH et d'IHC. Biais de sélection volontaire (proportion de cas IHC 2+/3+ = 50,0 %); étude exclue de la distribution des scores d'IHC. Un seul anatomopathologiste a révisé les résultats d'IHC pour tous les cas de la période couverte; le même anatomopathologiste a interprété le CISH sans connaître les résultats d'IHC. Conclusion : les cas IHC 2+ sont indiqués pour un test CISH.

TABLEAU E-1 (SUITE)

Résumé des études incluses dans la présente revue systématique				
ÉTUDE	NOMBRE DE PATIENTES (OU D'ÉCHANTILLONS ANALYSÉS)	MÉTHODOLOGIE	TECHNIQUE ET INTERPRÉTATION	COMMENTAIRES
McCormick <i>et al.</i> , 2002 États-Unis	198	Tumeurs mammaires provenant de plusieurs établissements et soumises pour analyse du statut HER-2 dans un hôpital. Échantillons : prélevés par biopsies au trocart, excisions chirurgicales, mastectomies, métastases et autres; tissus FFPE.	IHC : HercepTest™; protocole et interprétation selon les instructions du manufacturier. FISH : PathVysion® selon les instructions du manufacturier mais avec des modifications mineures; 60 cellules analysées lorsque possible; amplification si rapport HER-2/CEP17 $\geq 2,0$.	Étude visant à comparer l'IHC et le FISH et la concordance interobservateurs de l'IHC. La méthode d'échantillonnage ainsi que les critères d'inclusion et d'exclusion ne sont pas clairement mentionnés. Biais de sélection (43,4 % de scores d'IHC 2+/3+) probablement associé à la référence au test FISH; étude exclue de la distribution des scores d'IHC. Interprétation de l'IHC de façon indépendante par deux spécialistes en pathologie chirurgicale; interprétation du FISH par un 3 ^e observateur; il n'est pas mentionné si le FISH a été interprété en connaissant les résultats d'IHC et vice-versa. Conclusion : les cas ayant obtenu un score d'IHC 2+ devraient être retestés par un test FISH qui inclurait préférentiellement une sonde centromérique.
Merkelbach-Bruse <i>et al.</i> , 2003 Allemagne	50	Échantillons sélectionnés de patientes traitées pour un cancer du sein canalaire en 2001 et en 2002; plusieurs cas avec un score 0 d'IHC ont été exclus de façon à sélectionner une large proportion de cas d'amplification positive. Les échantillons ont été analysés dans un laboratoire universitaire. Échantillons : inclus en paraffine.	PCR : trousse, thermocycleur et logiciel de Roche; amplification positive si rapport HER-2/CEP17 $> 2,0$ et négative si $< 2,0$. IHC : HercepTest™; point seuil de 10 %. FISH : PathVysion® selon les instructions du manufacturier; ≥ 60 cellules analysées; amplification si rapport HER-2/CEP17 ≥ 2 .	Étude visant à comparer l'efficacité de l'IHC, du FISH et du PCR en temps réel comme outils diagnostiques pour la détermination du statut HER-2. Le plan de l'étude, la méthode d'échantillonnage ainsi que les critères d'inclusion et d'exclusion ne sont pas clairement spécifiés; présence d'un biais de sélection toutefois mentionnée. Protocole du PCR modifié : dénaturation à 98 °C au lieu de 95 °C pour les cinq premiers cycles d'amplification. Résultats initiaux de PCR sans microdissection au laser; tests effectués à nouveau après microdissection au laser pour les cas non concordants aux résultats du FISH. Aucune information n'est disponible au sujet des observateurs; il n'est pas mentionné si le FISH a été interprété en connaissant le résultat d'IHC. Conclusion : le FISH et le PCR en temps réel montrent une bonne concordance, alors que l'IHC surestime l'amplification lors d'un résultat équivoque (IHC 2+); la microdissection au laser peut augmenter l'exactitude diagnostique.

TABLEAU E-1 (SUITE)

Résumé des études incluses dans la présente revue systématique				
ÉTUDE	NOMBRE DE PATIENTES (OU D'ÉCHANTILLONS ANALYSÉS)	MÉTHODOLOGIE	TECHNIQUE ET INTERPRÉTATION	COMMENTAIRES
Monego <i>et al.</i> , 2007 Italie	71	Tumeurs primitives du sein provenant d'une série de 456 carcinomes invasifs évalués dans trois établissements; seulement les cas équivoques (2+) à l'IHC sont inclus. Échantillons : tissus fixés au formol tamponné 10 % (pendant une nuit) et inclus en paraffine.	PCR : trousse, Light-Cycler et logiciel de Roche; amplification si rapport HER-2/CEP17 $\geq 2,0$. FISH : pharmDx™, selon les instructions du manufacturier; environ 60 cellules analysées; amplification si rapport HER-2/CEP17 $\geq 2,0$.	Étude visant à évaluer par PCR en temps réel et FISH l'amplification du gène HER-2 chez des cas équivoques à l'IHC. Le plan de l'étude et la méthode d'échantillonnage ne sont pas mentionnés clairement. Les tests d'IHC avaient été effectués à l'aide de l'anticorps A0485 et interprétés simultanément par trois observateurs. Les tests FISH ont été effectués dans différents centres. Aucune information n'est fournie sur les observateurs; il n'est pas mentionné si le FISH a été interprété en connaissant le résultat de PCR. Aucun cas de polysomie 17 n'a été obtenu par FISH. Conclusions : le PCR en temps réel est plus sensible que le FISH pour détecter l'amplification du gène HER-2; le point seuil de positivité recommandé par le fabricant de la trousse de PCR n'est pas efficace pour différencier les cas avec une amplification.
Ogura <i>et al.</i> , 2003 Japon	110	Série consécutive de patientes atteintes d'un cancer du sein canalaire invasif ayant subi une résection chirurgicale entre juin 1999 et mars 2000. Échantillons : tumeurs réséquées, fixées dans la formaline 20 % (pas plus de 48h) et incluses en paraffine.	IHC : HerceptTest™ selon les instructions du manufacturier; coloration automatisée des lames; point seuil de 10 %. FISH : PathVysion® selon les instructions du manufacturier; 60 cellules analysées; amplification si rapport HER-2/CEP17 ≥ 2.	Étude visant à examiner la corrélation entre les résultats du FISH et de l'IHC. Le plan de l'étude n'est pas clairement mentionné. Aucune information n'est fournie sur les observateurs; il n'est pas mentionné si l'interprétation de chaque test s'est faite sans connaître le résultat de l'autre test. Conclusion : les patientes dont les tumeurs ont un score d'IHC 3+ devraient être considérées FISH+, alors que celles qui ont un score d'IHC 2+ devraient être testées par FISH ou retestées par l'IHC avec un anticorps différent.

TABLEAU E-1 (SUITE)

Résumé des études incluses dans la présente revue systématique				
ÉTUDE	NOMBRE DE PATIENTES (OU D'ÉCHANTILLONS ANALYSÉS)	MÉTHODOLOGIE	TECHNIQUE ET INTERPRÉTATION	COMMENTAIRES
Olsen <i>et al.</i> , 2004 Danemark	120	Échantillons provenant de cas de carcinome primitif du sein recueillis entre 1990 et 1993 et archivés dans un hôpital universitaire. Échantillons : tissus FFPE archivés.	IHC : HercepTest™ selon les instructions du manufacturier; coloration des lames automatisée; point seuil de 10 %. FISH : pharmDx™ selon les instructions du manufacturier; 60 cellules analysées; amplification si rapport HER-2/CEP17 ≥ 2 .	Étude visant à évaluer l'IHC comme test de dépistage pour identifier les cas de cancer du sein ayant une amplification du gène HER-2. La méthode d'échantillonnage n'est pas clairement définie. Quelques critères d'inclusion et d'exclusion sont toutefois mentionnés. Proportion de cas IHC 2+/3+ = 40 %; étude exclue de la distribution des scores d'IHC. Il n'est pas mentionné qui a interprété les tests d'IHC et de FISH et si l'interprétation du FISH a été effectuée à l'insu du résultat d'IHC et vice-versa.
Owens <i>et al.</i> , 2004 États-Unis	116 736	Série consécutive de cas de cancer du sein invasif canalaire ou lobulaire ayant subi, entre 1999 et 2002, un test d'IHC et (ou) de FISH, dans deux laboratoires de New York et Los Angeles.	IHC : HercepTest™ selon les instructions du manufacturier; coloration automatisée des lames; point seuil de 10 %. FISH : PathVysion® selon les instructions du manufacturier; 60 cellules analysées; amplification si rapport HER-2/CEP17 $\geq 2,0$.	Étude visant à analyser le niveau d'amplification chez une grande cohorte de cas de cancer du sein ayant subi des tests FISH dans un seul laboratoire, et à comparer ces résultats à ceux d'IHC. Le plan de l'étude n'est pas clairement mentionné. La méthode d'échantillonnage est définie, mais aucun critère d'exclusion n'a été mentionné. Étude exclue de la distribution des scores d'IHC étant donné qu'aucune information n'est fournie sur les raisons pour lesquelles les cas ont été référés dans les laboratoires de référence (analyse initiale, assurance qualité, etc.). Il semble que 17 anatomopathologistes ont procédé à l'interprétation des tests; il n'est pas mentionné si l'interprétation du FISH s'est faite en connaissant le résultat d'IHC et vice-versa.

TABLEAU E-1 (SUITE)

Résumé des études incluses dans la présente revue systématique				
ÉTUDE	NOMBRE DE PATIENTES (OU D'ÉCHANTILLONS ANALYSÉS)	MÉTHODOLOGIE	TECHNIQUE ET INTERPRÉTATION	COMMENTAIRES
Paik <i>et al.</i> , 2002 États-Unis	104	Premières patientes recrutées dans l'étude NSABP Protocole B-31, une étude prospective évaluant le trastuzumab comme thérapie adjuvante.	IHC : laboratoire central : HercepTest™; laboratoires locaux : HercepTest™ (n = 80) ou autre anticorps (n = 24); point seuil = un tiers de cellules marquées.	Étude visant à vérifier si les résultats d'IHC 3+ obtenus dans des laboratoires locaux concordent avec ceux obtenus par un laboratoire de référence et si le volume de tests influence la concordance. La méthode d'échantillonnage et les critères d'inclusion sont bien mentionnés. Conclusions : une proportion appréciable des cas détectés positifs (3+) à l'IHC par des laboratoires locaux ne peuvent être confirmés par un laboratoire central. Il y a moins de discordance entre les résultats du laboratoire central et ceux des laboratoires locaux s'ils effectuent au moins 100 tests par mois.
Papadopoulos <i>et al.</i> , 2007 Grèce	458	Échantillons obtenus de cas de cancer du sein entre 2001 et 2005.	IHC : laboratoire central : HercepTest™ ou CB11, coloration automatisée des lames; laboratoires régionaux : HercepTest™, CB11 ou un anticorps polyclonal non spécifié; point seuil de 10 %. FISH : PathVysion® selon les instructions du manufacturier; 60 cellules analysées; amplification si rapport HER-2/CEP17 ≥ 2 .	Étude visant à évaluer la concordance des résultats d'IHC obtenus par un laboratoire central et des laboratoires régionaux, et à comparer ces résultats d'IHC à ceux de FISH (effectués au laboratoire central). Le plan de l'étude, la méthode d'échantillonnage ainsi que les critères d'inclusion et d'exclusion ne sont pas clairement spécifiés. Laboratoire central effectuant annuellement 350-400 tests d'IHC (10-15 % référés) et 250 tests FISH; 19 laboratoires régionaux effectuant moins de 100 tests d'IHC par an (80 % référés). Le laboratoire central a effectué les tests d'IHC sans connaître les résultats des laboratoires régionaux. Les résultats d'IHC des laboratoires régionaux inclus dans cette étude sont des cas qui ont été référés au laboratoire central pour FISH (tous les scores 2+ et quelques 0/1+ et 3+). Conclusion : le statut HER-2 est généralement plus exact lorsqu'il est déterminé par IHC dans un laboratoire central que dans un laboratoire régional.

TABLEAU E-1 (SUITE)

Résumé des études incluses dans la présente revue systématique				
ÉTUDE	NOMBRE DE PATIENTES (OU D'ÉCHANTILLONS ANALYSÉS)	MÉTHODOLOGIE	TECHNIQUE ET INTERPRÉTATION	COMMENTAIRES
Peiró <i>et al.</i> , 2007b Espagne	162 (159)	Série de patientes atteintes d'un carcinome primitif du sein unilatéral (T1-2N0M0) diagnostiqué et traité entre 1990 et 1999 dans un hôpital et pour lesquelles le suivi complet est disponible. Échantillons : tumeurs primitives; tissus FFPE (archivés pour le CISH).	IHC : NCL-CB11 (Novocastra) dilué 1:80; système de détection streptavidine-biotine (LSAB+, ChemMate Detection kit de Dako-Cytomation); coloration automatisée des lames; point seuil de 10 %. CISH : sonde HER-2 marquée à la DIG (Zymed); Spot-Light CISH Detection kit (Zymed®) selon les instructions du manufacturier; ≥ 200 cellules analysées; ≥ 6 copies de HER-2 par noyau ou si de gros agrégats sont présents dans > 50 % des cellules (faible si 6-10 copies).	Étude visant à évaluer la prévalence et la pertinence pronostique de l'IHC et du CISH ainsi que leur corrélation avec l'expression de Ki67 et p53. Les critères d'inclusion sont assez bien spécifiés, mais il n'est pas clairement mentionné si la série de patientes est consécutive; étude exclue de la distribution des scores d'IHC. Il n'est pas clairement spécifié si ce sont les résultats d'IHC initiaux qui ont été utilisés. Les cas avec des résultats IHC 2+ ou discordants à l'IHC et au CISH ont été analysés par FISH (pharmDx™, n = 40); le FISH a détecté trois cas additionnels d'amplification. Interprétation de l'IHC par au moins deux anatomopathologistes indépendants sans connaître les résultats cliniques ou du CISH. Conclusions : l'IHC peut être utilisée comme test initial, suivi du CISH pour confirmer les cas indéterminés à l'IHC (2+); le FISH devrait être effectué pour résoudre les cas discordants.

TABLEAU E-1 (SUITE)

Résumé des études incluses dans la présente revue systématique				
ÉTUDE	NOMBRE DE PATIENTES (OU D'ÉCHANTILLONS ANALYSÉS)	MÉTHODOLOGIE	TECHNIQUE ET INTERPRÉTATION	COMMENTAIRES
Perez <i>et al.</i> , 2006 États-Unis	2 512	Patientes avec un adénocarcinome primitif du sein opérable, éligibles au NCCTG <i>Intergroup trial</i> N9831, une étude prospective évaluant le trastuzumab comme thérapie adjuvante. Patientes avec un cancer du sein HER-2 positif (IHC 3+ et/ou FISH+), tel que déterminé par un laboratoire local, et pour lesquelles un test de confirmation du statut HER-2 a été effectué dans un laboratoire central (protocole amendé). Échantillons : tumeurs mammaires incluses en paraffine.	IHC : laboratoires locaux : HercepTest™ ou autres anticorps; laboratoire central : HercepTest™ selon les instructions du manufacturier. FISH : laboratoires locaux : PathVysion® ou INFORM® [Roche <i>et al.</i>, 2002]; dans le laboratoire central : PathVysion®; amplification si rapport $\geq 2,0$ ou nombre moyen de copies de HER-2 ≥ 5; deux technologies indépendantes ont analysé 30 cellules chacune (laboratoire central) [Roche <i>et al.</i>, 2002].	L'article présente les résultats de concordance entre des laboratoires locaux et un laboratoire central après l'amendement au protocole (exigeant la confirmation du statut HER-2 positif dans un laboratoire central), et pour les cas discordants, la concordance entre les résultats du laboratoire central et ceux d'un laboratoire de référence. Pour les résultats de concordance du FISH, la trousse PathVysion® peut ne pas avoir été utilisée dans le laboratoire local. Dans ce cas, une amplification était définie par un nombre moyen de copies de HER-2 par cellule ≥ 5 [Roche <i>et al.</i>, 2002]. Conclusions : la concordance est faible entre les résultats des laboratoires locaux <i>versus</i> ceux du laboratoire central pour l'IHC et le FISH mais élevée entre les laboratoires central et de référence (ces derniers ayant utilisé la même technique).
Persons <i>et al.</i> , 2006 États-Unis	10 (139 labos)	Cinq années d'enquête (2000-2004); un total de 10 échantillons de cancer du sein invasif envoyés à un nombre croissant de laboratoires participants (de 35 à 139) pour analyse au FISH. Échantillons : coupes non colorées de tissus fixés et inclus en paraffine; en 2004, TMAs de 5 fragments tissulaires.	FISH : une majorité (94 % en 2004) des laboratoires ont utilisé deux sondes (HER-2 et CEP17); parmi ceux-ci, 68 % ont rapporté avoir utilisé un point seuil de 2,0 (rapport HER-2/CEP17) pour séparer les résultats positifs et négatifs; les valeurs de 1,8 à 2,2 ont défini le plus fréquemment la catégorie équivoque/limite.	Étude visant à évaluer la performance interlaboratoires et intra-laboratoire du FISH; inclut les résultats des cinq premières années (2000 à 2004) du programme d'enquête de la compétence du CAP. Conclusions : la reproductibilité interlaboratoires du FISH est excellente lorsque le nombre de copies de HER-2 par noyau est faible (non amplifié) ou élevé (amplifié). Cependant, l'interprétation peut varier dans les cas de faible amplification ou d'amplification équivoque ou limite.

Résumé des études incluses dans la présente revue systématique				
ÉTUDE	NOMBRE DE PATIENTES (OU D'ÉCHANTILLONS ANALYSÉS)	MÉTHODOLOGIE	TECHNIQUE ET INTERPRÉTATION	COMMENTAIRES
Prati <i>et al.</i> , 2005 États-Unis	198	Échantillons provenant de patientes atteintes d'un cancer du sein invasif analysés dans un laboratoire universitaire en 2003. Échantillons : incluent 176 tumeurs primitives (exérèses locales, mastectomies ou biopsies au trocart), 5 métastases et 18 récurrences locales; tissus FFPE.	IHC : HercepTest™; démasquage antigénique : tissu bouilli dans le tampon citrate (10 mmol/L) fourni dans la trousse; point seuil de 10 %. FISH : PathVysion® selon le <i>CEP Rapid Assay protocol</i> (Vysis); nombre de cellules analysées non précisé; amplification si rapport HER-2/CEP17 $\geq 2,0$.	Étude visant à établir une association entre les résultats du FISH et ceux d'IHC obtenus dans un seul établissement. Le plan de l'étude et la méthode d'échantillonnage ne sont pas clairement spécifiés; étude exclue de la distribution des scores d'IHC. Aucun critère d'exclusion n'est mentionné. Le test d'IHC a été effectué en premier. Il n'est pas mentionné qui, ni combien de personnes ont interprété les deux tests, ni si le FISH l'a été sans connaître le résultat d'IHC. Conclusion : les résultats d'IHC 2+ et 3+ devraient être confirmés par FISH si le trastuzumab est considéré comme traitement.
Press <i>et al.</i> , 2005 États-Unis	842	Femmes atteintes d'un cancer du sein invasif soumises prospectivement à un FISH dans un des deux laboratoires centraux pour déterminer leur admissibilité à l'une de trois études cliniques. Les études BCIRG005 et BCIRF006 incluent des cancers du sein opérables non métastatiques, alors que l'étude BCRG007 inclut des cancers du sein métastatiques non traités. Échantillons soumis aux laboratoires centraux : blocs de tissus inclus en paraffine ou coupes de tissus non colorées.	IHC : HercepTest™. FISH : laboratoires centraux : PathVysion®; ≥ 60 cellules analysées; amplification si rapport HER-2/CEP17 $\geq 2,0$; technique utilisée dans les laboratoires locaux non précisée.	Étude visant à comparer les résultats de tests d'IHC effectués à l'aide du HercepTest™ dans des laboratoires locaux à ceux de tests FISH (PathVysion®) effectués dans deux laboratoires centraux. Le plan de l'étude, la méthode d'échantillonnage ainsi que les critères d'inclusion et d'exclusion sont bien définis. D'autres anticorps ont été utilisés dans les laboratoires locaux (Pathway®, CB11, TAB250, etc.) et centraux (10H8), mais les résultats ne sont pas rapportés dans le présent rapport (résultats incomplets ou non éligibles). Reproductibilité du FISH : intra-laboratoire (ou interobservateurs) : deux laboratoires avec deux observateurs chacun; interlaboratoires : deux laboratoires centraux; interlaboratoires : laboratoires locaux <i>versus</i> deux laboratoires centraux. Conclusion : les résultats de tests FISH effectués en laboratoire local concordent davantage que ceux du HercepTest™ avec les résultats de tests FISH effectués en laboratoire central.

TABLEAU E-1 (SUITE)

Résumé des études incluses dans la présente revue systématique				
ÉTUDE	NOMBRE DE PATIENTES (OU D'ÉCHANTILLONS ANALYSÉS)	MÉTHODOLOGIE	TECHNIQUE ET INTERPRÉTATION	COMMENTAIRES
Reddy <i>et al.</i> , 2006 États-Unis	1 258	Patientes atteintes d'un cancer du sein métastatique dépistées pour le HER-2 entre janvier 2001 et février 2004 afin de déterminer leur admissibilité à une étude de phase IV sur la thérapie trastuzumab/taxane (étude prospective). Le statut HER-2 est d'abord déterminé localement, par IHC et (ou) FISH, et retesté par IHC et FISH dans un laboratoire central ou de référence. Échantillons : échantillons tumoraux.	IHC : laboratoire central : HercepTest™, les anticorps utilisés dans les laboratoires locaux ne sont pas spécifiés. FISH : laboratoire central : PathVysion®, nombre de cellules analysées non précisé; amplification si rapport HER-2/CEP17 $\geq 2,0$.	Étude visant à déterminer la concordance entre : 1) les résultats d'IHC de laboratoires locaux (406 sites aux É.-U.) et ceux d'un laboratoire central; 2) les résultats d'IHC de laboratoires locaux et les résultats de FISH d'un laboratoire central; 3) les résultats d'IHC et de FISH d'un même laboratoire central. La façon dont la sélection des patientes s'est faite dans les centres locaux ainsi que les critères d'inclusion et d'exclusion des échantillons à soumettre au laboratoire central ne sont pas clairement mentionnés. Biais de sélection dû en partie à l'inclusion de patientes avec un stade métastatique seulement résultant en une proportion de scores d'IHC 2+/3+ > 40 %; étude exclue de la distribution des scores d'IHC. Aucune information n'est fournie sur les observateurs et sur leur connaissance des résultats cliniques ou des autres tests effectués. Conclusion : la concordance entre les résultats d'IHC et de FISH est plus grande lorsque les deux tests sont effectués dans un laboratoire central.

TABLEAU E-1 (SUITE)

Résumé des études incluses dans la présente revue systématique				
ÉTUDE	NOMBRE DE PATIENTES (OU D'ÉCHANTILLONS ANALYSÉS)	MÉTHODOLOGIE	TECHNIQUE ET INTERPRÉTATION	COMMENTAIRES
Rhodes <i>et al.</i> , 2002 Angleterre	(371)	Quatre lignées cellulaires de carcinomes du sein (une de score d'IHC 2+ et deux de scores 0 ou 1+) et une de carcinome ovarien (score d'IHC 3+) envoyées aux laboratoires participants du UK NEQAS-ICC pour qu'ils effectuent un test d'IHC selon leur méthode respective. Les laboratoires ont aussi effectué des tests d'IHC sur des tumeurs invasives du sein utilisées comme témoins dans leur établissement respectif. Les résultats d'interprétation et les lames colorées ont été envoyés au UK NEQAS-ICC pour évaluation par 5 observateurs indépendants. Échantillons : lignées cellulaires fixées et incluses en paraffine ou tumeurs du sein (témoins).	IHC : 26 laboratoires : HercepTest™, 41 laboratoires : anticorps A0485 (Dako), CB11 (Novocastra ou Biogenex), 3B5 (Immunotech ou Oncogene Research Products), CBE-1 ou TAB250 (Zymed® Laboratories); point seuil de 10 %.	Étude visant entre autres à évaluer la variabilité des résultats d'interprétation de tests d'IHC effectués selon plusieurs méthodes par différents laboratoires. Les résultats présentés dans ce rapport se limitent à ceux des laboratoires qui ont utilisé le même système de scoring que les cinq évaluateurs indépendants du UK NEQAS-ICC : 67 laboratoires qui ont évalué quatre lignées cellulaires (268 résultats) et 53 laboratoires qui ont évalué 103 tumeurs. Conclusions : l'accord entre les résultats des laboratoires qui ont utilisé le HercepTest™ et ceux des évaluateurs du UK NEQAS-ICC a été excellent pour les lignées cellulaires comme pour les tumeurs. L'accord a été significativement moins grand pour les résultats des laboratoires ayant utilisé une autre méthode que le HercepTest™.

TABLEAU E-1 (SUITE)

Résumé des études incluses dans la présente revue systématique				
ÉTUDE	NOMBRE DE PATIENTES (OU D'ÉCHANTILLONS ANALYSÉS)	MÉTHODOLOGIE	TECHNIQUE ET INTERPRÉTATION	COMMENTAIRES
Ricardo <i>et al.</i> , 2007 Portugal	190 (161)	Échantillons de carcinome du sein invasif sélectionnés dans les archives d'une unité de pathologie; échantillons envoyés par différents établissements pour analyse du statut HER-2. IHC et CISH effectués sur des TMAs construites à partir des blocs de tissus FFPE archivés et de fragments tissulaires de 2 mm.	IHC : CB11 (Novocastria) (1:60) et SP3 (1:80) (Neomarkers); démasquage antigénique dans un tampon citrate (0,01 M pH 6,0) chauffé dans un bain-marie à 98 °C 30 min; système de détection streptavidine-biotine-peroxydase + DAB; point seuil de 10 %. CISH : sonde marquée à la DIG + anti-DIG conjugué à la FITC + anti-FITC conjugué à la HRP + DAB (Zymed®); amplification si > 5 copies de HER-2 ou gros agrégats dans > 50 % des cellules.	Étude visant à évaluer si les résultats d'IHC obtenus avec l'anticorps SP3 concordent avec ceux obtenus avec l'anticorps CB11 et ceux obtenus par CISH. La méthode d'échantillonnage ainsi que les critères d'inclusion et d'exclusion ne sont pas clairement mentionnés; étude exclue de la distribution des scores d'IHC. Chaque lame d'IHC a été évaluée par deux observateurs indépendants; deux observateurs indépendants ont également évalué le CISH dont un des deux précédents; il n'est pas mentionné si l'interprétation du CISH s'est faite en connaissant les résultats de l'IHC et vice-versa. Recherche d'une aneuploïdie du chromosome 17 effectuée pour tous les cas. Conclusions : il y a un accord élevé entre les résultats d'IHC obtenus avec l'anticorps SP3 et ceux obtenus avec l'anticorps CB11; il y a un accord élevé entre les résultats d'IHC obtenus avec l'anticorps SP3 et ceux de CISH; l'anticorps SP3 est fiable pour évaluer l'expression de la protéine HER-2.

TABLEAU E-1 (SUITE)

Résumé des études incluses dans la présente revue systématique				
ÉTUDE	NOMBRE DE PATIENTES (OU D'ÉCHANTILLONS ANALYSÉS)	MÉTHODOLOGIE	TECHNIQUE ET INTERPRÉTATION	COMMENTAIRES
Roche <i>et al.</i> , 2002 États-Unis	119	Premières patientes recrutées dans l'étude N9831, une étude prospective évaluant le trastuzumab comme thérapie adjuvante. Échantillons : tumeurs incluses en paraffine.	IHC : laboratoire central : Hercep-Test™, protocole et interprétation selon les instructions du manufacturier et coloration automatisée des lames; laboratoires locaux : HercepTest™ ou autre méthode (point seuil = un tiers de cellules marquées). FISH : laboratoire central : PathVysion® (amplification si rapport HER-2/CEP17 ≥2,0), 2 fois 30 cellules analysées; laboratoires locaux : PathVysion® (amplification si rapport HER-2/CEP17 ≥2,0) ou INFORM (1 %) (amplification si ≥ 5 copies de HER-2 par noyau).	Étude visant à comparer les résultats d'IHC et de FISH effectués dans un même laboratoire central ainsi que les résultats de plusieurs laboratoires locaux (65) à ceux d'un laboratoire central. Étude prospective (analyse prévue). Méthode d'échantillonnage et critères d'inclusion mentionnés. Biais de sélection : seulement des cas IHC 3+ ou FISH+ sont soumis au laboratoire central; étude exclue de la distribution des scores d'IHC. Interprétation de l'IHC par un seul anatomopathologiste; deux technologues ont compté les signaux du FISH de façon indépendante; il n'est pas mentionné si l'IHC a été interprétée en connaissant le résultat de FISH et vice-versa. Parmi les neuf tumeurs rapportées FISH positives par les laboratoires locaux, seulement six (67 %) ont été interprétées positives par le laboratoire central. Parmi les 119 cas HER-2 positifs recrutés par les laboratoires locaux, 50 % ont été testés par HercepTest™, 42 % par une autre méthode d'IHC, 7 % par PathVysion® et 1 % par INFORM®. Conclusion : l'accord est faible entre les résultats d'IHC et de FISH des laboratoires locaux et ceux du laboratoire central.

TABLEAU E-1. (SUITE)

Résumé des études incluses dans la présente revue systématique				
ÉTUDE	NOMBRE DE PATIENTES (OU D'ÉCHANTILLONS ANALYSÉS)	MÉTHODOLOGIE	TECHNIQUE ET INTERPRÉTATION	COMMENTAIRES
Sáez <i>et al.</i> , 2006 Espagne	200	Sélection rétrospective de carcinomes invasifs du sein diagnostiqués entre 2000 et 2003 dans une institution. Tous les cas IHC 2+/3+ (43/62 cas) initialement diagnostiqués à l'aide de l'anticorps CB11 sont inclus; 95 cas IHC 0/1+ sélectionnés aléatoirement sont aussi inclus. Échantillons archivés réévalués par IHC, FISH et CISH. Échantillons : tissus FFPE; TMAs construites à partir de fragments tissulaires de 6 mm.	IHC : anticorps CB11 (Novocastra) et HercepTest™ selon les instructions du fabricant; interprétation selon le système approuvé par la FDA. FISH : PathVysion® avec une légère modification du protocole; ≥ 60 cellules analysées; amplification si rapport HER-2/CEP17 ≥ 2,0. CISH : sonde marquée à la DIG (Zymed®) + anti-DIG de souris conjugué à la FITC + anti-FITC de mouton conjugué à la HRP + DAB; amplification si ≥ 6 copies de HER-2 ou présence d'agregats dans > 50 % des cellules.	Étude visant à comparer le FISH et le CISH, à évaluer l'exactitude des anticorps CB11 et HercepTest™ à déterminer une surexpression protéique et à mesurer la variabilité interobservateurs du CISH et des techniques d'IHC. Biais dû à la sélection volontaire d'un échantillon composé à près de la moitié de cas IHC négatifs (0/1+); étude exclue de la distribution des scores d'IHC. Interprétation indépendante (IHC et CISH) ou simultanée (FISH) par deux spécialistes en pathologie du sein; interprétation de l'IHC sans connaître les résultats du FISH et du CISH. Recherche d'une aneuploïdie du chromosome 17 non effectuée par CISH; la plupart des cas CISH/FISH discordants (7/9) sont liés à une polysomie 17. Conclusions : le CISH est une technique exacte, reproductible et pratique. Les anticorps CB11 et HercepTest™ sont des méthodes de dépistage hautement sensibles.

TABLEAU E-1 (SUITE)

Résumé des études incluses dans la présente revue systématique				
ÉTUDE	NOMBRE DE PATIENTES (OU D'ÉCHANTILLONS ANALYSÉS)	MÉTHODOLOGIE	TECHNIQUE ET INTERPRÉTATION	COMMENTAIRES
Sampatanukul <i>et al.</i> , 2005 Thaïlande	137	Carcinomes du sein canalaux et invasifs provenant de sept établissements. Échantillons : tumeurs fixées au formol tamponné 10 % (< 48 h).	IHC : CB11 (Biogenex) et A0485 (Dako) dilué 1:500; révélation par Envision (Dako); point seuil de 10 %.	La phase I vise à tester l'accord interobservateurs pour l'interprétation de deux tests d'IHC (deux anticorps différents) effectués dans un seul laboratoire selon un protocole standardisé. Neuf anatomopathologistes indépendants ont interprété les lames sans connaître l'anticorps utilisé. La phase II vise à tester la reproductibilité de l'IHC entre deux laboratoires qui utilisent une même méthode (anticorps CB11). Les mêmes neuf anatomopathologistes ont interprété les résultats de façon indépendante. Ces derniers résultats faisaient simultanément référence à la concordance interobservateurs et interlaboratoires et ont donc été exclus du présent rapport. Les neuf anatomopathologistes pratiquaient dans sept endroits différents et effectuaient de quelques tests à une vingtaine par mois. Le plan de l'étude semble prospectif. La méthode d'échantillonnage ainsi que les critères d'inclusion et d'exclusion ne sont pas mentionnés. Conclusion : dans cette étude à deux phases, la standardisation des tests d'IHC a été atteinte et a permis l'amélioration de l'expertise des anatomopathologistes et la vérification des protocoles utilisés.

TABLEAU E-1 (SUITE)

Résumé des études incluses dans la présente revue systématique				
ÉTUDE	NOMBRE DE PATIENTES (OU D'ÉCHANTILLONS ANALYSÉS)	MÉTHODOLOGIE	TECHNIQUE ET INTERPRÉTATION	COMMENTAIRES
Santinelli <i>et al.</i> , 2002 Italie	108	Cas de carcinome du sein infiltrant retrouvés dans les archives d'un institut de pathologie universitaire. Échantillons : tissus FFPE.	IHC : HercepTest™; point seuil de 10 %.	Étude visant à déterminer la variabilité intra-observateur et interobservateurs de l'IHC effectuée à l'aide de la trousse HercepTest™ et de l'anticorps TAB250. Résultats pour l'anticorps TAB250 exclus du présent rapport en raison des critères d'interprétation du test. Sélection des cas en fonction de leur résultat préalable à un test d'IHC avec l'anticorps TAB250 (43 cas 0 ou 1+ et 65 cas 2+ ou 3+) tel que déterminé par d'autres anatomopathologistes. La méthode d'échantillonnage ainsi que les critères d'inclusion et d'exclusion ne sont pas clairement décrits. Trois anatomopathologistes indépendants ont interprété les mêmes tests d'IHC sans connaître les résultats des autres observateurs. Les trois anatomopathologistes avaient une bonne expérience avec l'interprétation du TAB250. Deux des trois anatomopathologistes s'étaient préalablement entraînés à interpréter le HercepTest™ (10 lames) avant la première ronde de lecture. Les résultats de comparaison entre deux des trois anatomopathologistes incluant celui qui ne s'était pas entraîné pour le HercepTest™ ne sont pas présentés dans l'article. Une relecture des lames (dans le même ordre) a eu lieu 60 jours plus tard pour déterminer la variabilité intra-observateur. Conclusion : il est conseillé que deux anatomopathologistes expérimentés interprètent les tests en aveugle, et que les cas discordants soient discutés par les deux mêmes anatomopathologistes.

TABLEAU E-1 (SUITE)

Résumé des études incluses dans la présente revue systématique				
ÉTUDE	NOMBRE DE PATIENTES (OU D'ÉCHANTILLONS ANALYSÉS)	MÉTHODOLOGIE	TECHNIQUE ET INTERPRÉTATION	COMMENTAIRES
Sapino <i>et al.</i> , 2006 Italie	237	Série consécutive de cas de carcinome du sein : 126 opérés dans un hôpital entre décembre 2004 et octobre 2005 et 111 reçus d'un autre hôpital dans le but de tester des facteurs pronostiques à l'IHC. Construction rétrospective de TMAs; chaque cas a été testé par IHC et par FISH. Échantillons : tumeurs; TMAs construites à partir de fragments tissulaires de 1 mm.	IHC : A0485 (Dako); coloration automatisée des lames; point seuil de 10 % [Ellis <i>et al.</i> , 2004]. FISH : PathVysion [®] ; 40-60 cellules analysées; amplification si rapport HER-2/CEP17 ≥ 2 .	Étude visant à évaluer l'utilité des micromatrices tissulaires pour l'analyse par IHC et FISH, en termes de coût, temps, volume de lames et charge de travail, comparée aux coupes histologiques classiques. Plan de l'étude et méthode d'échantillonnage bien rapportés. Tumeurs de moins d'un centimètre de diamètre exclues; étude exclue de la distribution des scores d'IHC. Aucune information n'est fournie sur les observateurs; il n'est pas mentionné si l'interprétation s'est faite en connaissance d'autres résultats. Conclusions : les résultats ont montré une concordance attendue entre l'IHC et le FISH. Les TMAs pourraient être une approche efficiente pour la routine clinique dans l'étude des facteurs pronostiques du cancer du sein.

TABLEAU E-1 (SUITE)

Résumé des études incluses dans la présente revue systématique				
ÉTUDE	NOMBRE DE PATIENTES (OU D'ÉCHANTILLONS ANALYSÉS)	MÉTHODOLOGIE	TECHNIQUE ET INTERPRÉTATION	COMMENTAIRES
Sapino <i>et al.</i> , 2003 Italie	106	Carcinomes du sein invasifs recueillis dans les fichiers des départements de pathologie des auteurs; de cette série, 106 cas ayant obtenu un résultat de CISH ont été sélectionnés. IHC et CISH effectués à partir du matériel archivé. Échantillons : pièces chirurgicales; tissus FFPE.	IHC : CB11 (Ylem, Rome, Italie), dilué 1:80 et démasquage antigénique : immersion dans un tampon citrate 0,01 mol/L pH 7,3, 15 min à 94 °C; TAB250 (Zymed®), dilution 1:40 et sans démasquage antigénique; Ac secondaire marqué à la biotine + streptavidine-peroxydase; point seuil de 10 %. CISH : sonde marquée à la DIG + anti-DIG fluorescéine + anti-fluorescéine couplé à la peroxydase (Zymed®); utilisation d'une sonde centromérique du chromosome 17 marquée à la biotine si l'amplification est faible (6-10 copies de HER-2 dans > 50 % des cellules ou présence de petits agrégats).	Étude visant à évaluer quels carcinomes du sein bénéficient réellement de l'analyse de l'amplification du gène HER-2. La méthode d'échantillonnage ainsi que les critères d'inclusion et d'exclusion ne sont pas clairement mentionnés; biais de sélection probable (IHC 2+/3+ : 58,5 % avec le CB11 et 26,4 % avec le TAB250); étude exclue de la distribution des scores d'IHC. Interprétation de l'IHC par deux observateurs indépendants et du CISH par deux autres; il n'est pas mentionné si l'interprétation s'est faite sans connaître les résultats d'une des autres techniques. Les auteurs ont également comparé le résultat du CISH au résultat d'IHC obtenu de l'addition des scores individuels obtenus des deux anticorps (score modifié). Conclusion : d'autres études sont nécessaires pour valider l'utilité du score modifié pour sélectionner les cas nécessitant une analyse par ISH.

TABLEAU E-1 (SUITE)

Résumé des études incluses dans la présente revue systématique				
ÉTUDE	NOMBRE DE PATIENTES (OU D'ÉCHANTILLONS ANALYSÉS)	MÉTHODOLOGIE	TECHNIQUE ET INTERPRÉTATION	COMMENTAIRES
Schlemmer <i>et al.</i> , 2004 Danemark	112	Patientes atteintes d'un cancer du sein de stade peu avancé diagnostiquées entre 1990 et mars 1994 et avec un résultat FISH disponible; cohorte provenant de l'étude DBCG (<i>Danish Breast Cancer Cooperative Group</i>). Échantillons : biopsies de tumeurs primitives archivées; ADN extrait de tissus congelés frais à -80 °C (PCR); coupes de tissus FFPE (FISH et IHC).	PCR : trousse, LightCycler et logiciel de Roche, selon les instructions du manufacturier; amplification si rapport ≥ 2. IHC : HercepTest™ selon les instructions du manufacturier; point seuil non précisé. FISH : pharmDx™ selon les instructions du manufacturier; 60 cellules analysées; amplification si rapport ≥ 2.	Étude visant à comparer le PCR en temps réel au FISH et à l'IHC. Aucune information n'est fournie sur les observateurs; il n'est pas mentionné si l'interprétation du FISH et de l'IHC s'est faite en connaissant les résultats d'un des autres tests. La concordance entre l'IHC (3+ vs 0, 1+, 2+) et le FISH est de 93 %. Conclusion : les résultats du PCR en temps réel sont comparables à ceux du FISH et de l'IHC.
Suo <i>et al.</i> , 2004 Norvège	87	Série d'échantillons tumoraux de patientes atteintes d'un cancer du sein primitif et recueillis dans un département de pathologie. Échantillons : tumeurs primitives; tissus FFPE archivés; matrices de tissus construites avec des fragments tissulaires de 0,6 mm.	PCR : trousse, thermocycleur et logiciel de Roche selon les instructions du manufacturier; amplification si rapport HER-2/CEP17 ≥ 2. FISH : pharmDx™ selon les instructions du manufacturier; ≥ 40 cellules analysées; 60 cellules analysées dans 70 % des cas; amplification si rapport HER-2/CEP17 ≥ 2.	Étude visant à comparer la détection de l'amplification de HER-2 par le FISH et le PCR à l'aide de la technologie LightCycler. Le plan de l'étude, la méthode d'échantillonnage ainsi que les critères d'inclusion et d'exclusion ne sont pas mentionnés. Aucune information n'est fournie sur les observateurs; il n'est pas mentionné si l'interprétation du FISH s'est faite en connaissant les résultats cliniques ou ceux des autres tests. Deux tests d'IHC ont été effectués à l'aide du HercepTest™ et l'anticorps CB11; proportion de scores d'IHC 2+/3+ de 34,1 % et de 31,7 % avec le HercepTest™ et le CB11, respectivement. Concordance globale entre les résultats d'IHC obtenus à l'aide du HercepTest™ et de l'anticorps CB11 : 80,5 % (n = 82); les critères d'interprétation différaient toutefois pour les deux anticorps. Conclusion : les résultats du FISH et du PCR en temps réel sont hautement concordants dans la détection des tumeurs principalement IHC 3+, indiquant que le PCR en temps réel avec la technologie LightCycler pourrait remplacer le FISH en clinique.

TABLEAU E-1 (SUITE)

Résumé des études incluses dans la présente revue systématique				
ÉTUDE	NOMBRE DE PATIENTES (OU D'ÉCHANTILLONS ANALYSÉS)	MÉTHODOLOGIE	TECHNIQUE ET INTERPRÉTATION	COMMENTAIRES
Tsuda <i>et al.</i> , 2001a Japon	101	Séries consécutives de femmes atteintes d'un carcinome du sein primitif canalaire ou lobulaire ayant subi une mastectomie ou une résection partielle du sein dans deux hôpitaux entre 1992 et 1993 et entre 1999 et 2000. Échantillons : tumeurs réséquées, fixées dans de la formaline 10 % ou 20 % (pendant 24 à 48h) et incluses en paraffine.	IHC : HercepTest™, point seuil de 10 %. FISH : PathVysion® selon les instructions du manufacturier; ≥ 60 cellules analysées; amplification si rapport HER-2/CEP17 $\geq 2,0$ (élevée si rapport $\geq 3,0$).	Étude visant à étudier la reproductibilité interobservateurs du FISH et la corrélation entre le FISH et l'IHC. Le plan de l'étude n'est pas clairement mentionné; les critères d'inclusion le sont toutefois. Chaque lame de FISH a été interprétée par deux observateurs indépendants, alors que les lames d'IHC ont été interprétées par deux observateurs indépendants par hôpital; les désaccords ont été réglés par relecture (FISH) ou consensus (IHC); il n'est pas mentionné si les interprétations ont été effectuées sans connaître les résultats obtenus avec l'autre technique. La reproductibilité interobservateurs du FISH est calculée par dichotomisation des rapports ($\geq 2,0$ versus $< 2,0$); 1 cas a été jugé douteux par les deux observateurs et classé à part. Conclusion : les cas IHC 2+ et (ou) de faible amplification doivent être interprétés avec prudence puisque souvent discordants.
Tsuda <i>et al.</i> , 2001b Japon	101	Carcinomes du sein primitifs sélectionnés aléatoirement parmi ceux de cas opérés dans un hôpital de Tokyo entre mars 1992 et juillet 1993 et pour lesquels un résultat d'amplification du gène HER-2 était disponible. Échantillons : tissus d'exérèse fixés à la formaline (24-48 h) et inclus en paraffine.	IHC : HercepTest™ selon les instructions du manufacturier; point seuil de 10 %.	Étude visant entre autres à examiner le degré de variation dans l'interprétation du HercepTest™ par trois observateurs. La méthode d'échantillonnage et les critères d'inclusion sont définis. Aucun critère d'exclusion n'est mentionné. Possibilité de biais de sélection associé à la disponibilité d'un résultat d'amplification du gène HER-2 par transfert de Southern mais pas de surreprésentation des cas IHC 2+/3+ (24 %); étude tout de même exclue de la distribution des scores d'IHC (les cas semblent les mêmes que dans l'étude de Tsuda et ses collaborateurs [2001a]). Trois observateurs indépendants ont procédé à l'interprétation de l'IHC; il n'est pas mentionné si le résultat du transfert de Southern était connu des observateurs. Conclusion : pour l'interprétation du HercepTest™, le niveau d'accord entre les trois observateurs était excellent. Les auteurs croient que cette haute concordance est probablement attribuable au fait que les trois observateurs sont impliqués quotidiennement dans l'interprétation de tests d'IHC pour le cancer du sein.

TABLEAU E-1 (SUITE)

Résumé des études incluses dans la présente revue systématique				
ÉTUDE	NOMBRE DE PATIENTES (OU D'ÉCHANTILLONS ANALYSÉS)	MÉTHODOLOGIE	TECHNIQUE ET INTERPRÉTATION	COMMENTAIRES
Van de Vijver <i>et al.</i> , 2007 Étude internationale (Pays-Bas, Australie, Canada, Allemagne, France)	211 (209)	Étude circulaire impliquant 5 laboratoires incluant 40 à 50 cas par laboratoire (total = 211) de cancer du sein pré-évalués avec succès par IHC et FISH; chaque laboratoire a effectué un test d'IHC, un FISH et un CISH sur ses propres échantillons et a transmis des lames non colorées à un autre laboratoire pour un CISH. Échantillons: tumeurs primitives; tissus fixés à la formaline (12-48 h) et inclus en paraffine.	IHC : HercepTest™ selon les instructions du manufacturier (la plupart des laboratoires), TAB250 ou CB11 (protocoles standardisés et validés). FISH : PathVysion®, amplification si rapport HER-2/CEP17 $\geq 2,0$ (faible si rapport de 2,0 à 4,0). CISH : Invitrogen; SPoT-Light CISH Polymer Detection Kit; ≥ 30 cellules (ou ≥ 60 si 5-10 copies de HER-2 dans $> 50\%$ des cellules); amplification si ≥ 6 copies de HER-2 par noyau ou agrégats importants.	Étude visant à étudier les comparaisons suivantes : CISH et FISH (interlaboratoires); IHC et CISH (intra-laboratoire); CISH et FISH pour les IHC 2+ (intra-laboratoire). La méthode d'échantillonnage ainsi que les critères d'inclusion et d'exclusion ne sont pas clairement mentionnés; échantillon de convenance (environ 20 FISH négatifs et 21 FISH positifs par laboratoire, avec une forte proportion de cas de faible amplification [environ 6 chacun]; étude exclue de la distribution des scores d'IHC (76,6 % d'IHC 2+/3+). Le laboratoire qui recevait les échantillons ne connaissaient pas les résultats précédents d'IHC, de FISH et de CISH. La présentation des résultats de CISH selon les catégories < 5 copies, 5 copies, 6 copies et > 6 copies a permis une analyse alternative des données, c'est-à-dire lorsque ≥ 5 copies de HER-2 sont considérées comme une amplification. Les résultats insatisfaisants (pas de signal) au CISH ont été exclus de l'analyse présentée dans le présent rapport. Conclusion : les concordances CISH/FISH interlaboratoires et CISH/IHC intra-laboratoire sont très élevées; le CISH est une méthode alternative au FISH.
Varshney <i>et al.</i> , 2004 États-Unis	687	Série consécutive de cas de cancer du sein invasif orientés vers un centre de Los Angeles entre 2000 et 2002. Échantillons : tissus fixés au formol tamponné 10 % et inclus en paraffine.	IHC : HercepTest™; protocole de rinçage modifié pour certains cas; interprétation selon les instructions du manufacturier. FISH : PathVysion®, 60 cellules analysées; amplification si rapport HER-2/CEP17 ≥ 2 .	Étude visant à comparer les tests d'IHC et de FISH pour le statut HER-2 et à évaluer leur relation avec la polysomie 17. Le plan de l'étude n'est pas clairement spécifié. La méthode d'échantillonnage est mentionnée. Aucun critère d'exclusion n'est mentionné. Interprétation des tests d'IHC par deux anatomopathologistes indépendants sans connaître les résultats de FISH; interprétation des tests FISH par un seul observateur sans connaître les résultats d'IHC. Conclusions : un petit sous-groupe de cas sont IHC 3+/FISH- et seraient dus en bonne partie à une polysomie 17; on devrait faire les deux tests IHC et FISH jusqu'à ce qu'on puisse corrélérer ces cas avec la réponse au trastuzumab.

TABLEAU E-1 (SUITE)

Résumé des études incluses dans la présente revue systématique				
ÉTUDE	NOMBRE DE PATIENTES (OU D'ÉCHANTILLONS ANALYSÉS)	MÉTHODOLOGIE	TECHNIQUE ET INTERPRÉTATION	COMMENTAIRES
Vocaturato <i>et al.</i> , 2006 Italie	111	Série rétrospective de cas de cancer du sein primitif infiltrant diagnostiqué entre 1992 et 2003 dans un institut ou référé pour un test IHC entre 2000 et 2005. Tous les cas IHC 2+/3+ (n = 58) initialement diagnostiqués à l'aide du HercepTest™ sont inclus, alors que 53 cas IHC 0/1+ sont sélectionnés aléatoirement. Les tests CISH, FISH et IHC (CB11) ont été effectués à partir du matériel archivé lorsque non effectués antérieurement. Échantillons : tissus d'exérèse fixés au formol tamponné 10 % (18-24 h).	IHC : HercepTest™ selon les instructions du manufacturier, et CB11 (Novocastra) (pré-traitement de 40 min des coupes dans un tampon citrate (10 mM, pH6) maintenu à 96 °C dans un bain thermostatique; système de révélation de Dako : HRP-LSAB2 + AEC; interprétation selon le système de stockage du HercepTest™. FISH : PathVysion® selon les instructions du manufacturier; 200 cellules analysées en moyenne; amplification si rapport HER-2/CEP17 $\geq 2,0$. CISH : sonde HER-2 marquée à la DIG (Zymed®), anti-DIG de souris + anti-souris de chèvre couplé à la peroxydase (Dako); sonde centromérique du chromosome 17 marquée à la biotine (Zymed®) + anti-biotine de souris (Dako); amplification si ≥ 6 copies de HER-2 par noyau, ou présence d'agrégats dans $> 50\%$ des cellules.	Étude visant à comparer le CISH et le FISH à l'IHC par HercepTest™ et avec l'anticorps CB11. Sélection des cas de façon à obtenir une proportion semblable de cas négatifs et positifs à l'IHC (pour la puissance statistique); étude exclue de l'analyse de la distribution des scores d'IHC. Interprétation de l'IHC par deux observateurs indépendants et interprétation du CISH par deux observateurs sans connaître les résultats des autres tests; aucune information en ce sens pour le FISH. Lorsque les cas négatifs (0/1+) et positifs (2+/3+) sont regroupés, les résultats du HercepTest™ et de l'anticorps CB11 concordent avec un kappa de 0,80 (IC à 95 % : de 0,69 à 0,92). Les discordances ont été réglées par consensus. Les résultats d'accord interobservateurs pour l'IHC sont exclus du présent rapport en raison du regroupement des scores 0 et 1+ ainsi que des scores 2+ et 3+. Sonde centromérique utilisée seulement dans les cas de faible amplification au CISH (6-10 copies, ou petit agrégat, de HER-2 par noyau dans $> 50\%$ des cellules). Les cas discordants CISH/FISH étaient IHC 3+ (HercepTest™) et pourraient être dus à des problèmes préanalytiques (échantillons recueillis entre 1992 et 1998). Conclusion : le CISH devrait être considéré comme une option de rechange au FISH dans les cas IHC 2+ pour la sélection des patientes admissibles au trastuzumab.

TABLEAU E-1 (SUITE)

Résumé des études incluses dans la présente revue systématique				
ÉTUDE	NOMBRE DE PATIENTES (OU D'ÉCHANTILLONS ANALYSÉS)	MÉTHODOLOGIE	TECHNIQUE ET INTERPRÉTATION	COMMENTAIRES
Yaziji <i>et al.</i> , 2004 État-Unis	2 913	Série d'échantillons tumoraux de patientes atteintes d'un cancer du sein reçus dans un laboratoire de référence entre janvier 1999 et mai 2003; tous les échantillons ont été évalués prospectivement par IHC et FISH au laboratoire de référence.	IHC : A0485 (Dako); démasquage antigénique : incubation dans un tampon citrate (0,01 M, pH 6,0) dans un <i>steamer</i>, 40 min à > 95 °C. FISH : réactifs de Vysis Inc. (Downers Grove, IL); ≥ 60 cellules analysées; amplification si rapport HER-2/CEP17 ≥ 2,0.	Étude visant à déterminer la corrélation entre les résultats de FISH et d'IHC obtenus dans le cadre d'un programme d'assurance et de contrôle de la qualité pour le FISH. Biais de sélection (60,0 % de scores d'IHC 2+/3+) dû à la référence au test pour le statut HER-2; une majorité de cas (52,0 %) référés en raison d'un résultat équivoque (2+) à l'IHC; étude exclue de la distribution des scores même si la série de patientes semble consécutive. Six anatomopathologistes ont d'abord interprété l'IHC et le FISH par la suite. Variabilité interobservateurs de l'IHC vérifiée dans 117 cas sélectionnés d'une manière non précisée; 5 anatomopathologistes ont obtenu des résultats concordants dans 50,4 % des cas et 4 d'entre eux dans une proportion additionnelle de 24,7 %. Conclusions : les auteurs suggèrent que les cas IHC 2+ soient testés par FISH; cette approche requiert un programme de contrôle et d'assurance qualité.

Ac : anticorps; ACIS : *automated cellular imaging system*; ADN : acide désoxyribonucléique; AEC : 3-amino-9-ethylcarbazole (substrat chromogène); APP : *Alzheimer's disease amyloid A4 protein*; CISH : hybridation *in situ* chromogénique; DAB : 3,3'-diaminobenzidine; DIG : digoxigénine; DNP : dinitrophénol; FDA : Food and Drug Administration; FFPE : *formalin-fixed and paraffin-embedded* ou fixé à la formaline et inclus en paraffine; FISH : hybridation *in situ* fluorescente; FITC : fluorescéine isothiocyanate; HRP : *horseradish peroxidase* ou peroxydase de raifort; IHC : immunohistochimie; ISH : hybridation *in situ*; NCCTG : North Central Cancer Treatment Group; PCR : réaction en chaîne de la polymérase; SISH : hybridation *in situ* argentique; SWCHSC : Sunnybrook and Women's College Health Sciences Centre; TBP : *TATA box binding protein*; TMAs : micromatrices tissulaires; UK NEQAS-ICC : United Kingdom National External Quality Assessment Scheme for Immunocytochemistry.

RÉFÉRENCES

- Acs G, Wang L, Raghunath PN, Salscheider MA, Zhang PJ. Role of different immunostaining patterns in HercepTest interpretation and criteria for gene amplification as determined by fluorescence in situ hybridization. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2003;11(3):222-9.
- Ainsworth R, Bartlett JM, Going JJ, Mallon EA, Forsyth A, Richmond J, et al. IHC for Her2 with CBE356 antibody is a more accurate predictor of Her2 gene amplification by FISH than HercepTest in breast carcinoma. *J Clin Pathol* 2005;58(10):1086-90.
- American Society of Clinical Oncology (ASCO) et College of American Pathologists (CAP). Guideline Summary: American Society of Clinical Oncology / College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor HER2 testing in breast cancer. *Journal of Oncology Practice* 2007;3(1):48-50.
- Anttinen J, Kuopio T, Nykanen M, Torkkeli H, Saari U, Juhola M. HER-2/neu oncogene amplification and protein over-expression in interval and screen-detected breast cancers. *Anticancer Res* 2003;23(5b):4213-8.
- Bartlett JM, Ibrahim M, Jasani B, Morgan JM, Ellis I, Kay E, et al. External quality assurance of HER2 fluorescence in situ hybridisation testing: Results of a UK NEQAS pilot scheme. *J Clin Pathol* 2007;60(7):816-9.
- Bartlett JM, Going JJ, Mallon EA, Watters AD, Reeves JR, Stanton P, et al. Evaluating HER2 amplification and overexpression in breast cancer. *J Pathol* 2001;195(4):422-8.
- Baselga J, Carbonell X, Castaneda-Soto NJ, Clemens M, Green M, Harvey V, et al. Phase II study of efficacy, safety, and pharmacokinetics of trastuzumab monotherapy administered on a 3-weekly schedule. *J Clin Oncol* 2005;23(10):2162-71.
- Beaucage C, Bonnier Viger Y, D'Amours R. Épidémiologie appliquée : une initiation à la lecture critique de la littérature en sciences de la santé. Montréal, Qc : Gaëtan Morin; 1996.
- 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(2):237-43.
- Bieche I, Onody P, Laurendeau I, Olivi M, Vidaud D, Lidereau R, Vidaud M. Real-time reverse transcription-PCR assay for future management of ERBB2-based clinical applications. *Clin Chem* 1999;45(8 Pt 1):1148-56.
- Bilous M, Morey A, Armes J, Cummings M, Francis G. Chromogenic in situ hybridisation testing for HER2 gene amplification in breast cancer produces highly reproducible results concordant with fluorescence in situ hybridisation and immunohistochemistry. *Pathology* 2006;38(2):120-4.
- Bilous M, Dowsett M, Hanna W, Isola J, Lebeau A, Moreno A, et al. Current perspectives on HER2 testing: A review of national testing guidelines. *Mod Pathol* 2003a;16(2):173-82.
- Bilous M, Ades C, Armes J, Bishop J, Brown R, Cooke B, et al. Predicting the HER2 status of breast cancer from basic histopathology data: An analysis of 1500 breast cancers as part of the HER2000 International Study. *Breast* 2003b;12(2):92-8.
- Birner P, Oberhuber G, Stani J, Reithofer C, Samonigg H, Hausmaninger H, et al. Evaluation of the United States Food and Drug Administration-approved scoring and test system of HER-2 protein expression in breast cancer. *Clin Cancer Res* 2001;7(6):1669-75.
- Blaizel O, Ferland A, Morin J. À la recherche des patientes présentant un cancer HER2/neu positif : analyse rétrospective. *Pharmactuel* 2006;39(5):252-60.
- Bloom K et Harrington D. Enhanced accuracy and reliability of HER-2/neu immunohistochemical scoring using digital microscopy. *Am J Clin Pathol* 2004;121(5):620-30.
- Bloom KJ, Govil H, Gattuso P, Reddy V, Francescatti D. Status of HER-2 in male and female breast carcinoma. *Am J Surg* 2001;182(4):389-92.
- Carlson RW, Moench SJ, Hammond ME, Perez EA, Burstein HJ, Allred DC, et al. HER2 testing in breast cancer: NCCN Task Force report and recommendations. *J Natl Compr Canc Netw* 2006;4 Suppl 3(3):S1-22; quiz S23-4.
- Cayre A, Mishellany F, Lagarde N, Penault-Llorca F. Comparison of different commercial kits for HER2 testing in breast cancer: Looking for the accurate cut-off for amplification. 2007;9(5):R64.

- Cell Markers and Cytogenetics Committees, College of American Pathologists (CAP). Clinical laboratory assays for HER-2/neu amplification and overexpression: Quality assurance, standardization, and proficiency testing. *Arch Pathol Lab Med* 2002;126(7):803-8.
- Chang E, Lee A, Lee E, Lee H, Shin O, Oh S, Kang C. HER-2/neu oncogene amplification by chromogenic in situ hybridization in 130 breast cancers using tissue microarray and clinical follow-up studies. *J Korean Med Sci* 2004;19(3):390-6.
- Ciampa A, Xu B, Ayata G, Baiye D, Wallace J, Wertheimer M, et al. HER-2 status in breast cancer: Correlation of gene amplification by FISH with immunohistochemistry expression using advanced cellular imaging system. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2006;14(2):132-7.
- Comité de l'évolution des pratiques en oncologie (CEPO). Guide d'utilisation du trastuzumab (Herceptin®) dans le traitement adjuvant du cancer du sein. Québec, Qc : Direction de la lutte contre le cancer, MSSS; 2005. Disponible à : http://www.msss.gouv.qc.ca/sujets/prob_sante/cancer/download.php?f=434e075dd18cca0d4ce6f0770da719ec&PHPSESSID=920334f2225b89379c00ab25936e92e4.
- Corzo C, Bellosillo B, Corominas JM, Salido M, Coll MD, Serrano S, et al. Does polysomy of chromosome 17 have a role in ERBB2 and topoisomerase IIalpha expression? Gene, mRNA and protein expression: A comprehensive analysis. *Tumour Biol* 2007;28(4):221-8.
- DakoCytomation Denmark A/S (Dako). HercepTest™, Code K 5204. Pour marquage immunocytochimique. Ce kit est conçu pour 35 tests (70 lames). 6e éd. Glostrup, Danemark : Dako; 2004.
- Dal Lago L, Durbecq V, Desmedt C, Salgado R, Verjat T, Lespagnard L, et al. Correction for chromosome-17 is critical for the determination of true HER-2/neu gene amplification status in breast cancer. *Mol Cancer Ther* 2006;5(10):2572-9.
- Dandachi N, Dietze O, Hauser-Kronberger C. Evaluation of the clinical significance of HER2 amplification by chromogenic in situ hybridisation in patients with primary breast cancer. *Anticancer Res* 2004;24(4):2401-6.
- 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;82(8):1007-14.
- Dendukuri N et Brophy J. Testing for HER2 positive breast cancer: A cost-effectiveness analysis. Montréal, Qc : McGill University Health Centre (MUHC); 2006. Disponible à : <http://www.mcgill.ca/files/tau/HER2reportdraft4finalMay2006.pdf>.
- Dendukuri N, Khetani K, McIsaac M, Brophy J. Testing for HER2-positive breast cancer: A systematic review and cost-effectiveness analysis. *CMAJ* 2007;176(10):1429-34.
- Di Palma S, Collins N, Faulkes C, Ping B, Ferns G, Haagsma B, et al. Chromogenic in situ hybridisation (CISH) should be an accepted method in the routine diagnostic evaluation of HER2 status in breast cancer. *J Clin Pathol* 2007;60(9):1067-8.
- Dietel M, Ellis IO, Hofler H, Kreipe H, Moch H, Dankof A, et al. Comparison of automated silver enhanced in situ hybridisation (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(1):19-25.
- Dolan M et Snover D. Comparison of immunohistochemical and fluorescence in situ hybridization assessment of HER-2 status in routine practice. *Am J Clin Pathol* 2005;123(5):766-70.
- Downs-Kelly E, Pettay J, Hicks D, Skacel M, Yoder B, Rybicki L, et al. Analytical validation and interobserver reproducibility of EnzMet GenePro: A second-generation bright-field metallography assay for concomitant detection of HER2 gene status and protein expression in invasive carcinoma of the breast. *Am J Surg Pathol* 2005;29(11):1505-11.
- Dowsett M, Hanby AM, Laing R, Walker R. HER2 testing in the UK: Consensus from a national consultation. *J Clin Pathol* 2007a;60(6):685-9.
- Dowsett M, Hanna WM, Kockx M, Penault-Llorca F, Ruschoff J, Gutjahr T, et al. Standardization of HER2 testing: Results of an international proficiency-testing ring study. *Mod Pathol* 2007b;20(5):584-91.
- Dowsett M, Bartlett J, Ellis IO, Salter J, Hills M, Mallon E, et al. Correlation between immunohistochemistry (HercepTest) and fluorescence in situ hybridization (FISH) for HER-2 in 426 breast carcinomas from 37 centres. *J Pathol* 2003;199(4):418-23.

- Dybdal N, Leiberman G, Anderson S, McCune B, Bajamonde A, Cohen RL, et al. Determination of HER2 gene amplification by fluorescence in situ hybridization and concordance with the clinical trials immunohistochemical assay in women with metastatic breast cancer evaluated for treatment with trastuzumab. *Breast Cancer Res Treat* 2005;93(1):3-11.
- Edgerton SM, Moore D 2nd, Merkel D, Thor AD. erbB-2 (HER-2) and breast cancer progression. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2003;11(3):214-21.
- Egervari K, Szollosi Z, Nemes Z. Tissue microarray technology in breast cancer HER2 diagnostics. *Pathol Res Pract* 2007;203(3):169-77.
- Elkin EB, Weinstein MC, Winer EP, Kuntz KM, Schnitt SJ, Weeks JC. HER-2 testing and trastuzumab therapy for metastatic breast cancer: A cost-effectiveness analysis. *J Clin Oncol* 2004;22(5):854-63.
- Ellis CM, Dyson MJ, Stephenson TJ, Maltby EL. HER2 amplification status in breast cancer: A comparison between immunohistochemical staining and fluorescence in situ hybridisation using manual and automated quantitative image analysis scoring techniques. *J Clin Pathol* 2005;58(7):710-4.
- Ellis IO, Bartlett J, Dowsett M, Humphreys S, Jasani B, Miller K, et al. Best Practice No 176: Updated recommendations for HER2 testing in the UK. *J Clin Pathol* 2004;57(3):233-7.
- Enzing C, van den Akker-van Marle E, Detmar S, Vullings W, Hedgecoe A, Hopkins M, et al. Case studies and cost-benefit analysis of HER2 and TPMT in four EU member states. Part 2 of an ESTO study on pharmacogenetics and pharmacogenomics: State of the art and social and economic impacts. Technical Report EUR 22214 EN. Luxembourg : Institute for Prospective Technological Studies (IPTS) ; European Commission, Joint Research Centre ; European Science and Technology Observatory (ESTO); 2006. Disponible à : <ftp://ftp.jrc.es/pub/EURdoc/eur22214wp2.pdf>.
- Falo C, Moreno A, Lloveras B, Figueras A, Varela M, Escobedo A. Algorithm for the diagnosis of HER-2/neu status in breast-infiltrating carcinomas. *Am J Clin Oncol* 2003;26(5):465-70.
- Field AS, Chamberlain NL, Tran D, Morey AL. Suggestions for HER-2/neu testing in breast carcinoma, based on a comparison of immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridisation. *Pathology* 2001;33(3):278-82.
- Fitzgibbons PL, Murphy DA, Dorfman DM, Roche PC, Tubbs RR. Interlaboratory comparison of immunohistochemical testing for HER2: Results of the 2004 and 2005 College of American Pathologists HER2 Immunohistochemistry Tissue Microarray Survey. *Arch Pathol Lab Med* 2006;130(10):1440-5.
- Francis GD, Dimech M, Giles L, Hopkins A. Frequency and reliability of oestrogen receptor, progesterone receptor and HER2 in breast carcinoma determined by immunohistochemistry in Australasia: Results of the RCPA Quality Assurance Program. *J Clin Pathol* 2007;60(11):1277-83.
- Fryback DG et Thornbury JR. The efficacy of diagnostic imaging. *Med Decis Making* 1991;11(2):88-94.
- Gancberg D, Jarvinen T, di Leo A, Rouas G, Cardoso F, Paesmans M, et al. Evaluation of HER-2/NEU protein expression in breast cancer by immunohistochemistry: An interlaboratory study assessing the reproducibility of HER-2/NEU testing. *Breast Cancer Res Treat* 2002;74(2):113-20.
- Gancberg D, Lespagnard L, Rouas G, Paesmans M, Piccart M, Di Leo A, et al. Sensitivity of HER-2/neu antibodies in archival tissue samples of invasive breast carcinomas. Correlation with oncogene amplification in 160 cases. *Am J Clin Pathol* 2000;113(5):675-82.
- Ginestier C, Charafe-Jauffret E, Penault-Llorca F, Geneix J, Adelaide J, Chaffanet M, et al. Comparative multi-methodological measurement of ERBB2 status in breast cancer. *J Pathol* 2004;202(3):286-98.
- 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(8):1015-21.
- Günhan O, Kafousi M, Kurt B, Koutsopoulos AV, Karslioglu Y, Stathopoulos E, Celasun B. Comparison of C-erbB2 (HER-2/Neu) immunohistochemistry results on invasive breast carcinomas. Experience of 2 pathology departments in Turkey and Greece. *Anal Quant Cytol Histol* 2004;26(3):151-4.
- Hammock L, Lewis M, Phillips C, Cohen C. Strong HER-2/neu protein overexpression by immunohistochemistry often does not predict oncogene amplification by fluorescence in situ hybridization. *Hum Pathol* 2003;34(10):1043-7.
- Hanna W. Testing for HER2 status. *Oncology* 2001;61(Suppl 2):22-30.

- Hanna W et O'Malley F. Updated recommendations from the HER2/neu consensus meeting – Toronto, Ontario, 7 September 2001. *Curr Oncol* 2002;9(Suppl 1):S18-20.
- Hanna W, O'Malley FP, Barnes P, Berendt R, Gaboury L, Magliocco A, et al. Updated recommendations from the Canadian National Consensus Meeting on HER2/neu testing in breast cancer. *Curr Oncol* 2007a;14(4):149-53.
- Hanna W, O'Malley F, Barnes P, Berendt R, Gaboury L, Magliocco T, et al. Lignes directrices consensuelles canadiennes pour l'évaluation du statut HER2/neu dans le cancer du sein. Brochure de renseignements techniques. Toronto, ON; 2007b.
- Hanna WM et Kwok K. Chromogenic in-situ hybridization: A viable alternative to fluorescence in-situ hybridization in the HER2 testing algorithm. *Mod Pathol* 2006;19(4):481-7.
- Harris LN, Liotcheva V, Broadwater G, Ramirez MJ, Maimonis P, Anderson S, et al. Comparison of methods of measuring HER-2 in metastatic breast cancer patients treated with high-dose chemotherapy. *J Clin Oncol* 2001;19(6):1698-706.
- Hashizume K, Hatanaka Y, Kamihara Y, Kato T, Hata S, Akashi S, et al. Interlaboratory comparison in HercepTest assessment of HER2 protein status in invasive breast carcinoma fixed with various formalin-based fixatives. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2003;11(4):339-44.
- Hauser-Kronberger C et Dandachi N. Comparison of chromogenic in situ hybridization with other methodologies for HER2 status assessment in breast cancer. *J Mol Histol* 2004;35(6):647-53.
- Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative PCR. *Genome research* 1996;6(10):986-94.
- Hicks DG et Tubbs RR. Assessment of the HER2 status in breast cancer by fluorescence in situ hybridization: A technical review with interpretive guidelines. *Hum Pathol* 2005;36(3):250-61.
- Hoang MP, Sahin AA, Ordonez NG, Sneige N. HER-2/neu gene amplification compared with HER-2/neu protein overexpression and interobserver reproducibility in invasive breast carcinoma. *Am J Clin Pathol* 2000;113(6):852-9.
- Hofmann M, Stoss O, Gaiser T, Kneitz H, Heinmoller P, Gutjahr T, et al. Central HER2 IHC and FISH analysis in a trastuzumab (Herceptin(R)) Phase II monotherapy study: Assessment of test sensitivity and impact of chromosome 17 polysomy. *J Clin Pathol* 2007 [Epub ahead of print].
- Hollywood DP et Hurst HC. A novel transcription factor, OB2-1, is required for overexpression of the proto-oncogene c-erbB-2 in mammary tumour lines. *EMBO J* 1993;12(6):2369-75.
- Hyun CL, Lee HE, Kim KS, Kim SW, Kim JH, Choe G, Park SY. The effect of chromosome 17 polysomy on HER-2/neu status in breast cancer. *J Clin Pathol* 2007 [Epub ahead of print].
- Italian Network for Quality Assurance of Tumor Biomarkers (INQAT) Group. Interobserver reproducibility of immunohistochemical HER-2/neu assessment in human breast cancer: An update from INQAT round III. *Int J Biol Markers* 2005;20(3):189-94.
- Italian Network for Quality Assurance of Tumor Biomarkers (INQAT) Group. Interobserver reproducibility of immunohistochemical HER-2/neu evaluation in human breast cancer: The real-world experience. *Int J Biol Markers* 2004;19(2):147-54.
- Isola J, Tanner M, Forsyth A, Cooke TG, Watters AD, Bartlett JM. Interlaboratory comparison of HER-2 oncogene amplification as detected by chromogenic and fluorescence in situ hybridization. *Clin Cancer Res* 2004;10(14):4793-8.
- Jacobs TW, Gown AM, Yaziji H, Barnes MJ, Schnitt SJ. HER-2/neu protein expression in breast cancer evaluated by immunohistochemistry. A study of interlaboratory agreement. *Am J Clin Pathol* 2000;113(2):251-8.
- Jacobs TW, Gown AM, Yaziji H, Barnes MJ, Schnitt SJ. Specificity of HercepTest in determining HER-2/neu status of breast cancers using the United States Food and Drug Administration-approved scoring system. *J Clin Oncol* 1999;17(7):1983-7.
- Kakar S, Puangsuvan N, Stevens JM, Serenas R, Mangan G, Sahai S, Mihalov ML. HER-2/neu assessment in breast cancer by immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization: Comparison of results and correlation with survival. *Mol Diagn* 2000;5(3):199-207.
- Kay E, O'Grady A, Morgan JM, Wozniak S, Jasani B. Use of tissue microarray for interlaboratory validation of HER2 immunocytochemical and FISH testing. *J Clin Pathol* 2004;57(11):1140-4.
- Kaya H, Ragazzini T, Aribal E, Guney I, Kotiloglu E. HER-2/neu gene amplification compared with HER-2/neu protein overexpression on ultrasound guided core-needle biopsy specimens of breast carcinoma. *Pathol Oncol Res* 2001;7(4):279-83.
- Kostopoulou E, Vageli D, Kaisaridou D, Nakou M, Netsika M, Vladica N, et al. Comparative evaluation of non-informative HER-2 immunoreactions (2+) in breast carcinomas with FISH, CISH and QRT-PCR. *Breast* 2007;16(6):615-24.

- Kulka J, Tokes AM, Kaposi-Novak P, Udvarhelyi N, Keller A, Schaff Z. Detection of HER-2/neu gene amplification in breast carcinomas using quantitative real-time PCR – A comparison with immunohistochemical and FISH results. *Pathol Oncol Res* 2006;12(4):197-204.
- Labuhn M, Vuaroqueaux V, Fina F, Schaller A, Nanni-Metellus I, Kung W, et al. Simultaneous quantitative detection of relevant biomarkers in breast cancer by quantitative real-time PCR. *Int J Biol Markers* 2006;21(1):30-9.
- Lacroix-Triki M, Mathoulin-Pelissier S, Ghnassia JP, Macgrogan G, Vincent-Salomon A, Brouste V, et al. High inter-observer agreement in immunohistochemical evaluation of HER-2/neu expression in breast cancer: A multicentre GEPFICS study. *Eur J Cancer* 2006;42(17):2946-53.
- Lal P, Tan LK, Chen B. Correlation of HER-2 status with estrogen and progesterone receptors and histologic features in 3,655 invasive breast carcinomas. *Am J Clin Pathol* 2005;123(4):541-6.
- Lal P, Salazar PA, Hudis CA, Ladanyi M, Chen B. HER-2 testing in breast cancer using immunohistochemical analysis and fluorescence in situ hybridization: A single-institution experience of 2,279 cases and comparison of dual-color and single-color scoring. *Am J Clin Pathol* 2004;121(5):631-6.
- Lal P, Salazar PA, Ladanyi M, Chen B. Impact of polysomy 17 on HER-2/neu immunohistochemistry in breast carcinomas without HER-2/neu gene amplification. *J Mol Diagn* 2003;5(3):155-9.
- Lamy PJ, Nanni I, Fina F, Bibeau F, Romain S, Dussert C, et al. Reliability and discriminant validity of HER2 gene quantification and chromosome 17 aneusomy analysis by real-time PCR in primary breast cancer. *Int J Biol Markers* 2006;21(1):20-9.
- Landis JR et Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* 1977;33(1):159-74.
- Larsimont D, Di Leo A, Rouas G, Paesmans M, Ferreira-Filho F, Bernard C, et al. HER-2/neu evaluation by immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization in breast cancer: Implications for daily laboratory practice. *Anticancer Res* 2002;22(4):2485-90.
- Laudadio J, Quigley DI, Tubbs R, Wolff DJ. HER2 testing: A review of detection methodologies and their clinical performance. *Expert Rev Mol Diagn* 2007;7(1):53-64.
- Lebeau A. HER2 testing in breast cancer: Opportunities and challenges. *Breast Care* 2006;1(2):69-76.
- Lee A, Park WC, Yim HW, Lee MA, Park G, Lee KY. Expression of c-erbB2, cyclin D1 and estrogen receptor and their clinical implications in the invasive ductal carcinoma of the breast. *Jpn J Clin Oncol* 2007;37(9):708-14.
- Lehmann U, Glockner S, Kleeberger W, von Wasielewski HF, Kreipe H. Detection of gene amplification in archival breast cancer specimens by laser-assisted microdissection and quantitative real-time polymerase chain reaction. *Am J Pathol* 2000;156(6):1855-64.
- Leong AS, Formby M, Haffajee Z, Clarke M, Morey A. Refinement of immunohistologic parameters for Her2/neu scoring validation by FISH and CISH. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2006;14(4):384-9.
- Leong TY et Leong AS. Controversies in the assessment of HER-2: More questions than answers. *Adv Anat Pathol* 2006;13(5):263-9.
- Letarte N. L'utilisation du trastuzumab dans le traitement adjuvant du cancer du sein dans 4 CHUs du Québec [présentation du 4 mai 2007]. Centres hospitaliers universitaires du Québec (CHUs), Programme de gestion thérapeutique des médicaments (PGTM); 2007.
- Lidgren M, Jonsson B, Rehnberg C, Willking N, Bergh J. Cost-effectiveness of HER2 testing and 1-year adjuvant trastuzumab therapy for early breast cancer. *Ann Oncol* 2008;19(3):487-95.
- Lopez-Guerrero JA, Navarro S, Noguera R, Almenar S, Pellin A, Vazquez C, Llombart-Bosch A. Histological tumor grade correlates with HER2/c-erbB-2 status in invasive breast cancer: A comparative analysis between immunohistochemical (CB11 clone and Herceptest), FISH and differential PCR procedures. *Arkh Patol* 2003;65(1):50-5.
- Loring P, Cummins R, O'Grady A, Kay EW. HER2 positivity in breast carcinoma: A comparison of chromogenic in situ hybridization with fluorescence in situ hybridization in tissue microarrays, with targeted evaluation of intratumoral heterogeneity by in situ hybridization. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2005;13(2):194-200.
- Lottner C, Schwarz S, Diermeier S, Hartmann A, Kneuchel R, Hofstaedter F, Brockhoff G. Simultaneous detection of HER2/neu gene amplification and protein overexpression in paraffin-embedded breast cancer. *J Pathol* 2005;205(5):577-84.

- Ludwig Boltzmann Institute for Health Technology Assessment (LBI-HTA). Testing for HER2 positive breast cancer: Challenge for improvement of current conditions and practice. Vienne, Autriche : LBI-HTA; 2007. Disponible à : <http://hta.lbg.ac.at/media/pdf/Her2-Assessment.pdf>.
- Ma Y, Lespagnard L, Durbecq V, Paesmans M, Desmedt C, Gomez-Galdon M, et al. Polysomy 17 in HER-2/neu status elaboration in breast cancer: Effect on daily practice. *Clin Cancer Res* 2005;11(12):4393-9.
- Madrid MA et Lo RW. Chromogenic in situ hybridization (CISH): A novel alternative in screening archival breast cancer tissue samples for HER-2/neu status. *Breast Cancer Res* 2004;6(5):R593-600.
- Mass RD, Press M, Anderson S, Murphy M, Slamon D. Improved survival benefit from Herceptin (trastuzumab) in patients selected by fluorescence in situ hybridization (FISH). *Proc Am Soc Clin Oncol* 2001;20:22a [abstract 85].
- McCormick SR, Lillemoe TJ, Beneke J, Schrauth J, Reinartz J. HER2 assessment by immunohistochemical analysis and fluorescence in situ hybridization: Comparison of HercepTest and PathVysion commercial assays. *Am J Clin Pathol* 2002;117(6):935-43.
- Merkelbach-Bruse S, Wardelmann E, Behrens P, Losen I, Buettner R, Friedrichs N. Current diagnostic methods of HER-2/neu detection in breast cancer with special regard to real-time PCR. *Am J Surg Pathol* 2003;27(12):1565-70.
- Ministère de la Santé et des Services sociaux (MSSS). Répertoire québécois et système de mesure des procédures de biologie médicale : édition 2008-2009. Québec, Qc : MSSS; 2008. Disponible à : <http://publications.msss.gouv.qc.ca/acrobat/f/documentation/2007/07-922-03.pdf>.
- Monego G, Arena V, Maggiano N, Costarelli L, Crescenzi A, Zelano G, et al. Borderline HER-2 breast cancer cases: Histochemical versus real-time PCR analysis and impact of different cut-off values. *Scan J Clin Lab Invest* 2007;67(4):402-12.
- Morelle M, Haslé E, Treilleux I, Michot JP, Bachelot T, Penault-Llorca F, Carrère MO. Cost-effectiveness analysis of strategies for HER2 testing of breast cancer patients in France. *Int J Technol Assess Health Care* 2006;22(3):396-401.
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1986;51 Pt 1:263-73.
- Murthy SK, Magliocco AM, Demetrick DJ. Copy number analysis of c-erb-B2 (HER-2/neu) and topoisomerase IIalpha genes in breast carcinoma by quantitative real-time polymerase chain reaction using hybridization probes and fluorescence in situ hybridization. *Arch Pathol Lab Med* 2005;129(1):39-46.
- National Breast Cancer Centre (NBCC). Recommendations for use of trastuzumab (Herceptin®) for the treatment of HER2-positive breast cancer. Camperdown, Australie : NBCC; 2007. Disponible à : http://www.nbcc.org.au/bestpractice/resources/HERG216_recommendationsforus.pdf.
- National Comprehensive Cancer Network (NCCN). Clinical practice guidelines in oncology – v.1.2007: Breast cancer. Fort Washington, PA : NCCN; 2007. Disponible à : http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/PDF/breast.pdf.
- Ni R, Mulligan AM, Have C, O'Malley FP. PGDS, a novel technique combining chromogenic in situ hybridization and immunohistochemistry for the assessment of ErbB2 (HER2/neu) status in breast cancer. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2007;15(3):316-24.
- Nistor A, Watson PH, Pettigrew N, Tabiti K, Dawson A, Myal Y. Real-time PCR complements immunohistochemistry in the determination of HER-2/neu status in breast cancer. *BMC Clin Pathol* 2006;6(1):2.
- Office québécois de la langue française (OQLF). Le grand dictionnaire terminologique. Québec, Qc : OQLF; 2007. Disponible à : http://www.granddictionnaire.com/btml/fra/r_motclef/index1024_1.asp.
- Ogura H, Akiyama F, Kasumi F, Kazui T, Sakamoto G. Evaluation of HER-2 status in breast carcinoma by fluorescence in situ hybridization and immunohistochemistry. *Breast Cancer* 2003;10(3):234-40.
- Olsen KE, Knudsen H, Rasmussen BB, Balslev E, Knoop A, Ejlerlsen B, et al. Amplification of HER2 and TOP2A and deletion of TOP2A genes in breast cancer investigated by new FISH probes. *Acta Oncol* 2004;43(1):35-42.
- O'Malley FP, Thomson T, Julian J, Have C, Crosby R, Gelmon K, et al. HER2 testing in a population-based study of patients with metastatic breast cancer treated with trastuzumab. *Arch Pathol Lab Med* 2008;132(1):61-5.
- O'Malley FP, Parkes R, Latta E, Tjan S, Zadro T, Mueller R, et al. Comparison of HER2/neu status assessed by quantitative polymerase chain reaction and immunohistochemistry. *Am J Clin Pathol* 2001;115(4):504-11.

- Onody P, Bertrand F, Muzeau F, Bieche I, Lidereau R. Fluorescence in situ hybridization and immunohistochemical assays for HER-2/neu status determination: Application to node-negative breast cancer. *Arch Pathol Lab Med* 2001;125(6):746-50.
- Owens MA, Horten BC, Da Silva MM. HER2 amplification ratios by fluorescence in situ hybridization and correlation with immunohistochemistry in a cohort of 6556 breast cancer tissues. *Clin Breast Cancer* 2004;5(1):63-9.
- Paik S, Bryant J, Tan-Chiu E, Romond E, Hiller W, Park K, et al. Real-world performance of HER2 testing—National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project experience. *J Natl Cancer Inst* 2002;94(11):852-4.
- Papadopoulos S, Kouvatseas G, Skarlos D, Malamos N, Delliou E, Saratsiotou I, et al. Comparison of HER2 detection methods between central and regional laboratories in Greece. *Clin Breast Cancer* 2007;7(10):784-90.
- Park K, Kim J, Lim S, Han S, Lee JY. Comparing fluorescence in situ hybridization and chromogenic in situ hybridization methods to determine the HER2/neu status in primary breast carcinoma using tissue microarray. *Mod Pathol* 2003;16(9):937-43.
- Pasleau F, Grootclaes M, Gol-Winkler R. Expression of the c-erbB2 gene in the BT474 human mammary tumor cell line: Measurement of c-erbB2 mRNA half-life. *Oncogene* 1993;8(4):849-54.
- Pauletti G, Dandekar S, Rong H, Ramos L, Peng H, Seshadri R, Slamon DJ. Assessment of methods for tissue-based detection of the HER-2/neu alteration in human breast cancer: A direct comparison of fluorescence in situ hybridization and immunohistochemistry. *J Clin Oncol* 2000;18(21):3651-64.
- Peiró G, Adrover E, Aranda FI, Peiró FM, Niveiro M, Sánchez-Payá J. Prognostic implications of HER-2 status in steroid receptor-positive, lymph node-negative breast carcinoma. *Am J Clin Pathol* 2007a;127(5):780-6.
- Peiró G, Aranda FI, Adrover E, Niveiro M, Alenda C, Payá A, Seguí J. Analysis of HER2 by chromogenic in situ hybridization and immunohistochemistry in lymph node-negative breast carcinoma: Prognostic relevance. *Hum Pathol* 2007b;38(1):26-34.
- Penault-Llorca F. En pratique. Évaluation du statut HER2 en 2005. Neuilly-sur-Seine, France : Roche Pharma; 2005. Disponible à : <http://dargeou.free.fr/12477roche.pdf>.
- Penault-Llorca F et Cayre A. Actualité des tests HER2 dans le cancer du sein. *Bull Cancer* 2004;91(Suppl 4):S211-5.
- Penault-Llorca F, Balaton A, Sabourin JC, Le Doussal V. Évaluation immunohistochimique du statut HER2 dans les carcinomes mammaires infiltrants : mise au point du protocole technique et de la lecture des résultats – recommandations. *Ann Pathol* 2002;22(2):150-7.
- Perez EA, Suman VJ, Davidson NE, Martino S, Kaufman PA, Lingle WL, et al. HER2 testing by local, central, and reference laboratories in specimens from the North Central Cancer Treatment Group N9831 intergroup adjuvant trial. *J Clin Oncol* 2006;24(19):3032-8.
- Persons DL, Tubbs RR, Cooley LD, Dewald GW, Dowling PK, Du E, et al. HER-2 fluorescence in situ hybridization: Results from the survey program of the College of American Pathologists. *Arch Pathol Lab Med* 2006;130(3):325-31.
- Persons DL, Bui MM, Lowery MC, Mark HF, Yung JF, Birkmeier JM, et al. Fluorescence in situ hybridization (FISH) for detection of HER-2/neu amplification in breast cancer: A multicenter portability study. *Ann Clin Lab Sci* 2000;30(1):41-8.
- Powell RD, Pettay JD, Powell WC, Roche PC, Grogan TM, Hainfeld JF, Tubbs RR. Metallographic in situ hybridization. *Hum Pathol* 2007a;38(8):1145-59.
- Powell WC, Hicks DG, Prescott N, Tarr SM, Laniauskas S, Williams T, et al. A new rabbit monoclonal antibody (4B5) for the immunohistochemical (IHC) determination of the HER2 status in breast cancer: Comparison with CB11, fluorescence in situ hybridization (FISH), and interlaboratory reproducibility. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2007b;15(1):94-102.
- Prati R, Apple SK, He J, Gornbein JA, Chang HR. Histopathologic characteristics predicting HER-2/neu amplification in breast cancer. *Breast J* 2005;11(6):433-9.
- Press MF, Sauter G, Bernstein L, Villalobos IE, Mirlacher M, Zhou JY, et al. Diagnostic evaluation of HER-2 as a molecular target: An assessment of accuracy and reproducibility of laboratory testing in large, prospective, randomized clinical trials. *Clin Cancer Res* 2005;11(18):6598-607.
- Programme de gestion thérapeutique des médicaments (PGTM). Prise de position préliminaire. Trastuzumab (Herceptin®) dans le traitement adjuvant du cancer du sein. Centres hospitaliers universitaires du Québec (CHUs); 2005. Disponible à : http://www.pgtm.qc.ca/documentation/FSW/Trastuzumab_SeinAdjuvant_PGTM_20051004.pdf.
- Reddy JC, Reimann JD, Anderson SM, Klein PM. Concordance between central and local laboratory HER2 testing from a community-based clinical study. *Clin Breast Cancer* 2006;7(2):153-7.

- 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(3):408-17.
- Ricardo SA, Milanezi F, Carvalho ST, Leitao DR, Schmitt FC. HER2 evaluation using the novel rabbit monoclonal antibody SP3 and CISH in tissue microarrays of invasive breast carcinomas. *J Clin Pathol* 2007;60(9):1001-5.
- Ridolfi RL, Jamehdor MR, Arber JM. HER-2/neu testing in breast carcinoma: A combined immunohistochemical and fluorescence in situ hybridization approach. *Mod Pathol* 2000;13(8):866-73.
- Roche PC, Suman VJ, Jenkins RB, Davidson NE, Martino S, Kaufman PA, et al. Concordance between local and central laboratory HER2 testing in the breast intergroup trial N9831. *J Natl Cancer Inst* 2002;94(11):855-7.
- Romond EH, Perez EA, Bryant J, Suman VJ, Geyer CE Jr, Davidson NE, et al. Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med* 2005;353(16):1673-84.
- Sáez A, Andreu FJ, Seguí MA, Bare ML, Fernández S, Dinares C, Rey M. HER-2 gene amplification by chromogenic in situ hybridisation (CISH) compared with fluorescence in situ hybridisation (FISH) in breast cancer-A study of two hundred cases. *Breast* 2006;15(4):519-27.
- Salido M, Tusquets I, Corominas JM, Suarez M, Espinet B, Corzo C, et al. Polysomy of chromosome 17 in breast cancer tumors showing an overexpression of ERBB2: A study of 175 cases using fluorescence in situ hybridization and immunohistochemistry. *Breast Cancer Res* 2005;7(2):R267-73.
- Sampatanukul P, Chaiwun B, Wongwaisayawan S, Suwanagool P, Vinyuvat S, Karalak A, et al. A two-phase study model for the standardization of HER2 immunohistochemical assay on invasive ductal carcinoma of the breast. *J Med Assoc Thai* 2005;88(11):1680-8.
- Santinelli A, Baccarini M, Colanzi P, Stramazzotti D, Fabris G. Immunohistochemical evaluation of HER-2/neu expression in infiltrating breast carcinoma: A study of reproducibility. *Anal Quant Cytol Histol* 2002;24(1):54-62.
- Sapino A, Marchio C, Senetta R, Castellano I, Macri L, Cassoni P, et al. Routine assessment of prognostic factors in breast cancer using a multicore tissue microarray procedure. *Virchows Arch* 2006;449(3):288-96.
- Sapino A, Coccorullo Z, Cassoni P, Ghisolfi G, Gugliotta P, Bongiovanni M, et al. Which breast carcinomas need HER-2/neu gene study after immunohistochemical analysis? Results of combined use of antibodies against different c-erbB2 protein domains. *Histopathology* 2003;43(4):354-62.
- Sartelet H, Lagonotte E, Lorenzato M, Duval I, Lechki C, Rigaud C, et al. Comparison of liquid based cytology and histology for the evaluation of HER-2 status using immunostaining and CISH in breast carcinoma. *J Clin Pathol* 2005;58(8):864-71.
- Schlemmer BO, Sorensen BS, Overgaard J, Olsen KE, Gjerdrum LM, Nexø E. Quantitative PCR – New diagnostic tool for quantifying specific mRNA and DNA molecules: HER2/neu DNA quantification with LightCycler real-time PCR in comparison with immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization. *Scand J Clin Lab Invest* 2004;64(5):511-22.
- Simon R, Nocito A, Hubscher T, Bucher C, Torhorst J, Schraml P, et al. Patterns of HER-2/neu amplification and overexpression in primary and metastatic breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2001;93(15):1141-6.
- Śińczak-Kuta A, Tomaszewska R, Rudnicka-Sosin L, Okoń K, Stachura J. Evaluation of HER2/neu gene amplification in patients with invasive breast carcinoma. Comparison of in situ hybridization methods. *Pol J Pathol* 2007;58(1):41-50.
- Slamon D, Eiermann W, Robert N, Pienkowski T, Martin M, Pawlicki M, et al. Phase III randomized trial comparing doxorubicin and cyclophosphamide followed by docetaxel (AC→T) with doxorubicin and cyclophosphamide followed by docetaxel and trastuzumab (AC→TH) with docetaxel, carboplatin and trastuzumab (TCH) in HER2 positive early breast cancer patients: BCIRG 006 study. *Breast Cancer Res Treat* 2005;94(Suppl 1):S5.
- Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: Correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 1987;235(4785):177-82.
- Smith I, Procter M, Gelber RD, Guillaume S, Feyereislova A, Dowsett M, et al. 2-year follow-up of trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer: A randomised controlled trial. *Lancet* 2007;369(9555):29-36.
- Société canadienne du cancer (SCC). Statistiques canadiennes sur le cancer 2007. Faits saillants – cancers du sein, de la prostate, du poumon et colorectal. Montréal, Qc : SCC, division du Québec; 2007. Disponible à : http://www.cancer.ca/vgn/images/portal/cit_86755361/22/21/1835578017QC-FailltsSaillantsCancers-07-FR.pdf.

- Sorscher SM, Elkin EB, Schnitt SJ. HER-2 overexpression in breast tumors lacking gene amplification. *J Clin Oncol* 2004;22(20):4232; author reply 4232-3.
- Suo Z, Daehli KU, Lindboe CF, Borgen E, Bassarova A, Nesland JM. Real-time PCR quantification of c-erbB-2 gene is an alternative for FISH in the clinical management of breast carcinoma patients. *Int J Surg Pathol* 2004;12(4):311-8.
- Tanner M, Jarvinen P, Isola J. Amplification of HER-2/neu and topoisomerase IIalpha in primary and metastatic breast cancer. *Cancer Res* 2001;61(14):5345-8.
- Tanner M, Gancberg D, Di Leo A, Larsimont D, Rouas G, Piccart MJ, Isola J. 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(5):1467-72.
- Tapia C, Glatz K, Novotny H, Lugli A, Horcic M, Seemayer CA, et al. Close association between HER-2 amplification and overexpression in human tumors of non-breast origin. *Mod Pathol* 2007;20(2):192-8.
- Tawfik OW, Kimler BF, Davis M, Donahue JK, Persons DL, Fan F, et al. Comparison of immunohistochemistry by automated cellular imaging system (ACIS) versus fluorescence in situ hybridization in the evaluation of HER-2/neu expression in primary breast carcinoma. *Histopathology* 2006;48(3):258-67.
- Test Review Committee, Quality Management Program – Laboratory Services (QMPLS). Revised quality management requirements for HER2/neu marker in breast cancer. Toronto, ON : Ministry of Health and Long-Term Care, Laboratories Branch; 2006. Disponible à : http://www.ontariopathologists.org/resources/cancer/HER2_Guideline_ON_rev2006-07-10.pdf.
- Thomson TA, Hayes MM, Spinelli JJ, Hilland E, Sawrenko C, Phillips D, et al. HER-2/neu in breast cancer: Interobserver variability and performance of immunohistochemistry with 4 antibodies compared with fluorescent in situ hybridization. *Mod Pathol* 2001;14(11):1079-86.
- Torrise R, Rotmensz N, Bagnardi V, Viale G, Curto BD, Dell'orto P, et al. HER2 status in early breast cancer: Relevance of cell staining patterns, gene amplification and polysomy 17. *Eur J Cancer* 2007;43(16):2339-44.
- Tse C, Brault D, Gligorov J, Antoine M, Neumann R, Lotz JP, Capeau J. Evaluation of the quantitative analytical methods real-time PCR for HER-2 gene quantification and ELISA of serum HER-2 protein and comparison with fluorescence in situ hybridization and immunohistochemistry for determining HER-2 status in breast cancer patients. *Clin Chem* 2005;51(7):1093-101.
- Tsuda H. HER-2 (c-erbB-2) test update: Present status and problems. *Breast Cancer* 2006;13(3):236-48.
- Tsuda H, Sasano H, Akiyama F, Kurosumi M, Hasegawa T, Osamura RY, Sakamoto G. Evaluation of interobserver agreement in scoring immunohistochemical results of HER-2/neu (c-erbB-2) expression detected by HercepTest, Nichirei polyclonal antibody, CB11 and TAB250 in breast carcinoma. *Pathol Int* 2002;52(2):126-34.
- Tsuda H, Akiyama F, Terasaki H, Hasegawa T, Kurosumi M, Shimadzu M, et al. Detection of HER-2/neu (c-erb B-2) DNA amplification in primary breast carcinoma. Interobserver reproducibility and correlation with immunohistochemical HER-2 overexpression. *Cancer* 2001a;92(12):2965-74.
- Tsuda H, Tani Y, Hasegawa T, Fukutomi T. Concordance in judgments among c-erbB-2 (HER2/neu) overexpression detected by two immunohistochemical tests and gene amplification detected by Southern blot hybridization in breast carcinoma. *Pathol Int* 2001b;51(1):26-32.
- Tubbs RR, Hicks DG, Cook J, Downs-Kelly E, Pettay J, Hartke MB, et al. Fluorescence in situ hybridization (FISH) as primary methodology for the assessment of HER2 Status in adenocarcinoma of the breast: A single institution experience. *Diagn Mol Pathol* 2007;16(4):207-10.
- Tubbs RR, Pettay J, Hicks D, Skacel M, Powell R, Grogan T, Hainfeld J. Novel bright field molecular morphology methods for detection of HER2 gene amplification. *J Mol Histol* 2004;35(6):589-94.
- Tubbs RR, Pettay JD, Roche PC, Stoler MH, Jenkins RB, Grogan TM. Discrepancies in clinical laboratory testing of eligibility for trastuzumab therapy: Apparent immunohistochemical false-positives do not get the message. *J Clin Oncol* 2001;19(10):2714-21.
- Tuma RS. Inconsistency of HER2 test raises questions. *J Natl Cancer Inst* 2007;99(14):1064-5.
- Van de Vijver MJ, Bilous M, Hanna W, Hofmann M, Kristel P, Penault-Llorca F, Ruschoff J. Chromogenic in situ hybridisation for the assessment of HER2 status in breast cancer: An international validation ring study. *Breast Cancer Res* 2007;9(5):R68.
- Varshney D, Zhou YY, Geller SA, Alsabeh R. Determination of HER-2 status and chromosome 17 polysomy in breast carcinomas comparing HercepTest and PathVysion FISH assay. *Am J Clin Pathol* 2004;121(1):70-7.
- Vera-Roman JM et Rubio-Martinez LA. Comparative assays for the HER-2/neu oncogene status in breast cancer. *Arch Pathol Lab Med* 2004;128(6):627-33.

- Vinatzer U, Dampier B, Streubel B, Pacher M, Seewald MJ, Stratowa C, et al. Expression of HER2 and the coamplified genes GRB7 and MLN64 in human breast cancer: Quantitative real-time reverse transcription-PCR as a diagnostic alternative to immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization. *Clin Cancer Res* 2005;11(23):8348-57.
- Vincent-Salomon A, MacGrogan G, Couturier J, Arnould L, Denoux Y, Fiche M, et al. Calibration of immunohistochemistry for assessment of HER2 in breast cancer: Results of the French multicentre GEPFICS study. *Histopathology* 2003;42(4):337-47.
- Vocaturro A, Novelli F, Benevolo M, Piperno G, Marandino F, Cianiulli AM, et al. Chromogenic in situ hybridization to detect HER-2/neu gene amplification in histological and ThinPrep-processed breast cancer fine-needle aspirates: A sensitive and practical method in the trastuzumab era. *Oncologist* 2006;11(8):878-86.
- Walker RA, Bartlett J, Dowsett M, Ellis IO, Hanby A, Jasani B, et al. HER2 testing in the UK – further update to recommendations. *J Clin Pathol* 2008 [Epub ahead of print].
- Wang S, Saboorian MH, Frenkel EP, Haley BB, Siddiqui MT, Gokaslan S, et al. Assessment of HER-2/neu status in breast cancer. Automated Cellular Imaging System (ACIS)-assisted quantitation of immunohistochemical assay achieves high accuracy in comparison with fluorescence in situ hybridization assay as the standard. *Am J Clin Pathol* 2001;116(4):495-503.
- Willems A, Gauger K, Henrichs C, Harbeck N. Antibody therapy for breast cancer. *Anticancer Res* 2005;25(3A):1483-9.
- Wixom CR, Albers EA, Weidner N. Her2 amplification: Correlation of chromogenic in situ hybridization with immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2004;12(3):248-51.
- Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN, Hagerty KL, Allred DC, Cote RJ, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *J Clin Oncol* 2007;25(1):118-45.
- Yaziji H et Gown AM. Controversies and guidelines in tissue-based HER-2/neu testing in breast cancer. *MLO Med Lab Obs* 2002;34(6):12-6, 20-1; quiz 22-3.
- Yaziji H, Goldstein LC, Barry TS, Werling R, Hwang H, Ellis GK, et al. HER-2 testing in breast cancer using parallel tissue-based methods. *JAMA* 2004;291(16):1972-7.
- Zamora J, Abaira V, Muriel A, Khan K, Coomarasamy A. Meta-DiSc: A software for meta-analysis of test accuracy data. *BMC Med Res Methodol* 2006;6:31.
- Zhao J, Wu R, Au A, Marquez A, Yu Y, Shi Z. Determination of HER2 gene amplification by chromogenic in situ hybridization (CISH) in archival breast carcinoma. *Mod Pathol* 2002;15(6):657-65.
- Zymed Laboratoires. Kit de détection du HER2 CISH™ Spot-Light® de Zymed (84-0146) (Bon pour 20 lames). San Francisco, CA : Invitrogen Corporation; 2007.
- Zymed Laboratories. Sonde centromérique du chromosome 17 SPoT-Light® (84-0500). San Francisco, CA : Invitrogen Corporation; 2005. Disponible à : <https://www.invitrogen.com/content/sfs/manuals/84-0500.pdf>.

**Agence d'évaluation
des technologies
et des modes
d'intervention en santé**

Québec

