

UNIVERSITÉ TOULOUSE III – PAUL SABATIER
FACULTÉS DE MÉDECINE

ANNÉE 2016

2016 TOU3 1562

THÈSE

POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN MÉDECINE
MÉDECINE SPÉCIALISÉE CLINIQUE

Présentée et soutenue publiquement

par

Camille FRANCHET

le 23 septembre 2016

ANALYSE D'IMAGE AUTOMATISÉE DE L'HYBRIDATION IN SITU
EN FLUORESCENCE POUR L'ÉVALUATION DU STATUT *HER2*
DANS LES CANCERS DU SEIN

Directrice de thèse : Dr Magali LACROIX-TRIKI

JURY

Madame le Professeur Emmanuelle URO-COSTE

Président

Monsieur le Professeur Pierre BROUSSET

Assesseur

Monsieur le Professeur Henri ROCHE

Assesseur

Madame le Docteur Camille LAURENT

Assesseur

Madame le Docteur Magali LACROIX-TRIKI

Suppléant

Monsieur le Docteur Philippe ROCHAIX

Membre invité



TABLEAU du PERSONNEL HU
des Facultés de Médecine de l'Université Paul Sabatier
au 1^{er} septembre 2015

Professeurs Honoraires

Doyen Honoraire	M. ROUGE D.	Professeur Honoraire	M. BARTHE
Doyen Honoraire	M. LAZORTHES Y.	Professeur Honoraire	M. CABARROT
Doyen Honoraire	M. CHAP H.	Professeur Honoraire	M. DUFFAUT
Doyen Honoraire	M. GUIRAUD-CHAUMEIL B.	Professeur Honoraire	M. ESCAT
Doyen Honoraire	M. PUEL P.	Professeur Honoraire	M. ESCANDE
Professeur Honoraire	M. ESCHAPASSE	Professeur Honoraire	M. PRIS
Professeur Honoraire	Mme ENJALBERT	Professeur Honoraire	M. CATHALA
Professeur Honoraire	M. GEDEON	Professeur Honoraire	M. BAZEX
Professeur Honoraire	M. PASQUIE	Professeur Honoraire	M. VIRENQUE
Professeur Honoraire	M. RIBAÛT	Professeur Honoraire	M. CARLES
Professeur Honoraire	M. ARLET J.	Professeur Honoraire	M. BONAFÉ
Professeur Honoraire	M. RIBET	Professeur Honoraire	M. VAYSSE
Professeur Honoraire	M. MONROZIES	Professeur Honoraire	M. ESQUERRE
Professeur Honoraire	M. DALOUS	Professeur Honoraire	M. GUITARD
Professeur Honoraire	M. DUPRE	Professeur Honoraire	M. LAZORTHES F.
Professeur Honoraire	M. FABRE J.	Professeur Honoraire	M. ROQUE-LATRILLE
Professeur Honoraire	M. DUCOS	Professeur Honoraire	M. CERENE
Professeur Honoraire	M. LACOMME	Professeur Honoraire	M. FOURNIAL
Professeur Honoraire	M. COTONAT	Professeur Honoraire	M. HOFF
Professeur Honoraire	M. DAVID	Professeur Honoraire	M. REME
Professeur Honoraire	Mme DIDIER	Professeur Honoraire	M. FAUVEL
Professeur Honoraire	Mme LARENG M.B.	Professeur Honoraire	M. FREXINOS
Professeur Honoraire	M. BES	Professeur Honoraire	M. CARRIERE
Professeur Honoraire	M. BERNADET	Professeur Honoraire	M. MANSAT M.
Professeur Honoraire	M. REGNIER	Professeur Honoraire	M. BARRET
Professeur Honoraire	M. COMBELLES	Professeur Honoraire	M. ROLLAND
Professeur Honoraire	M. REGIS	Professeur Honoraire	M. THOUVENOT
Professeur Honoraire	M. ARBUS	Professeur Honoraire	M. CAHUZAC
Professeur Honoraire	M. PUJOL	Professeur Honoraire	M. DELSOL
Professeur Honoraire	M. ROCHICCIOLI	Professeur Honoraire	M. ABBAL
Professeur Honoraire	M. RUMEAU	Professeur Honoraire	M. DURAND
Professeur Honoraire	M. BESOMBES	Professeur Honoraire	M. DALY-SCHWEITZER
Professeur Honoraire	M. SUC	Professeur Honoraire	M. RAILHAC
Professeur Honoraire	M. VALDIGUIE	Professeur Honoraire	M. POURRAT
Professeur Honoraire	M. BOUNHOURE	Professeur Honoraire	M. QUERLEU D.
Professeur Honoraire	M. CARTON	Professeur Honoraire	M. ARNE JL.
Professeur Honoraire	Mme PUEL J.	Professeur Honoraire	M. ESCOURROU J.
Professeur Honoraire	M. GOUZI	Professeur Honoraire	M. FORTANIER G.
Professeur Honoraire associé	M. DUTAU	Professeur Honoraire	M. LAGARRIGUE J.
Professeur Honoraire	M. PASCAL	Professeur Honoraire	M. PESSEY JJ.
Professeur Honoraire	M. SALVADOR M.	Professeur Honoraire	M. CHAVOIN JP.
Professeur Honoraire	M. BAYARD	Professeur Honoraire	M. GERAUD G.
Professeur Honoraire	M. LEOPHONTE	Professeur Honoraire	M. PLANTE P.
Professeur Honoraire	M. FABIÉ	Professeur Honoraire	M. MAGNAVAL JF.

Professeurs Émérites

Professeur ALBAREDE	Professeur JL. ADER
Professeur CONTÉ	Professeur Y. LAZORTHES
Professeur MURAT	Professeur L. LARENG
Professeur MANELFE	Professeur F. JOFFRE
Professeur LOUVET	Professeur B. BONEU
Professeur SARRAMON	Professeur H. DABERNAT
Professeur CARATERO	Professeur M. BOCCALON
Professeur GUIRAUD-CHAUMEIL	Professeur B. MAZIERES
Professeur COSTAGLIOLA	Professeur E. ARLET-SUAU
	Professeur J. SIMON

FACULTE DE MEDECINE TOULOUSE-PURPAN

37 allées Jules Guesde - 31062 TOULOUSE Cedex

Doyen : JP. VINEL

P.U. - P.H. Classe Exceptionnelle et 1ère classe		P.U. - P.H. 2ème classe	
M. ADOUE Daniel	Médecine Interne, Gériatrie	Mme BEYNE-RAUZY Odile	Médecine Interne
M. AMAR Jacques	Thérapeutique	M. BROUCHET Laurent	Chirurgie thoracique et cardio-vascul
M. ATTAL Michel (C.E)	Hématologie	M. BUREAU Christophe	Hépat-Gastro-Entéro
M. AVET-LOISEAU Hervé	Hématologie, transfusion	M. CALVAS Patrick	Génétique
M. BIRMES Philippe	Psychiatrie	M. CARRERE Nicolas	Chirurgie Générale
M. BLANCHER Antoine	Immunologie (option Biologique)	Mme CASPER Charlotte	Pédiatrie
M. BONNEVILLE Paul	Chirurgie Orthopédique et Traumatologie.	M. CHAIX Yves	Pédiatrie
M. BOSSAVY Jean-Pierre	Chirurgie Vasculaire	Mme CHARPENTIER Sandrine	Thérapeutique, méd. d'urgence, addict
M. BRASSAT David	Neurologie	M. COGNARD Christophe	Neuroradiologie
M. BROUSSET Pierre (C.E)	Anatomie pathologique	M. DE BOISSEZON Xavier	Médecine Physique et Réadapt Fonct.
M. BUGAT Roland (C.E)	Cancérologie	M. FOURNIE Bernard	Rhumatologie
M. CARRIE Didier	Cardiologie	M. FOURNIÉ Pierre	Ophthalmologie
M. CHAP Hugues (C.E)	Biochimie	M. GAME Xavier	Urologie
M. CHAUVEAU Dominique	Néphrologie	M. GEERAERTS Thomas	Anesthésiologie et réanimation
M. CHOLLET François (C.E)	Neurologie	Mme GENESTAL Michèle	Réanimation Médicale
M. CLANET Michel (C.E)	Neurologie	M. LAROCHE Michel	Rhumatologie
M. DAHAN Marcel (C.E)	Chirurgie Thoracique et Cardiaque	M. LAUWERS Frédéric	Anatomie
M. DEGUINE Olivier	Oto-rhino-laryngologie	M. LEOBON Bertrand	Chirurgie Thoracique et Cardiaque
M. DUCOMMUN Bernard	Cancérologie	M. MARX Mathieu	Oto-rhino-laryngologie
M. FERRIERES Jean	Epidémiologie, Santé Publique	M. MAS Emmanuel	Pédiatrie
M. FOURCADE Olivier	Anesthésiologie	M. MAZIERES Julien	Pneumologie
M. FRAYSSE Bernard (C.E)	Oto-rhino-laryngologie	M. OLIVOT Jean-Marc	Neurologie
M. IZOPET Jacques (C.E)	Bactériologie-Virologie	M. PARANT Olivier	Gynécologie Obstétrique
Mme LAMANT Laurence	Anatomie Pathologique	M. PARIENTE Jérémie	Neurologie
M. LANG Thierry	Bio-statistique Informatique Médicale	M. PATHAK Atul	Pharmacologie
M. LANGIN Dominique	Nutrition	M. PAYRASTRE Bernard	Hématologie
M. LAUQUE Dominique (C.E)	Médecine Interne	M. PERON Jean-Marie	Hépat-Gastro-Entérologie
M. LIBLAU Roland (C.E)	Immunologie	M. PORTIER Guillaume	Chirurgie Digestive
M. MALAVAUD Bernard	Urologie	M. RONCALLI Jérôme	Cardiologie
M. MANSAT Pierre	Chirurgie Orthopédique	Mme SAVAGNER Frédérique	Biochimie et biologie moléculaire
M. MARCHOU Bruno	Maladies Infectieuses	Mme SELVES Janick	Anatomie et cytologie pathologiques
M. MOLINIER Laurent	Epidémiologie, Santé Publique	M. SOL Jean-Christophe	Neurochirurgie
M. MONROZIES Xavier	Gynécologie Obstétrique		
M. MONTASTRUC Jean-Louis (C.E)	Pharmacologie		
M. MOSCOVICI Jacques	Anatomie et Chirurgie Pédiatrique		
Mme MOYAL Elisabeth	Cancérologie		
Mme NOURHASHEMI Fatemeh	Gériatrie		
M. OLIVES Jean-Pierre (C.E)	Pédiatrie		
M. OSWALD Eric	Bactériologie-Virologie		
M. PARINAUD Jean	Biol. Du Dévelop. et de la Reprod.		
M. PAUL Carle	Dermatologie		
M. PAYOUX Pierre	Biophysique		
M. PERRET Bertrand (C.E)	Biochimie		
M. PRADERE Bernard (C.E)	Chirurgie générale		
M. RASCOL Olivier	Pharmacologie		
M. RECHER Christian	Hématologie		
M. RISCHMANN Pascal (C.E)	Urologie		
M. RIMERE Daniel (C.E)	Physiologie		
M. SALES DE GAUZY Jérôme	Chirurgie Infantile		
M. SALLES Jean-Pierre	Pédiatrie		
M. SANS Nicolas	Radiologie		
M. SERRE Guy (C.E)	Biologie Cellulaire		
M. TELMON Norbert	Médecine Légale		
M. VINEL Jean-Pierre (C.E)	Hépat-Gastro-Entérologie		
		P.U.	
		M. OUSTRIC Stéphane	Médecine Générale

Professeur Associé de Médecine Générale
Dr. MESTHÉ Pierre

P.U. - P.H.

Classe Exceptionnelle et 1ère classe

P.U. - P.H.

2ème classe

M. ACAR Philippe	Pédiatrie	M. ACCADBLED Franck	Chirurgie Infantile
M. ALRIC Laurent	Médecine Interne	M. ARBUS Christophe	Psychiatrie
Mme ANDRIEU Sandrine	Epidémiologie	M. BERRY Antoine	Parasitologie
M. ARLET Philippe (C.E)	Médecine Interne	M. BONNEVILLE Fabrice	Radiologie
M. ARNAL Jean-François	Physiologie	M. BOUNES Vincent	Médecine d'urgence
Mme BERRY Isabelle (C.E)	Biophysique	Mme BURA-RIVIERE Alessandra	Médecine Vasculaire
M. BOUTAULT Franck (C.E)	Chirurgie Maxillo-Faciale et Stomatologie	M. CHAUFOUR Xavier	Chirurgie Vasculaire
M. BUJAN Louis	Urologie-Andrologie	M. CHAYNES Patrick	Anatomie
M. BUSCAIL Louis	Hépatogastro-Entérologie	M. DAMBRIN Camille	Chirurgie Thoracique et Cardiovasculaire
M. CANTAGREL Alain (C.E)	Rhumatologie	M. DECRAMER Stéphane	Pédiatrie
M. CARON Philippe (C.E)	Endocrinologie	M. DELOBEL Pierre	Maladies Infectieuses
M. CHAMONTIN Bernard (C.E)	Thérapeutique	M. DELORD Jean-Pierre	Cancérologie
M. CHIRON Philippe (C.E)	Chirurgie Orthopédique et Traumatologie	Mme DULY-BOUHANICK Béatrice	Thérapeutique
M. CONSTANTIN Arnaud	Rhumatologie	M. FRANCHITTO Nicolas	Toxicologie
M. COURBON Frédéric	Biophysique	M. GALINIER Philippe	Chirurgie Infantile
Mme COURTADE SAIDI Monique	Histologie Embryologie	M. GARRIDO-STÖWHAS Ignacio	Chirurgie Plastique
M. DELABESSE Eric	Hématologie	Mme GOMEZ-BROUCHET Anne-Muriel	Anatomie Pathologique
Mme DELISLE Marie-Bernadette (C.E)	Anatomie Pathologie	M. HUYGHE Eric	Urologie
M. DIDIER Alain (C.E)	Pneumologie	M. LAFFOSSE Jean-Michel	Chirurgie Orthopédique et Traumatologie
M. ELBAZ Meyer	Cardiologie	M. LEGUEVAQUE Pierre	Chirurgie Générale et Gynécologique
M. GALINIER Michel	Cardiologie	M. MARCHEIX Bertrand	Chirurgie thoracique et cardiovasculaire
M. GLOCK Yves	Chirurgie Cardio-Vasculaire	Mme MAZEREEUW Juliette	Dermatologie
M. GOURDY Pierre	Endocrinologie	M. MEYER Nicolas	Dermatologie
M. GRAND Alain (C.E)	Epidémiologie. Eco. de la Santé et Prévention	M. MINVILLE Vincent	Anesthésiologie Réanimation
M. GROLLEAU RAOUX Jean-Louis	Chirurgie plastique	M. MUSCARI Fabrice	Chirurgie Digestive
Mme GUIMBAUD Rosine	Cancérologie	M. OTAL Philippe	Radiologie
Mme HANAIRE Hélène (C.E)	Endocrinologie	M. ROUX Franck-Emmanuel	Neurochirurgie
M. KAMAR Nassim	Néphrologie	M. SAILLER Laurent	Médecine Interne
M. LARRUE Vincent	Neurologie	M. TACK Ivan	Physiologie
M. LAURENT Guy (C.E)	Hématologie	Mme URO-COSTE Emmanuelle	Anatomie Pathologique
M. LEVADE Thierry (C.E)	Biochimie	M. VERGEZ Sébastien	Oto-rhino-laryngologie
M. MALECAZE François (C.E)	Ophthalmologie		
M. MARQUE Philippe	Médecine Physique et Réadaptation		
Mme MARTY Nicole	Bactériologie Virologie Hygiène		
M. MASSIP Patrice (C.E)	Maladies Infectieuses		
M. RAYNAUD Jean-Philippe (C.E)	Psychiatrie Infantile		
M. RITZ Patrick	Nutrition		
M. ROCHE Henri (C.E)	Cancérologie		
M. ROLLAND Yves	Gériatrie		
M. ROSTAING Lionel (C.E).	Néphrologie		
M. ROUGE Daniel (C.E)	Médecine Légale		
M. ROUSSEAU Hervé (C.E)	Radiologie		
M. SALVAYRE Robert (C.E)	Biochimie		
M. SCHMITT Laurent (C.E)	Psychiatrie		
M. SENARD Jean-Michel	Pharmacologie		
M. SERRANO Elie (C.E)	Oto-rhino-laryngologie		
M. SOULAT Jean-Marc	Médecine du Travail		
M. SOULIE Michel (C.E)	Urologie		
M. SUC Bertrand	Chirurgie Digestive		
Mme TAUBER Marie-Thérèse (C.E)	Pédiatrie		
M. VAYSSIERE Christophe	Gynécologie Obstétrique		
M. VELLAS Bruno (C.E)	Gériatrie		

M.C.U. - P.H.		M.C.U. - P.H.	
M. APOIL Pol Andre	Immunologie	Mme ABRAVANEL Florence	Bactériologie Virologie Hygiène
Mme ARNAUD Catherine	Epidémiologie	M. BES Jean-Claude	Histologie - Embryologie
M. BIETH Eric	Génétique	M. CMBUS Jean-Pierre	Hématologie
Mme BONGARD Vanina	Epidémiologie	Mme CANTERO Anne-Valérie	Biochimie
Mme CASPAR BAUGUIL Sylvie	Nutrition	Mme CARFAGNA Luana	Pédiatrie
Mme CASSAING Sophie	Parasitologie	Mme CASSOL Emmanuelle	Biophysique
Mme CONCINA Dominique	Anesthésie-Réanimation	Mme CAUSSE Elisabeth	Biochimie
M. CONGY Nicolas	Immunologie	M. CHAPUT Benoit	Chirurgie plastique et des brûlés
Mme COURBON Christine	Pharmacologie	M. CHASSAING Nicolas	Génétique
Mme DAMASE Christine	Pharmacologie	Mme CLAVE Danielle	Bactériologie Virologie
Mme de GUSEZENSKY Isabelle	Physiologie	M. CLAVEL Cyril	Biologie Cellulaire
Mme DE MAS Véronique	Hématologie	Mme COLLIN Laetitia	Cytologie
Mme DELMAS Catherine	Bactériologie Virologie Hygiène	M. CORRE Jill	Hématologie
M. DUBOIS Damien	Bactériologie Virologie Hygiène	M. DEDOUIT Fabrice	Médecine Légale
Mme DUGUET Anne-Marie	Médecine Légale	M. DELPLA Pierre-André	Médecine Légale
M. DUPUI Philippe	Physiologie	M. DESPAS Fabien	Pharmacologie
M. FAGUER Stanislas	Néphrologie	M. EDOUARD Thomas	Pédiatrie
Mme FILLAUX Judith	Parasitologie	Mme ESQUIROL Yolande	Médecine du travail
M. GANTET Pierre	Biophysique	Mme EVRARD Solène	Histologie, embryologie et cytologie
Mme GENNERO Isabelle	Biochimie	Mme GALINIER Anne	Nutrition
Mme GENOUX Annelise	Biochimie et biologie moléculaire	Mme GARDETTE Virginie	Epidémiologie
M. HAMDJ Safouane	Biochimie	M. GASQ David	Physiologie
Mme HITZEL Anne	Biophysique	Mme GRARE Marion	Bactériologie Virologie Hygiène
M. IRIART Xavier	Parasitologie et mycologie	Mme GUILBEAU-FRUGIER Céline	Anatomie Pathologique
M. JALBERT Florian	Stomatologie et Maxillo-Faciale	Mme GUYONNET Sophie	Nutrition
Mme JONCA Nathalie	Biologie cellulaire	M. HERIN Fabrice	Médecine et santé au travail
M. KIRZIN Sylvain	Chirurgie générale	Mme INGUENEAU Cécile	Biochimie
Mme LAPEYRE-MESTRE Maryse	Pharmacologie	M. LAHARRAGUE Patrick	Hématologie
M. LAURENT Camille	Anatomie Pathologique	M. LAIREZ Olivier	Biophysique et médecine nucléaire
Mme LE TINNIER Anne	Médecine du Travail	Mme LAPRIE Anne	Cancérologie
M. LHERMUSIER Thibault	Cardiologie	M. LEANDRI Roger	Biologie du dével. et de la reproduction
M. LOPEZ Raphael	Anatomie	Mme LEOBON Céline	Cytologie et histologie
Mme MONTASTIER Emilie	Nutrition	M. LEPAGE Benoit	Bio-statistique
M. MONTROYA Richard	Physiologie	Mme MAUPAS Françoise	Biochimie
Mme MOREAU Marion	Physiologie	M. MIEUSSET Roger	Biologie du dével. et de la reproduction
Mme NOGUEIRA M.L.	Biologie Cellulaire	Mme NASR Nathalie	Neurologie
M. PILLARD Fabien	Physiologie	Mme PERIQUET Brigitte	Nutrition
Mme PRERE Marie-Françoise	Bactériologie Virologie	Mme PRADDAUDE Françoise	Physiologie
Mme PUISSANT Bénédicte	Immunologie	M. RIMAILHO Jacques	Anatomie et Chirurgie Générale
Mme RAGAB Janie	Biochimie	M. RONGIERES Michel	Anatomie - Chirurgie orthopédique
Mme RAYMOND Stéphanie	Bactériologie Virologie Hygiène	Mme SOMMET Agnès	Pharmacologie
Mme SABOURDY Frédérique	Biochimie	M. TKACZUK Jean	Immunologie
Mme SAUNE Karine	Bactériologie Virologie	Mme VALLET Marion	Physiologie
M. SILVA SIFONTES Stein	Réanimation	Mme VEZZOSI Delphine	Endocrinologie
M. SOLER Vincent	Ophthalmologie		
M. TAFANI Jean-André	Biophysique		
M. TREINER Emmanuel	Immunologie		
Mme TREMOLLIERES Florence	Biologie du développement	M. BISMUTH Serge	M.C.U. Médecine Générale
M. TRICOIRE Jean-Louis	Anatomie et Chirurgie Orthopédique	Mme ROUGE-BUGAT Marie-Eve	Médecine Générale
M. VINCENT Christian	Biologie Cellulaire	Mme ESCOURROU Brigitte	Médecine Générale

Maîtres de Conférences Associés de Médecine Générale

Dr BRILLAC Thierry
 Dr ABITTEBOUL Yves
 Dr CHICOULAA Bruno
 Dr IRI-DELAHAYE Motoko

Dr BISMUTH Michel
 Dr BOYER Pierre
 Dr ANE Serge

A notre Maître et Présidente du jury,

Madame le Professeur Emmanuelle URO-COSTE

Professeur des Universités – Praticien Hospitalier

Anatomie Pathologique et Histologie-Cytologie

Tu nous fais l'honneur et le plaisir de présider ce jury de thèse.

Nous avons eu la chance de bénéficier de tes enseignements et de ta bienveillance tout au long de notre internat. Nous te témoignons toute notre gratitude et notre profond respect. Nous te remercions de nous permettre de continuer notre formation et notre carrière en ton agréable compagnie.

Aux membres du jury,

Monsieur le Professeur Pierre BROUSSET

Professeur des Universités – Praticien Hospitalier

Anatomie Pathologique et Histologie-Cytologie

Vous nous faites l'honneur de siéger à ce jury et nous vous sommes très reconnaissant de juger notre travail. Votre enthousiasme et votre soutien ont été d'une grande aide tout au long de notre formation. Nous admirons votre rigueur scientifique et votre éclectisme culturel. Vous nous faites l'honneur de nous accueillir dans votre service incessamment et nous espérons nous montrer digne de la confiance que vous nous accordez.

Je vous prie d'agréer l'expression de notre profond respect et de notre sincère reconnaissance.

Aux membres du jury,

Monsieur le Professeur Henri ROCHE

Professeur des Universités – Praticien spécialiste de Centre de Lutte Contre le Cancer
Oncologie médicale

Vous nous faites l'honneur de siéger à ce jury et nous vous sommes très reconnaissant de juger notre travail. Nous n'avons pas eu l'honneur de travailler à vos côtés, au contact des patients, mais nous connaissons et admirons vos qualités professionnelles. A nos yeux, vous êtes un modèle d'humilité et de rigueur. Soyez assuré de notre plus grand respect.

Aux membres du jury,

Madame le Docteur Camille LAURENT

Maître de Conférences des Universités - Praticien Hospitalier

Anatomie Pathologique et Histologie-Cytologie

Tu me fais l'honneur de siéger à mon jury de thèse.

Ta façon de mêler à merveille l'hématopathologie, la recherche et la vie de famille en bondissant de succès en succès force le respect. Tu fus une responsable de Master 2 confiante et disponible.

Grâce à toi, mon entrée dans le monde de la recherche restera une belle et douce expérience.

Je te remercie de m'avoir associé à tes récents travaux de recherche.

Je suis ravi de pouvoir travailler à tes côtés.

Aux membres du jury,

Monsieur le Docteur Philippe ROCHAIX

Praticien spécialiste de Centre de Lutte Contre le Cancer
Anatomie Pathologique et Histologie-Cytologie

Tu me fais l'honneur de siéger à mon jury de thèse.

J'ai trouvé en toi, savant fou génial et sportif invétéré, un père spirituel à la hauteur de mes attentes. Avec toi, la pathologie est un jeu où l'on croise des fusées sur les lames et des croûtons à la macro. A tes côtés, je ne me sens pas à l'abri de changer le monde ou, du moins, d'en discuter autour d'un café.

Je te remercie pour la confiance que tu me portes.

Tu as toute mon admiration et ma reconnaissance.

Je suis impatient de rejoindre officiellement l'équipe et de travailler à tes côtés.

A ma directrice de thèse,

Madame le Docteur Magali LACROIX-TRIKI

Praticien spécialiste de Centre de Lutte Contre le Cancer

Anatomie Pathologique et Histologie-Cytologie

Tu m'as fait l'honneur de me proposer ce travail de thèse et de le diriger. Je t'en remercie sincèrement et espère être digne de la confiance dont tu m'honores. Ce travail associant la pathologie mammaire, l'imagerie et l'informatique était taillé à ma mesure.

Tu m'as pris sous ton aile à l'Institut Claudius Regaud et nous avons commencé à travailler ensemble. Tu m'as appris la pathologie mammaire dans la joie et la bonne humeur et tu m'as permis de publier mon premier article. Tu as pensé à moi le jour où tu as décidé de migrer à l'Institut Gustave Roussy. Pour toutes ces raisons, je te suis éternellement reconnaissant et souhaite que nous puissions collaborer de nombreuses années.

Encore une fois, je te remercie pour ta confiance et ta bienveillance. Souvent, je lève les yeux au mur et lis : « Life is a beautiful sport ».

Pour leur aide précieuse au cours de ce travail, je remercie :

François-Xavier, ton savoir encyclopédique sur les scanners de lames, tes compétences et ta rigueur m'ont été d'un grand secours. C'est toi qui as déniché les fichiers XML cachés et tu mérites un hommage ! Tu mènes ta barque avec une main de velours dans un gant de fer. Il y a quelque chose de mystérieux en toi. Tu es à l'image de la plateforme. On frissonne un peu avant d'entrer dans la salle sombre et glaciale des scanners, mais une fois la porte poussée et un peu d'intérêt porté, alors tout s'éclaire et se réchauffe, et l'on se sent bien !

Evelyne et Gabrielle, merci beaucoup pour toutes ces manip de FISH. Si ce travail a abouti, c'est amplement grâce à vous. Votre empire s'étend puisqu'il atteint maintenant la salle des scanners, pour le plus grand bonheur de tous. Nous allons maintenant continuer le job avec les CEP2 et CEP15.

Stéphanie, tu as fait mes extractions d'ADN à une période où le staff de bio mol n'avait pas une minute à perdre. Je t'en remercie beaucoup.

Cathy, merci pour ton accueil et ta journée et demi sacrifiée pour ma manip de qPCR. Tu as été très patiente et aidante. C'était un plaisir !

Laurence, merci pour ton aide précieuse et ton éternelle bonne humeur. Tu as fait mes blocs techniques et également un TMA technique qui n'apparaît même pas dans cette thèse (je n'ai pas eu le temps de jouer avec les épaisseurs de coupes).

Enfin, je remercie la société Dako qui a gracieusement fourni les kits et les sondes de FISH pour ce travail. Merci Moncef pour ta gentillesse et ton œil pétillant. Tu es le Edwy Plenel de la société !

Je remercie mes collègues du service d'anapath de l'IUC :

En premier lieu, les **sénopathologistes**, Raphaëlle, Eliane, Véro, Philippe et Sophie (et Claire et Max aussi, mais attendez votre tour !), qui m'avez libéré de la routine à la fin du mois d'août pour que je puisse rendre ce travail dans les délais. Et parce qu'il n'y a pas que la thèse, je vous remercie également pour votre soutien et votre confiance au quotidien.

Bien sûr une spéciale dédicace à Eliane qui part loin loin loin, au pays de la poudre à canon et du petit livre rouge. Prends tout ce qu'il y a de bon dans cette expérience et reviens-nous plus débridée que jamais !

Je remercie bien sûr **l'ensemble des médecins du premier ET du deuxième étage**, pour la qualité de votre enseignement et pour les bons moments passés ensemble, qui ne seront pas les derniers puisque j'ai décidé de rester ! Une pensée émue pour Cathy dont le souvenir nous stimule tous les jours.

A mes chefs passés :

Virginie et Florence. Vous êtes des merveilles de gentillesse.

Flo c'est un plaisir de travailler avec toi.

Emilie, quelle pêche ! Ton entrain est communicatif. Tu es une ogresse de travail (et de chocolat noir). Je t'admire énormément. Je suis content de continuer à travailler en ta joyeuse compagnie.

Fabrice, ton niveau est impressionnant. En anapath bien sûr ! En escalade, c'est un peu différent. Quand est-ce qu'on grimpe ?

Caroline, je t'ai vraiment découverte à Marseille. En quelques semaines, tu étais transformée. J'étais très content d'assister à cette métamorphose. Je te souhaite plein de bonheur au soleil.

Et enfin un grand merci à tous ceux que j'ai connus internes ou qui le sont encore (la liste est longue) :

Mes copains de la promo 2010 :

Max, je crois que l'on s'est bien trouvés ici à Toulouse, nous, les deux gars de là-haut. Je ne

saurais dire combien de fois tu as oublié quelque chose chez moi pour justifier de revenir à l'apéro le lendemain. C'est moins fréquent maintenant. A croire qu'Olivia t'a rendu moins distrait ! Continue Olivia, il est presque parfait ! J'ai hâte de témoigner de votre union solennelle !

Romain, je t'ai découvert en deux fois. Le premier Romain, c'était le marlou qui écumait toutes les soirées (et certains disent que tu ne regretterais pas un certain week-end ski !). Pour connaître le deuxième Romain, il fallait gratter un peu et travailler à tes côtés. J'aime ta rigueur dans le travail, ton efficacité (tu es l'homme qui a vidé la case « uro ») et surtout ta sensibilité ! Vous formez un chouette couple avec Inès et c'est toujours un plaisir de se voir : en soirée ou dans les pentes pyrénéennes ou Audoises. Ne nous perdons pas de vue quand vous allez partir je ne sais où !

Plus récemment Thibaut, c'est en partie à cause de moi que tu as fait ton internat en Champagne ! Je m'en excuse. En tout cas, c'est un plaisir de travailler avec toi. Et, ce qui ne gâche rien, Anne et toi avez un goût certain pour les prénoms de petit garçon !

Mes co-internes d'avant l'IUC

Nos relations étaient plus intimistes que maintenant et je vous connais mieux que les nouvelles générations.

Youri, tu es la personne qui m'a fait découvrir l'anapath et m'a formé à la macro. Mon premier semestre en ta compagnie reste un très bon souvenir. Je sais que tout va bien pour toi aujourd'hui et j'en suis ravi. Tes éclats de rire me manquent !

Romulus, je suis très heureux de t'avoir rencontré pendant mon internat. J'aime ta joie de vivre et ton humour. La soirée béninoise restera gravée dans ma mémoire, ainsi que la queue de bœuf épicée délicieuse dans un boui-boui près de la gare, où je n'aurais jamais mis les pieds tout seul.

Claire, nous n'avons été co-internes que tardivement mais j'ai l'impression de bien te connaître finalement. Tu réussis tout ce que tu entreprends, au travail comme dans la vie personnelle (je pense à ton magnifique petit Arthur), avec une pudeur tout à fait charmante. Je t'admire et je suis heureux de travailler avec toi.

Audrey, quel plaisir de t'avoir comme collègue. Tu es d'une douceur et d'une gentillesse très apaisantes. Tu aimes (quasiment) tout le monde, ce qui est une vraie force. Je suis content de t'avoir comme collègue de l'autre côté du mur (on pourrait percer un hublot).

Julie, quelle reconversion ! Je n'avais pas mis beaucoup de points quand je t'avais écartée des « vrais internes » lors de ton premier semestre parmi nous. Cela ne nous a pas empêché de

devenir copains ensuite. Tu es très agréable et charmante. C'est une chance de te connaître.

Gwendo, quel accent ! Tu parles extrêmement bien le Jane Birkin. Ton humour n'a d'égal que ton sérieux. Je pense que nous allons passer de bonnes années ensemble.

Aurore, je suis content de te voir revenir parmi nous bientôt. Toujours partante pour rendre un service. C'est très stimulant de travailler avec toi.

Laureline, tu nous as lâchement abandonnés pour les macules, papules, pustules, bulles, croûtes, ulcères et autres joyeusetés ragoûtantes. Cependant, c'est toujours un plaisir de te croiser au détour d'une soirée et d'apprécier les nouvelles évolutions de la mode féminine.

Anne-Cha, quelle femme tu es ! Discrète et consciencieuse, mais avec beaucoup d'humour et de grands éclats de rire communicatifs. Je garde bien au fond de mon cœur ce semestre à Purpan avec toi, quand tu me ridiculais au jeu de bagarre !

Sarah, copine de Purpan aussi. Tu vis ton boulot à 100 à l'heure, mais qui ne t'a jamais vue en soirée ne te connais pas tout à fait. Éclate-toi en M2 avec Camille. Et souffle un peu !

Laure, ma montalbanaise préférée (attendez votre tour les autres !). Quelle gouaille tu as ! J'ai mis un peu de temps à comprendre ton langage. Je sais pas outséksé kta appris à causer comme ça ! Nous avons partagé de très bons moments à Purpan et tu me fais toujours rire avec ton franc-parler. Ne change rien !

Gauthier, tu n'es pas dans le groupe du dessous parce que nous avons passé un semestre ensemble à Purpan. J'ai l'impression que tu te plais aujourd'hui à arracher des dents. Cependant, tes origines te rappellent parfois dans les couloirs de l'anapath, et c'est un plaisir de te voir à cette occasion.

Je remercie aussi tous les jeunes, c'est agréable de travailler ensemble même si nos relations ne sont pas aussi privilégiées à 13 internes qu'à 2 ou 3.

Charlotte (reconversion réussie, c'est un plaisir de t'avoir parmi nous), Seb (tu me fais bien marrer), Quentin (toujours prêt pour un projet, j'aime ton engagement et ton humour), Cécile (on se connaît peu mais j'aime ton sérieux et ta sincérité), Claire (tu as l'air heureuse de ton sort, c'est agréable de travailler avec toi), Alix (je t'apprécie beaucoup, je vois en toi une future anapath consciencieuse et volontaire), Gabrielle (nous avons deux points communs, nous sommes tous les deux passés en médecine légale, et nous ne resterons pas au milieu des cadavres, vivement ton retour), Justine et Lisa (nous aurons le temps de nous connaître un peu mieux, vous serez les bienvenues à mon microscope).

Les indécis

Marine et Pierre-Olivier. Pour vous rassurer, je vous dirais qu'il n'y a qu'un bon choix : celui que vous ferez ! Marine, tu étais ma première interne en tant qu'interne séniorisé. J'espère t'avoir donné le goût de la pathologie mammaire.

Les gens de passage

Lise (seulement de passage, qui l'eut cru ? Ce ne fut pas le coup de foudre attendu. Peu importe, tu as été d'une efficacité incroyable pour notre article. Il ne me reste qu'à le soumettre), Nicolas (bientôt radiologue, j'étais content de te rencontrer), Nouritza (laisse parler l'artiste qui est en toi, tu es une pianiste impressionnante), Ephraïm (sympathique et arrangeant, je suis content de t'avoir connu).

Merci à tous les techniciens pour votre travail et votre sympathie

Vous nous êtes indispensables et c'est un plaisir de travailler ensemble, en pensant aux patients. Bien sûr, je fus plus proche de certains d'entre vous : les techniciens de macro (j'aime la macro), les techniciens d'immuno (notamment de Purpan, le quatuor Valérie, Laurence, Gabrielle, Michel avec qui j'ai fait mes premières armes dans ce domaine), les techniciens du ChiBOP et ceux de Claudius Regaud (eh oui, je fais la bise à Chantal, ne soit pas si jaloux Ben !).

Merci aux cadres Myriam et Béatrice qui gèrent tout ce petit monde et tout le matos. Ce n'est pas une mince affaire !

Merci à toutes les secrétaires pour leur gentillesse et leur efficacité.

Merci aux ingénieurs de tout poil pour leur travail acharné, en bio mol, en qualité et en informatique.

Merci à nos ARC et chefs de projets, notamment Nadia (merci pour ces longues discussions culturelles dans la salle de réunion de Purpan, tu mériterais vraiment que je te rende ton livre) et Samira.

Je remercie les cliniciens et chirurgiens avec qui je suis en contact : Henri Roché et Florence Dalenc en tête pour les oncologues et Hélène (tu vas nous manquer), Eva et Charlotte pour les chirurgiens.

Merci à ceux que j'ai rencontrés ailleurs

L'équipe de Tarbes

Secrétaires, techniciennes, médecins, j'ai passé l'un de mes meilleurs semestres en votre compagnie, tant pour votre accueil, votre gentillesse et vos compétences que pour la montagne toute proche. J'aime à vous revoir par-ci par-là.

Les services de médecine légale

De Toulouse, d'abord, où j'ai passé mon deuxième semestre. J'ai adoré ce métier et votre compagnie. J'ai adoré mon co-interne pendant ce stage (mais je viendrai à toi plus tard, Fred) et j'ai beaucoup appris auprès de Norbert, Fabrice et des autres, dans une ambiance chaleureuse. J'aime la réflexion médico-légale. Et avec un peu de recul, j'aurais aussi aimé être juge d'instruction. Mais on ne peut pas tout faire. C'est ainsi.

De Marseille. Je suis nostalgique de votre ville et de cette période de ma vie. Victor était petit. Je passais au pied de Notre-Dame-de-la-Garde matin et soir sous un ciel bleu magnifique. Et je passais d'excellentes journées en stage où j'ai rencontré des gens que je n'oublierai jamais. Marie-Do, bien sûr, mais aussi les deux Pierre (Massiani, pour la matinée tir au fusil à pompe et à la 22 ; et Perich parce que tu es une personne extraordinaire, sensible, cultivée et drôle, tout cela dans une carapace simple et parfois grotesque, tu m'évoques le Neveu de Rameau), Jacques (pince-sans-rire professionnel, j'aime ton humour et ton savoir), Lucile (quand toutes les qualités sont réunies en une seule personne), Marc-Antoine (super mec) Caroline (*cf supra*), et tous les autres. Je remercie aussi mes deux géniales co-internes Clémence et Céline. Qu'est-ce qu'on a ri ! Je vous aime beaucoup toutes les deux et j'ai plaisir à vous revoir. J'avoue ici ne pas avoir eu le coup de foudre pour l'anapath médico-légale. Ce qui a grandement facilité ma réflexion le 19 janvier 2015, quand Magali et Philippe m'ont annoncé par téléphone qu'il y aurait besoin de moi à l'IUC (ce qui n'était pas gagné). Ce jour restera gravé dans ma mémoire.

Les équipes de recherche :

L'équipe de Salvatore. Salva et Sabina, je vous adore (« ce projet à moi me plaît », Salva !). Merci pour votre chaleureux accueil dans votre laboratoire pour mon M2. Pauline, voisine de bureau pendant le M2. J'aime travailler et papoter avec toi.

L'équipe de Jean-Sébastien, pour notre travail sur POLQ. Valérie bien sûr, nous allons y arriver avec ces anticorps ! Merci pour votre accueil et votre gentillesse. Une pensée émue pour Christophe Cazaux, un homme admirable que j'aurai eu la chance de connaître un petit peu.

Tant qu'on y est, j'en profite pour remercier mes copains du M2 : David (mais je reviendrai à toi plus tard), Sarah (plein de très bons souvenirs en ta compagnie, au boulot comme en dehors), Michael et Pierre-Paul (des bières, de l'immuno, de la viro et encore des bières !) et tous les autres, que je croise parfois à l'IUC.

Un grand merci à tous mes (autres) copains, sans qui la vie serait moins facile

Les copains de Toulouse

Fred et Nath, il faut absolument que l'on se voit. Nous avons les mêmes valeurs et c'est toujours agréable de passer un moment ensemble.

Cédric, quelle dignité ! Toujours aux soirées et presque toujours impeccable. Ensemble, nous avons frôlé l'escarre en DU d'évaluation du dommage corporel. Et ça, ça crée des liens !

David et Emilie, vous êtes un modèle de joie de vivre et vous formez un beau couple. David, nous avons déjà bien accroché à l'internat, mais le M2 a fini de nous rapprocher. J'aime ton style détendu et ton sérieux. Tu es très classe ! Nous sommes ravis d'assister bientôt à votre mariage.

Cyrielle et Max, nous (Céline et moi) sommes ravis de vous connaître. Cyrielle, nous t'avons rencontrée à l'internat en premier semestre. Ton accent qui chante et ton côté pétillant nous ont tout de suite séduits. Nous partageons des valeurs communes avec vous. C'est toujours très agréable de vous voir.

Laetitia et Guillaume, votre couple fait plaisir à voir. Merci Laeti de m'avoir permis de rencontrer Guillaume. Je n'avais jamais vu quelqu'un d'aussi sympathique et sociable, ça force le respect.

Claire et Baptiste, je suis un peu responsable de la formation de votre couple et je n'en suis pas peu fier. Nous nous voyons peu mais toujours avec un grand plaisir. Claire, je sais que tu me suis de près pour passer ta thèse alors bon courage.

Olivier, Matthieu, Rodger et les autres. Les copains de soirées. J'ai toujours plaisir à vous retrouver pour une bonne bouffe ou un apéro.

Olivier, mon pote de Tarbes, extraordinaire sportif et accordéoniste de talent. Tu m'as fait découvrir de très belles choses, Bob Brozman en tête. J'aime ton humour et ta justesse de jugement.

Thibaud, l'impeccable oncologue que j'ai surtout côtoyé aux soirées œnologie ou autour de verres de vin. Il faut que l'on remette ça ! Ce n'est pas si loin, Cugnaux.

Les potes de Tours

Mea Culpa, je pense souvent à vous mais ne donne jamais de nouvelles. On s'éloigne et c'est en partie de ma faute.

La team sous-colle : Marcel (bientôt à Dax, ça nous rapprochera), Stopher et Miguel. Vous m'avez porté vers le haut. C'est un peu grâce à vous si je suis là.

Matthieu et Laure, les bretons. La famille parfaite. J'aimerais que l'on puisse se voir plus souvent mais ça fait très très loin.

Vivien et Alice (je viendrais bien un jour faire du monocycle près de Saint-Etienne), Pierrot et Béné, Raph (toulousains d'adoption, on se voit un petit peu plus)

Les copains de toujours

La Team Margon Coast bien sûr : John mon pote absolu, à qui je n'ai pas besoin de dire de vraies choses, je peux tout inventer. Je t'adore mon vieux. Et tu as trouvé une femme charmante et rigolote qui répond au doux nom de Camille. C'est parfait ! Grec (ça te va bien ce surnom), monocycliste et hockeyeur, nous sommes quasiment les mêmes, j'aime ton éclectisme et ta joie de vivre, et ta femme ! Loucasse, mon cousin et mon copain, nous sommes quasiment inséparables.

Guiguit et Amélie : quel plaisir de vous voir à chaque fois ! Dommage du peu. Vous nous manquez d'une fois sur l'autre

Tous les copains du hockey qui m'ont appris l'esprit d'équipe pendant les matches, et l'esprit festif la veille (mauvaise idée !).

Mes potes JC (et sa Camille), Jacky et Stef. Potes du lycée mais potes de toujours. J'espère vous voir bientôt.

Les copains du collège, ceux de l'âge bête : Redwane, Cyprien et Joseph. Sans aucun doute, ma transformation d'enfant en adulte s'est faite avec vous. J'ai été modelé à notre image. Bon courage à vous dans vos vies respectives.

Pas de remerciement pour

Monsieur C, mon professeur principal en terminale, qui m'a encouragé d'un éclat de rire et d'un « *Tu vas te planter en médecine* ». Bravo pour votre clairvoyance !

Ne changez rien ! La médiocrité aussi a besoin de son étalon.

Et enfin, merci à ma famille, à qui je dois absolument tout.

La famille qui m'a fait

Mes parents : merci pour tout, dans le vrai sens du terme. La vie, l'éducation, la stabilité, les idées que vous m'avez transmises. Je vous remercie pour votre ineffable bonté. Vous êtes des parents formidables. Lors de cette soirée pluvieuse de novembre 1984 à Margon dans le Perche, pensiez-vous à ce que vous faisiez ? Pensiez-vous que 31 ans et 10 mois plus tard, vous seriez à Toulouse pour assister à la thèse du rejeton ? La vie est surprenante, non ?

Mes frères Julien et Pierre, la paire de jumeaux qui m'a permis de voir plus grand. Je suis fier de vous, des familles que vous avez fondées de votre côté. Aline et Julie, mes belles-sœurs (bientôt officielles !), vous parlez un peu fort mais c'est pour ça que je vous aime ! Thomas, Léon et Nina, mes neveux et nièce, je vous souhaite de belles vies. Vous êtes bien tombés.

Une pensée pour mes grands-parents : ceux partis récemment, René et Nénette. Vous restez une source d'inspiration pour nous, les jeunes. Et Pépère Dédé et Mémère Madeleine, vous êtes des grands-parents parfaits.

Et le reste de la famille : mes oncles et tantes, cousins et cousines dont je suis si proche. Ma Marraine Pascale dont je suis admiratif et qui pourrait bien être là pour la soutenance ! Merci. Ça me fait chaud au cœur.

Ma belle-famille. Véronique et Olivier, comme je suis heureux de vous connaître ! Vous m'avez apporté beaucoup en quelques années. Claire et Alex, Fabien et Antoine, c'est un plaisir de faire partie de votre famille.

La famille que j'ai fondée

Céline, ma chérie, tu m'apportes un peu de rigueur et de suite dans les idées. Tu es tout ce qu'il me fallait. Très pragmatique et pondérée, tu transmets un peu de raison à ton rêveur de Bibi. Née dans l'adversité, dans un contexte de cour d'assises et de préparation à l'internat, notre relation fut d'abord un pari, celui de venir ensemble à Toulouse. C'est un succès total et je te remercie 1 000 fois de m'avoir poussé vers le sud. Je t'aime.

Notre fils, Victor, assurément ma plus grande fierté. Mon Victor, tu grandis tellement vite que je présage que dans quelques mois, tu feras des commentaires très à-propos sur le travail de thèse de ton père. Nous ferons tout ce qui est en notre pouvoir pour que tu grandisses bien et que tu n'aies pas trop honte de tes géniteurs.

*Je dédie l'ensemble de ce travail à Christophe,
qui ne m'a jamais vu passer en P2.*

Je pense toujours à toi mon pote.

**ANALYSE D'IMAGE AUTOMATISEE DE L'HYBRIDATION IN SITU
EN FLUORESCENCE POUR L'EVALUATION DU STATUT *HER2*
DANS LES CANCERS DU SEIN**

TABLE DES MATIERES

I. INTRODUCTION.....	8
A. GENERALITES SUR LES CANCERS DU SEIN.....	8
A.1 EPIDEMOLOGIE	8
A.2 HISTOLOGIE DU SEIN ET GRANDES LIGNES DE LA PATHOLOGIE CANCEREUSE.....	8
A.3 APPROCHE THERAPEUTIQUE.....	9
A.4 CLASSIFICATION MORPHOLOGIQUE.....	10
A.5 CLASSIFICATION MOLECULAIRE.....	12
A.5.1 Introduction	12
A.5.2 Vue d'ensemble de la classification moléculaire des carcinomes mammaires.....	13
A.6 FACTEURS PRONOSTIQUES ET PREDICTIFS DANS LES CANCERS DU SEIN	20
A.6.1 L'âge	21
A.6.2 Le stade TNM	21
A.6.3 L'envahissement ganglionnaire axillaire	23
A.6.4 La taille tumorale.....	24
A.6.5 Le grade histologique	24
A.6.6 Index de prolifération.....	27
A.6.7 Le type histologique	27
A.6.8 Les embolies vasculaires carcinomateux péri-tumoraux.....	28
A.6.9 Les récepteurs hormonaux	28
A.6.10 L'oncogène HER2	29
A.6.11 Le sous-type moléculaire	30
B. HER2	31
B.1 BIOLOGIE DE HER2	31
B.2 AMPLIFICATION DU GENE <i>HER2</i>	33
B.3 LES CANCERS DU SEIN AVEC AMPLIFICATION DE <i>HER2</i>	35
B.3.1 Taux de surexpression de HER2 dans les carcinomes mammaires	35
B.3.2 Approche moléculaire des carcinomes mammaires HER2 amplifiés.....	35
B.3.3 Stabilité du taux de HER2 entre la tumeur primitive et les métastases.....	36
B.3.4 Hétérogénéité intratumorale du statut de HER2	36
B.4 THERAPIES CIBLEES ANTI-HER2	38
B.4.1 Historique.....	38
B.4.2 Mécanismes d'action des thérapies ciblées anti-HER2	39
C. EVALUATION DU STATUT HER2	41
C.1 INTRODUCTION SUR LES NOUVELLES RECOMMANDATIONS	41
C.2 INDICATIONS DE L'EVALUATION DU STATUT HER2	41
C.2.1 Stade initial de la maladie	41
C.2.2 Stade métastatique.....	42
C.2.3 Fréquence de positivité attendue.....	42
C.2.4 Phase pré-analytique	43
C.2.5 Généralités sur la phase analytique	43
C.2.6 Critères d'interprétation de l'immunohistochimie et conduite à tenir	44
C.2.7 Introduction à l'hybridation in situ.....	46
C.2.8 Critères d'interprétation de l'hybridation in situ en fluorescence	50
D. PATHOLOGIE DIGITALE EN ANATOMO-PATHOLOGIE	55
D.1 HISTORIQUE.....	55
D.2 PATHOLOGIE DIGITALE : UNE ANALOGIE AVEC LA PHOTOGRAPHIE NUMERIQUE	55
D.3 FORMATS DE FICHIERS D'IMAGES NUMERISEES.....	58
D.4 INTRODUCTION AU TRAITEMENT ET A L'ANALYSE D'IMAGE.....	59
D.5 APPROCHE INFORMATIQUE DE L'ANALYSE AUTOMATISEE D'IMAGE DE FISH.....	60
D.5.1 La segmentation nucléaire.....	60
D.5.2 La classification des noyaux	60
II. OBJECTIFS DE L'ETUDE	62
III. MATERIELS ET METHODES.....	63

A.	SELECTION DES PATIENTS.....	63
A.1	COHORTE TECHNIQUE.....	63
A.2	COHORTE DE VALIDATION.....	63
B.	RECUEIL DES DONNEES CLINIQUES ET BIOLOGIQUES	64
C.	COHORTE TECHNIQUE – REALISATION DES BLOCS	65
D.	IMMUNOHISTOCHEMIE	66
E.	HYBRIDATION IN SITU EN FLUORESCENCE (FISH)	66
F.	LECTURE ET INTERPRETATION DES LAMES DE FISH	69
G.	PCR QUANTITATIVE.....	69
G.1	EXTRACTION D'ADN	69
G.2	PROTOCOLE DE PCR QUANTITATIVE.....	69
H.	NUMERISATION DES LAMES ET ANALYSE D'IMAGE.....	71
H.1	SCANNER DE LAME ET LOGICIEL DE CONTROLE DU SCANNER	71
H.2	CHOIX DES FILTRES.....	71
H.3	SCANMAP.....	72
H.4	REGLAGES DE MISE AU POINT ET D'EXPOSITION	72
H.5	AUTRES REGLAGES.....	72
H.6	ANALYSE D'IMAGE	73
H.6.1	Cohorte technique.....	73
H.6.2	Cohorte de validation	74
I.	DEVELOPPEMENT DES ALGORITHMES.....	74
J.	ANALYSE STATISTIQUE.....	74

IV. RESULTATS **76**

A.	DEVELOPPEMENT DES ALGORITHMES DE CLASSIFICATION DES NOYAUX	76
A.1	ALGORITHME « FXF ».....	80
A.1.1	Cluster « Negative »	80
A.1.2	Cluster « Amplification »	80
A.1.3	Cluster « Ambiguous ».....	81
A.1.4	Cluster « Empty Nuclei »	81
A.1.5	Cluster « Other/Artefact »	81
A.2	ALGORITHME « ADAPT »	82
A.2.1	Cluster « Negative »	82
A.2.2	Cluster « Monosomy »	82
A.2.3	Cluster « Equivocal – Polysomy »	83
A.2.4	Cluster « Amplification – weak ».....	83
A.2.5	Cluster « Amplification – strong ».....	84
A.2.6	Cluster « CEP 17 coamplification – Overlapping ».....	84
A.2.7	Cluster « Other.Artefact ».....	84
A.3	ALGORITHME « CYTO ».....	85
A.3.1	Cluster « Negative »	86
A.3.2	Cluster « Monosomy »	86
A.3.3	Cluster « Polysomy »	87
A.3.4	Cluster « Gain »	87
A.3.5	Cluster « Amplification »	88
A.3.6	Cluster « Other/Artefact »	88
A.4	AUTRES CONSIDERATIONS SUR LES ALGORITHMES.....	88
A.4.1	Filtre nucléaire par forme	88
A.4.2	Paramètre de distance de fusion des signaux.....	89
B.	PARAMETRES DE L'ANALYSE D'IMAGE	89
B.1	INTERFACE DU LOGICIEL ET VARIABLES D'ENTREE.....	89
B.2	EXPORTATION DES DONNEES ET VARIABLES DE SORTIE	91
C.	ETAPE TECHNIQUE.....	93
C.1	DESCRIPTION DE LA COHORTE TECHNIQUE	93
C.2	DESCRIPTION DU CAS « D10 » : TEMOIN POSITIF ET NEGATIF	93
C.3	VALIDITE INTRINSEQUE DE L'ANALYSE D'IMAGE POUR LA DETECTION DES NOYAUX NEGATIFS ET POSITIFS	96
C.3.1	Résultats de segmentation nucléaire communs à tous les algorithmes	96
C.3.2	Validité intrinsèque de l'analyse d'image avec l'algorithme « FXF ».....	97
C.3.3	Validité intrinsèque de l'analyse d'image avec l'algorithme « adapt ».....	97
C.3.4	Validité intrinsèque de l'analyse d'image avec l'algorithme « cyto ».....	98

C.3.5	Synthèse de la validité intrinsèque de l'analyse d'image	99
C.4	CARACTERISTIQUES DES NOYAUX MAL CLASSES PAR L'ANALYSE D'IMAGE.....	101
C.4.1	Caractéristiques des noyaux classés dans le cluster « Amplification » en analyse d'image	101
C.4.2	Caractéristiques des noyaux classés dans les clusters « Negative » et « Monosomie » en analyse d'image.....	102
C.5	ANALYSE D'IMAGE DES LAMES DE LA COHORTE TECHNIQUE.....	104
C.5.1	Cas non analysables.....	104
C.5.2	Erreurs de segmentation.....	105
C.5.3	Erreurs de détection des signaux CEP17 et HER2.....	106
C.5.4	Grande proportion de noyaux dans le cluster « Monosomie »	107
C.5.5	Discordances entre le nombre de copies de HER2 en analyse d'image et la surface des signaux HER2	107
C.6	SYNTHESE DES RESULTATS OBTENUS AVEC LA COHORTE TECHNIQUE.....	110
D.	ETAPE DE VALIDATION	111
D.1	DESCRIPTION DE LA COHORTE DE VALIDATION.....	111
D.2	RESULTATS DE L'ANALYSE D'IMAGE ET DE LA LECTURE MANUELLE	111
D.2.1	Lecture manuelle	111
D.2.2	Lecture automatisée par analyse d'image	111
D.2.3	Concordance entre les différentes techniques d'analyse de FISH	113
D.2.4	Cas discordants.....	114
V.	<u>DISCUSSION.....</u>	115
VI.	<u>CONCLUSION.....</u>	123
VII.	<u>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</u>	124

LISTE DES ABREVIATIONS

ADCC : Cytotoxicité cellulaire dépendante de l'anticorps

ADN : Acide désoxyribonucléique

ARN : Acide ribonucléique

ASCO : Société américaine d'oncologie clinique

ATP : Adénosine tri-phosphate

CAP : Collège des pathologistes américains

CDK : *Cyclin-dependant kinase*

cDNA : Acide désoxyribonucléique complémentaire

CEP17 : Sonde d'énumération du chromosome 17

CGH : Hybridation génomique comparative

DISH : *Dual ISH*, Hybridation in situ double couleur

CK : Cytokératine

CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité

Ct : Cycle seuil

Cy3 : Cyanine 3

DAB : Diaminobenzidine

DAPI : 4,6-Diamidino-2-phenylindole

DM1 : maytansine

DPI : Dossier patient informatisé

Fab : *Fragment antigen binding*

Fc : Fragment constant

FISH : Hybridation in situ en fluorescence

FITC : Isothiocyanate de fluorescéine

FN : Faux négatif

FP : Faux positif

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

HER2 : *Human epidermal growth factor receptor-2*

HSR : *Homogeneously Staining Region*

IHC : Immunohistochimie

INCa : Institut National du Cancer

IQ-FISH : *Instant Quality – Fluorescent in situ hybridization*

ISH : Hybridation in situ

MCD : *Modal Centromere Derivation*

NPI : Index pronostique de Nottingham

OMS : Organisation mondiale de la santé

PCR : *Polymerase chain reaction*, réaction de polymérisation en chaîne

PCR : *Polymerase chain reaction*, réaction de polymérisation en chaîne

pTNM : *pathologic Tumor Node Metastasis*

RA : Récepteur aux androgènes

RE : Récepteur aux œstrogènes α

RH : Récepteurs hormonaux

RNASEq : Séquençage de l'acide ribonucléique

ROC : *Receiver Operating Characteristic*

RP : Récepteur à la progestérone

RPPA : *Reverse Phase Protein Assay*

RT-PCR : *Reverse transcriptase – polymerase chain reaction*

Se : Sensibilité

SNP : *Single Nucleotide Polymorphism*

Sp : Spécificité

TCGA : *The Cancer Genome Atlas*

T-DM1 : Trastuzumab emtansine

TNM : *Tumor Node Metastasis*

TR : Texas Red

UICC : *Union for international cancer control*

USCAP : Académie américaine et canadienne de pathologie

UTDL : Unité terminale ductulo-lobulaire

VN : Vrai négatif

VP : Vrai positif

VPN : Valeur prédictive négative

VPP : Valeur prédictive positive

XML : *Extensible Markup Language*

I. INTRODUCTION

A. GENERALITES SUR LES CANCERS DU SEIN

A.1 EPIDEMIOLOGIE

Avec environ 54 000 nouveaux cas et près de 12 000 décès en France en 2015, le cancer du sein est la première cause de mortalité féminine par cancer en France (estimations INCa). L'incidence de ce cancer a augmenté entre 1980 et 2005 et tend aujourd'hui à diminuer [1]. La mortalité associée au cancer du sein diminue également depuis la fin des années 1990.

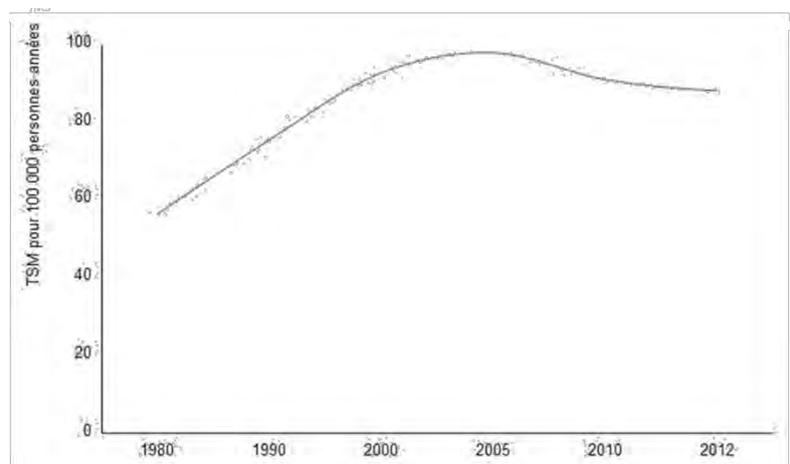


Figure 1 : Sources : Estimation nationale de l'incidence et de la mortalité par cancer en France entre 1980 et 2012. Partie 1 - Tumeurs solides. Traitement : INCa 2013. TSM : Taux standardisé monde pour 100 000 personnes/an.

Plusieurs facteurs de risque environnementaux et comportementaux sont impliqués dans la survenue d'un cancer du sein : l'exposition aux hormones stéroïdes (naturelle ou liée à un traitement substitutif de la ménopause), une parité faible ou nulle, l'absence d'allaitement et l'accroissement de l'âge au premier enfant.

A.2 HISTOLOGIE DU SEIN ET GRANDES LIGNES DE LA PATHOLOGIE CANCEREUSE

La glande mammaire correspond à une glande apocrine hyperspécialisée. Au niveau du mamelon s'abouchent les pores d'une quinzaine de canaux galactophores de gros calibre. Ces canaux se ramifient dans la profondeur du sein, jusqu'à aboutir à l'unité terminale ductulo-lobulaire (UTDL). Au niveau des lobules, les acini sont bordés par une double assise cellulaire : une assise cellulaire épithéliale glandulaire interne, ou luminale, et une assise externe composée de cellules myoépithéliales aux propriétés contractiles. Les cellules myoépithéliales synthétisent la membrane basale qui sépare la glande du stroma fibro-adipeux environnant. En dehors de la

période de lactation, les structures épithéliales sont inactives et ne représentent qu'une infime partie de la masse du sein, qui est alors constituée pour l'essentiel de tissu adipeux et conjonctif.

Une grande majorité des cancers du sein sont des adénocarcinomes qui se développent à partir des cellules épithéliales glandulaires (cellules luminales), le plus souvent au niveau de l'UTDL. Lorsque la prolifération carcinomateuse se développe à l'intérieur des structures canalaire sans franchir la membrane basale, on parle de carcinome *in situ*. Si la prolifération franchit la membrane basale et envahit le stroma sous-jacent, on parle de carcinome infiltrant. Le carcinome infiltrant peut disséminer au-delà du parenchyme mammaire au cours du processus métastatique [2-5]. Ce processus comprend la dissémination métastatique par voie lymphatique aux ganglions lymphatiques homolatéraux et la dissémination par voie sanguine à des organes à distance (foie, poumon, os et système nerveux central le plus souvent). Ce sont les métastases à distance qui sont responsables du décès des patientes atteintes de cancer du sein. Cinq pour cent des patientes sont métastatiques au moment du diagnostic. Parmi les patientes présentant une maladie localisée au moment du diagnostic, environ un tiers va développer des métastases à distance malgré le traitement adjuvant [6].

A.3 APPROCHE THERAPEUTIQUE

Le traitement du cancer du sein comprend deux axes principaux :

- Le traitement locorégional dont le premier temps est l'acte chirurgical. Cet acte chirurgical peut être radical (mastectomie) ou conservateur (tumorectomie) et est associé à un geste axillaire homolatéral (procédure du ganglion sentinelle et/ou curage axillaire). Le traitement par radiothérapie clôture le traitement locorégional selon des indications précises. La radiothérapie est obligatoire en cas de geste chirurgical conservateur. Outre l'éradication des cellules tumorales présentes dans le sein, le traitement locorégional a pour objectif de réduire le risque de rechute locale ou locorégionale.
- Le traitement systémique (chimiothérapie et/ou hormonothérapie), dit « adjuvant » lorsqu'il est administré après le geste chirurgical, ou « néoadjuvant » lorsqu'il est administré en premier lieu, avant l'intervention chirurgicale. Le traitement néoadjuvant est envisageable dans certaines situations cliniques : cancer du sein inflammatoire, cancer localement avancé, tumeur volumineuse dans l'optique d'un geste chirurgical conservateur [7]. Le traitement systémique adjuvant est prescrit en fonction des caractéristiques cliniques et biologiques de la tumeur (facteurs pronostiques et prédictifs). Son objectif principal est la prévention du risque métastatique. La décision thérapeutique s'appuie sur les recommandations et référentiels régionaux, nationaux et internationaux émanant de groupes de travail ou de conférences de consensus tels que Saint Gallen ou Saint Paul de Vence [8].

A.4 CLASSIFICATION MORPHOLOGIQUE

La dernière classification des tumeurs du sein par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) identifie vingt-deux types histologiques différents (Tableau 1), soulignant la grande hétérogénéité des cancers du sein [9]. Cette classification repose sur la description morphologique des tumeurs. Bien qu'ils soient détaillés dans chaque chapitre de l'OMS, les profils immunohistochimique et moléculaire des différents types histologiques ne constituent jamais un diagnostic *per se*.

Le type histologique de cancer du sein le plus fréquent est le carcinome infiltrant de type non spécifique, encore appelé carcinome canalaire infiltrant. Il représenterait jusqu'à 80% des diagnostics de cancer du sein [9-11]. Comme son nom l'indique, et malgré sa fréquence, son diagnostic est un diagnostic d'exclusion qui ne doit être retenu qu'après avoir dédouané tous les sous-types spéciaux de cancers du sein. Par définition, ce type histologique renferme une grande variété de tumeur très hétérogènes entre elles, tant sur le plan morphologique que sur leurs profils immunohistochimique et moléculaire.

Le second type histologique, et premier sous-type spécial en fréquence, est le carcinome lobulaire infiltrant. Il représenterait jusqu'à 15% des diagnostics de cancer du sein [9-11]. Il est constitué de cellules discohésives le plus souvent de petite taille, peu atypiques, et se disposant en file indienne. Dans une grande majorité de cas, leur profil immunohistochimique est récepteur aux œstrogènes α (RE) positif, récepteur à la progestérone (RP) variable, Human Epidermal growth factor Receptor-2 (HER2) non surexprimé.

Tableau 1 : Classification des types histologiques de cancer du sein [9]

Type histologique
Carcinome infiltrant de type non spécifique
Sous-types spéciaux
Carcinome lobulaire infiltrant
Carcinome tubuleux
Carcinome cribriforme infiltrant
Carcinomes mucineux
Carcinome avec faits médullaires
Carcinome avec différenciation apocrine
Carcinome avec cellules en bague à chaton
Carcinome micropapillaire infiltrant
Carcinome métaplasique
Carcinome adénoïde kystique
Sous-types rares
Carcinome avec faits neuroendocrines
Carcinome sécrétant (juvénile)
Carcinome papillaire infiltrant
Carcinome à cellules acineuses
Carcinome mucoépidermoïde
Carcinome polymorphe
Carcinome oncocytique
Carcinome à cellules riches en lipides
Carcinome à cellules claires (riches en glycogène)
Carcinome sébacé
Tumeurs de type annexes cutanées / glandes salivaires

A.5 CLASSIFICATION MOLECULAIRE

A.5.1 INTRODUCTION

La publication, en 2000, de l'article sur les portraits moléculaires des cancers du sein a révolutionné notre approche de la pathologie mammaire [12]. En classant les tumeurs en fonction de profils d'expression des gènes, grâce à la technique du cDNA array, les auteurs ont ouvert la voie à une approche complètement nouvelle de la diversité des cancers du sein. En 2002, la publication d'une signature d'expression génique prédisant les rechutes métastatiques dans le cancer du sein, sans envahissement des ganglions axillaires, faisait trembler les pathologistes qui prédisaient la fin de l'approche morphologique dans les cancers du sein [13, 14]. En 10 ans, la classification moléculaire a été affinée, d'autres classifications ont été proposées, des tests génomiques ont été développés pour prédire l'évolution métastatique des patientes ou la réponse tumorale aux traitements. Cependant, ces nouveaux tests génomiques peinent à trouver leur place en clinique. En 2011 et 2012, une série d'articles issus des nouvelles techniques de séquençage massif a ouvert encore plus notre horizon de connaissances sur les anomalies moléculaires présentes dans les cancers du sein [15-18]. Le cancer du sein considéré autrefois comme une maladie uniforme se révèle être un ensemble de multiples entités disparates se distinguant par des anomalies en nombre de copies d'ADN, des réarrangements intra- et interchromosomiques, des mutations de gènes, des profils de méthylation de l'ADN, des profils transcriptomiques.

Un certain nombre d'informations apportées par ces techniques peuvent être transposées au matériel et aux outils que nous utilisons tous les jours, c'est à dire aux tumeurs fixées au formol et incluses en paraffine et à l'analyse morphologique et immunohistochimique des cancers du sein. La pathologie mammaire a ainsi pu bénéficier de l'apport de ces différentes techniques moléculaires et, après une brève description de ces approches moléculaires, nous aborderons les deux principaux grands groupes moléculaires de cancers du sein que sont les tumeurs de type luminal et les tumeurs n'exprimant pas le RE.

A.5.2 VUE D'ENSEMBLE DE LA CLASSIFICATION MOLECULAIRE DES CARCINOMES MAMMAIRES

Les techniques à notre disposition à l'heure actuelle permettent d'acquérir différents types de données :

- Les données du transcriptome : cDNA array, RNASeq ;
- Les données du génome : CGH array, SNP array, Whole Genome Sequencing, Exome Sequencing ;
- Les données du protéome : RPPA et immunohistochimie (IHC).

Nous allons passer en revue ces différentes sources d'information puis nous nous baserons sur la classification immunohistochimique pour décrire les classes de tumeurs rencontrées en clinique.

a. Données du transcriptome

La classification transcriptomique des cancers mammaires repose sur l'analyse simultanée du niveau d'expression des ARN messagers de milliers de gènes dans une même tumeur et le regroupement des différentes tumeurs mammaires en fonction de leur profil d'expression génique [19]. Cette classification des tumeurs repose sur des analyses bio-informatiques très sophistiquées. Les différentes publications des chercheurs de l'université de Stanford se basent sur une méthode bio-informatique de classification hiérarchique non supervisée appelée classification intrinsèque car cet outil permet de regrouper les tumeurs en fonction de gènes dont le niveau d'expression varie le moins pour deux échantillons d'une même tumeur par rapport à deux échantillons de deux tumeurs différentes [12, 20-22]. Grâce à cet outil, la classification de Pérou et Sörlie reconnaît cinq grands groupes de tumeurs mammaires :

- Tumeurs de phénotype Luminal A,
- Tumeurs de phénotype Luminal B,
- Tumeurs de phénotype HER2 enrichi,
- Tumeurs de phénotype Basal-like,
- Tumeurs de phénotype Normal Breast-like.

Ces cinq classes peuvent être regroupées en deux catégories de cancers du sein : les cancers du sein exprimant le gène *ESR1*, codant pour le RE, appelés le phénotype Luminal comprenant les Luminal A et B et représentant 80% des cancers du sein ; et les cancers n'exprimant pas le RE, représentant 20% des cancers du sein et regroupant les HER2 enrichi, Basal et Normal Breast-like. Par la suite ; les auteurs ont démontré que cette classification avait une valeur pronostique sur leur set de tumeurs mais également sur des sets de tumeurs indépendants ; les tumeurs de

phénotype Luminal A ayant un meilleur pronostic que les tumeurs de phénotype Luminal B, Basal et HER2 enrichi [21, 22]. La classification intrinsèque sous-entend que les différentes catégories de tumeurs individualisées : Luminal A, Luminal B, HER2 enrichi, Basal et Normal Breast-like dériveraient de types cellulaires normaux différents.

Telle quelle, la classification intrinsèque n'est pas applicable à toutes les tumeurs mammaires en routine car il faut avoir à sa disposition du matériel tumoral congelé et des ARN non dégradés. Une classification intrinsèque simplifiée a été élaborée, dénommée PAM50, non plus basée sur l'expression de 1900 gènes, comme précédemment, mais sur seulement 50 gènes [23]. Le niveau d'expression de ces gènes peut être analysé par une technique de RT-PCR quantitative à partir d'ARN extraits de tumeurs fixées au formol et incluses en paraffine. En gagnant en simplicité d'utilisation, cette technique a cependant perdu en précision de classement. Néanmoins, elle est devenue la technique de référence pour le classement intrinsèque des tumeurs du sein. Cette technique est disponible à l'Institut Universitaire du Cancer – Oncopole de Toulouse depuis peu.

Les tumeurs de phénotype Luminal

La signature d'expression intrinsèque Luminale est caractérisée par une expression élevée d'*ESR1* et des gènes dont le niveau de transcription est dépendant d'*ESR1* : *GATA3*, *FOXA1*, *XBP1* et *MYB* [23]. Les tumeurs Luminales sont ensuite subdivisées en deux catégories A et B. On verra plus loin que cette subdivision est basée principalement sur le niveau d'expression de gènes liés à la prolifération cellulaire. Il n'y a pas de frontière nette sur le plan transcriptomique entre les tumeurs de phénotype Luminal A et de phénotype Luminal B. Le niveau d'expression des gènes liés à la prolifération est une variable continue présentant un mode de distribution gaussien. Ce qui fait que tout seuil appliqué pour différencier Luminal A et Luminal B est un seuil arbitraire. On peut se demander dès lors si les tumeurs Luminal A et B ne pourraient pas dériver d'un même type cellulaire mais présentant des altérations génétiques plus importantes dans les Luminal B que dans les Luminal A.

Les tumeurs de phénotype HER2 enrichi

La classification intrinsèque individualise la catégorie HER2 enrichi dans la classe des tumeurs RE négatives. Mais nous savons en pratique clinique qu'approximativement 50% des tumeurs surexprimant HER2 sont RE négatives et 50% sont RE positives. Les tumeurs RE+ et surexprimant HER2 sont en fait retrouvées dans la catégorie des tumeurs Luminal B [24].

Les tumeurs de phénotype Basal

Elles sous-expriment le RE et les gènes dépendant d'*ESR1* ainsi que HER2. Par contre elles surexpriment des cytokératines (CK) de haut poids moléculaire tels que les CK5, CK14 et CK17. Ce type de kératine est généralement exprimé par des cellules basales des épithéliums

pavimenteux malpighiens tels que le revêtement épidermique et les cellules myoépithéliales des acini. Des travaux récents ont montré que les cancers de phénotype Basal ont comme cellules originelles des cellules luminales progénitrices [25-27].

La catégorie Normal Breast-like

Cette classe de tumeur initialement décrite par Pérou et Sörlie correspond en réalité à un artefact lié à la technique d'analyse transcriptomique. Cette classe de tumeurs est définie par un profil d'expression des gènes intrinsèques très similaire à celui observé pour le sein normal, d'où le terme Normal Breast-like. Pour analyser le transcriptome d'une tumeur, on doit broyer d'abord cette tumeur pour en extraire les ARN messagers. Il s'agit d'ARN provenant de cellules carcinomateuses infiltrantes, mais aussi de cellules de carcinome in situ, de cellules stromales et de cellules provenant de structures normales du sein environnant. Le broyage tumoral se fait à l'aveugle si l'on ne contrôle pas la proportion relative des différents compartiments cellulaires précédemment énumérés, par exemple en analysant une section tissulaire du fragment à partir duquel on va extraire les ARN messagers. Le plus souvent, les cellules carcinomateuses infiltrantes sont majoritaires et le profil transcriptomique obtenu sera le reflet de ce compartiment de cellules tumorales. Mais dans un certain nombre de cas, les cellules carcinomateuses seront minoritaires par rapport aux cellules stromales et bénignes, et le profil transcriptomique obtenu sera similaire à celui obtenu à partir de tissu mammaire normal.

Méthode de classification alternative

Farmer et coll. ont publié postérieurement aux travaux de Pérou et Sörlie, une autre méthode de classification hiérarchique non supervisée n'individualisant que trois classes de tumeurs dénommées Luminal, Basal et Apocrine Moléculaire et appelée classification de Farmer [28]. Dans cette classification, toutes les tumeurs RE positives sont de phénotype Luminal. Parmi les tumeurs RE négatives et récepteur aux androgènes (RA) positives, nous distinguons les tumeurs n'exprimant ni les RE ni les RA qui se rangent dans la catégorie des tumeurs de phénotype Basal et les tumeurs RE négatives et RA positives que nous avons dénommées Apocrine Moléculaire car elles présentent, dans une certaine mesure, le même phénotype que les cellules apocrines normales. Dans cette dernière catégorie, il existe un sous-type de tumeurs surexprimant HER2 et un sous-type ne surexprimant pas HER2 (Figure 2).

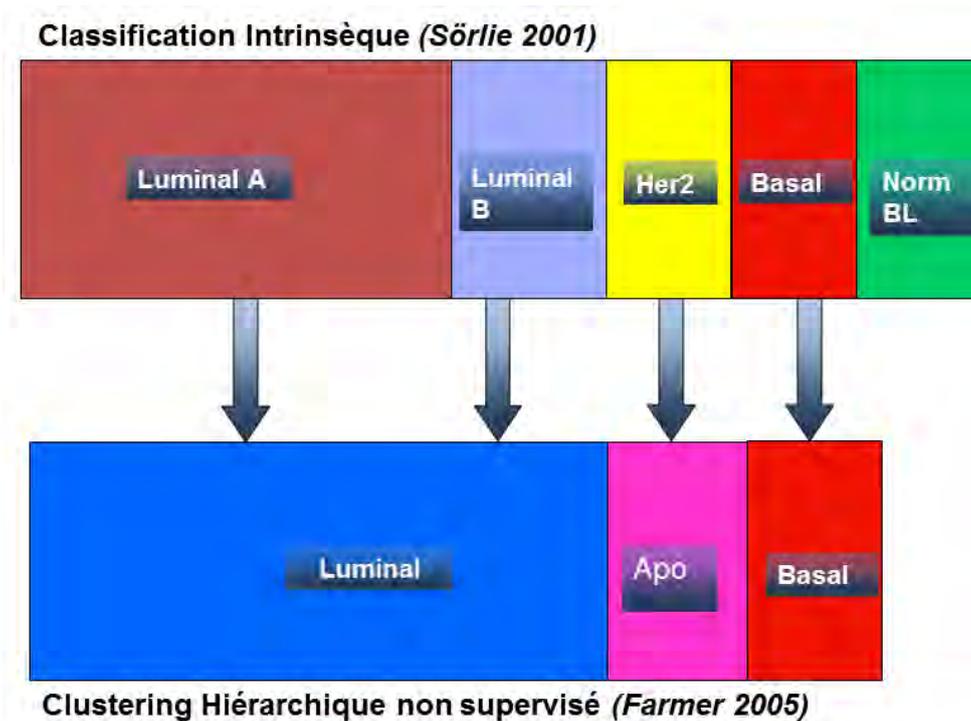


Figure 2 : Classification moléculaire des cancers du sein

Classification moléculaire et sous-types histologiques

Toutes les études transcriptomiques ont analysé essentiellement les carcinomes canaux infiltrants de type non spécifique car ce sont les plus fréquents. Qu'en est-il des autres types histologiques de cancer du sein ?

Weigelt et coll. ont montré par une méthode de classification hiérarchique non supervisée que les différents types histologiques spécifiques des tumeurs du sein pouvaient également avoir un profil transcriptomique distinctif [29] :

- Tumeurs de phénotype Luminal : carcinomes lobulaires infiltrants dans leur variante classique, carcinomes tubuleux, mucineux, neuroendocrines et micropapillaires.
- Tumeurs de phénotype Basal : carcinomes médullaires, métaplasiques, adénoïdes kystiques et sécrétoires.
- Tumeurs de phénotype Moléculaire Apocrine : carcinomes lobulaires infiltrants dans leur variante pléomorphe et carcinomes apocrines.

Ainsi, une bonne analyse morphologique des tumeurs permet déjà de les catégoriser sur le plan moléculaire.

b. Classification immunohistochimique

Les classifications moléculaires sont potentiellement intéressantes si elles peuvent être utilisées en pratique clinique de routine. Or la manipulation des ARN à partir de fragments tissulaires

congelés et l'interprétation des données bio-informatiques ne sont pas à la portée de tout le monde. Cependant on peut, dans une certaine mesure, transposer ces classifications transcriptomiques en une classification morphologique et immunohistochimique applicable sur des fragments tissulaires fixés au formol et inclus en paraffine. La conférence de consensus de Saint Gallen de 2013 a entériné cette idée en proposant de classer les tumeurs en fonction de critères immunohistochimiques avec un traitement adapté à chaque classe immunohistochimique (Figure 3) [8]. Cette transposition n'est cependant valable qu'à un certain nombre de conditions résumées de la façon suivante : i) disposer d'un matériel tumoral correctement fixé au formol et conditionné de manière adéquate ; ii) être en mesure de bien classer les tumeurs sur le plan morphologique et de connaître les différents types histologiques de tumeurs mammaires ; iii) disposer d'une technique immunohistochimique optimale, standardisée et reproductible soumise à des contrôles de qualité interne et externe.

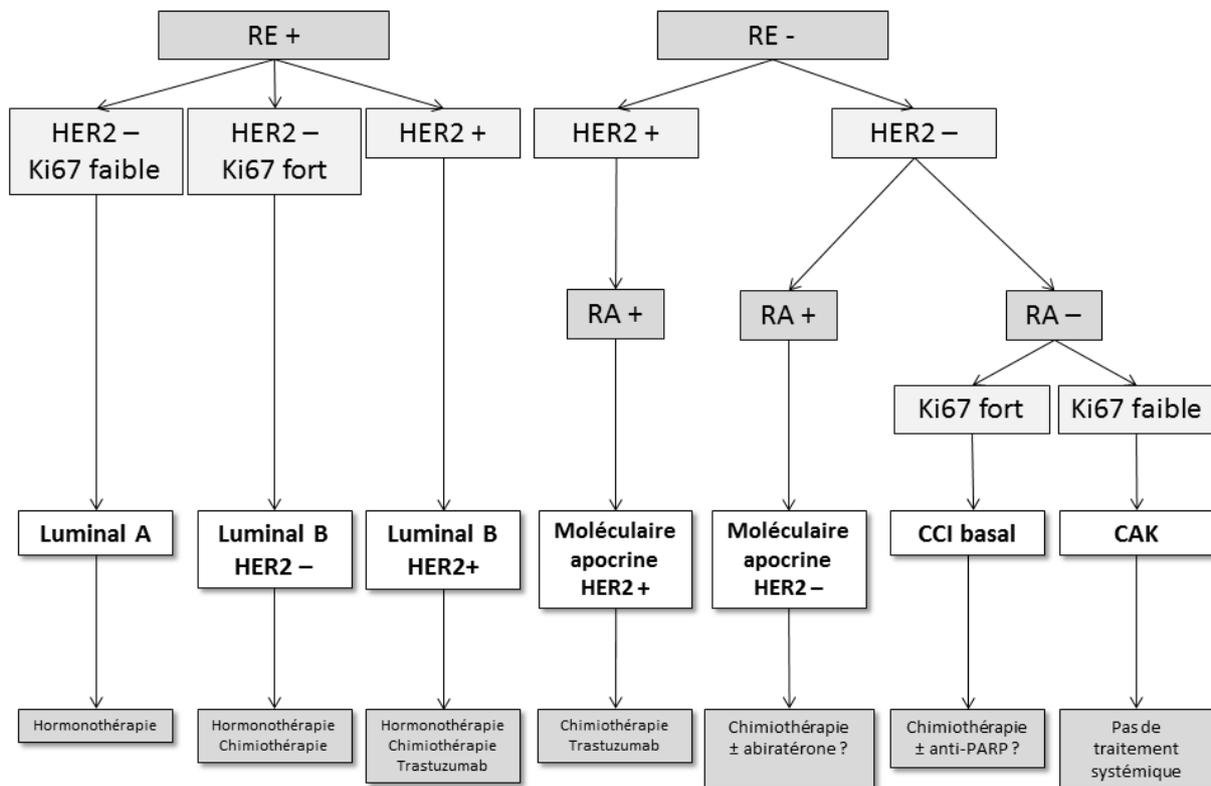


Figure 3 : Classification immunophénotypique des cancers du sein et traitements systémiques

c. Données du génome

Anomalies en nombre de copies d'ADN

Parallèlement à l'étude du niveau d'expression des gènes, des méthodes d'analyse des anomalies en nombre de copies au niveau d'un gène ou d'un segment chromosomique du génome ont été développées. Il s'agit des techniques de CGH array et de SNP array. Quand il existe une augmentation légère du nombre de copies dans un endroit du génome on parlera de « gain » ou de « duplication » et en cas d'augmentation importante on parlera d' « amplification ». En cas de diminution du nombre de copies on parlera de « délétion ». Chaque fois qu'il y a une modification en gain ou en perte, les endroits du génome où démarrent et où se terminent ces modifications s'appellent « points de cassure ».

D'après les travaux de Chin et de Hicks, on distingue trois types de cancer du sein [30, 31] :

- Les cancers du sein « simplex » ou à profil 1q/16q. Il s'agit de tumeurs peu remaniées sur le plan génétique, présentant un profil CGH ou SNP array relativement plat avec de grands segments d'ADN délétés ou dupliqués. On y observe un gain ou une duplication pratiquement constante du bras long du chromosome 1 (1q) et une perte du bras long du chromosome 16 (16q).
- Les cancers du sein « en tempête de feu » ou à profil amplificateur. Il s'agit de tumeurs caractérisées par une amplification de petites régions du génome, isolées ou concomitantes.
- Les cancers du sein « en dents de scie ». Il s'agit de tumeurs caractérisées par de très nombreuses altérations du nombre de copies d'ADN, de faible amplitude, réparties sur l'ensemble du génome, traduisant une instabilité chromosomique.

Données intégrées des anomalies en nombre de copies d'ADN et du transcriptome

Grâce à l'intégration des données du génome et du transcriptome, Curtis et coll. ont pu individualiser 10 classes moléculaires différentes de cancers du sein ayant des pronostics différents [32]. Parmi ces 10 classes moléculaires, deux sont de très bon pronostic. La première concerne essentiellement des tumeurs de phénotype Luminal A caractérisées par un profil CGH plat de type simplex, 1q/16q (carcinomes infiltrants de type non spécifique de grade I, carcinomes tubuleux). La deuxième concerne des carcinomes infiltrants de n'importe quel sous-type moléculaire mais avec un infiltrat inflammatoire important, donnant une signature transcriptomique de type immune et un profil CGH plat. Parmi les autres classes moléculaires, six sont de pronostic intermédiaire et deux de mauvais pronostic. Parmi les deux dernières classes on retrouve la classe des tumeurs HER2 amplifié et surexprimé qu'elles soient

Luminal B HER2+ ou HER2 enrichi, et une classe de tumeurs Luminal A ou B caractérisées par une amplification de deux régions situées en 11q. Parmi les gènes candidats dans ces régions amplifiées on retrouve *CCND1* codant pour la cycline D1 et *EMSY*, un inhibiteur de BRCA2.

Mutations ponctuelles

En 2012, le consortium nord-américain TCGA a analysé 510 tumeurs du sein par une technique de séquençage nouvelle génération et a identifié 35 gènes significativement mutés dans les cancers du sein [33].

Le profil mutationnel des tumeurs du sein varie selon le sous-type moléculaire. Les mutations sont plus variées et diverses dans les cancers du sein de phénotype Luminal que dans les cancers de phénotype HER2 enrichi ou Basal. Cependant, le taux de mutations par mégabase est plus faible dans les tumeurs Luminal A (0,84) que dans les tumeurs Luminal B (1,38), HER2 enrichi (2,05) et Basal (1,68). Les deux gènes les plus fréquemment mutés dans le cancer du sein sont *TP53* (37%) et *PIK3CA* (36%). Les proportions de ces mutations varient selon le sous-type moléculaire. Par exemple *TP53* est muté dans 12% des Luminal A, 29% des Luminal B, 72% des HER2 enrichi et 80% des Basal [33]. L'étude de Ciriello et coll. a récemment comparé le profil mutationnel de 127 carcinomes lobulaires infiltrants à celui de 201 carcinomes infiltrants de type non spécifique de phénotype Luminal A [34]. Les caractères distinctifs entre ces deux types histologiques incluaient une très grande fréquence de mutation du gène *CDH1* dans les carcinomes lobulaires infiltrants par rapport aux carcinomes infiltrants de type non spécifique. Quatre-vingt-quinze pour cent des carcinomes lobulaires infiltrants sont caractérisés par une altération de l'E-cadhérine associant une mutation tronquante au niveau du gène *CDH1* à une délétion hétérozygote en 16q. *FOXA1* est plus souvent muté dans les carcinomes lobulaires infiltrants (8% vs 2%) alors que *GATA3* est plus souvent muté dans les carcinomes infiltrants de type non spécifique (5% vs 20%). Par ailleurs, les altérations inactivantes de PTEN sont plus fréquentes dans les carcinomes lobulaires infiltrants (14%) que dans les carcinomes infiltrants de type non spécifique de phénotype Luminal A (3%). On note également une activation très fréquente d'AKT dans les carcinomes lobulaires infiltrants passant soit par une mutation de *PIK3CA* (48%) ou une inactivation de PTEN (14%).

A.6 FACTEURS PRONOSTIQUES ET PREDICTIFS DANS LES CANCERS DU SEIN

Il existe de nombreux facteurs pronostiques et prédictifs dans le cancer du sein, souvent redondants entre eux, et à des stades plus ou moins avancés de validation clinique. Ces facteurs peuvent être cliniques, morphologiques, biologiques ou moléculaires. L'évaluation des facteurs pronostiques a pour but d'approcher au plus près les caractéristiques tumorales intrinsèques en termes de croissance tumorale, de capacité d'invasion et de potentiel métastatique. Le rôle des facteurs prédictifs est de prédire la capacité de réponse d'une tumeur à un traitement donné. Certains facteurs sont à la fois pronostiques et prédictifs.

La conférence de consensus du Collège des Pathologistes Américains a publié une classification des marqueurs pronostiques dans le cancer du sein composée de trois catégories [35]. La catégorie 1 regroupe les facteurs pronostiques importants utilisés pour les décisions thérapeutiques. La catégorie 2 regroupe les facteurs pronostiques étudiés sur le plan clinique et biologique, mais nécessitant une validation dans des cohortes cliniques statistiquement pertinentes. La catégorie 3 regroupe tous les autres facteurs pronostiques potentiellement utiles mais non suffisamment étudiés. De façon consensuelle, les 3 facteurs pronostiques les plus importants à l'heure actuelle restent l'envahissement ganglionnaire, la taille tumorale et le grade histologique [6]. Par ailleurs, pour la population sans envahissement ganglionnaire, la conférence de consensus internationale de St-Gallen définit un sous-groupe de patientes à très faible risque (i.e. avec un risque de rechute $\leq 10\%$ à 10 ans) lorsque tous les critères suivants sont remplis : (1) tumeur de moins de 2cm, (2) grade I histologique, (3) absence d'embolie vasculaire carcinomateux péri-tumoral, (4) statut HER2 négatif, (4) âge ≥ 35 ans [36]. Nous allons détailler succinctement quelques facteurs pronostiques cliniques, puis les facteurs pronostiques histologiques des deux premières catégories selon la conférence de consensus du Collège des Pathologistes Américains (Tableau 2).

Tableau 2 : Catégories 1 et 2 des facteurs pronostiques dans le cancer du sein selon la conférence de consensus du Collège des Pathologistes Américains (adapté de [35])

Catégorie 1	Catégorie 2
<ul style="list-style-type: none">• Stade TNM (Tumor Node Metastasis)• Statut ganglionnaire axillaire• Taille histologique de la tumeur• Grade histopronostique• Type histologique• Compte mitotique• Statut des récepteurs hormonaux	<ul style="list-style-type: none">• Emboles vasculaires carcinomateux péri-tumoraux• Statut de l'oncogène HER2• Marqueurs de prolifération<ul style="list-style-type: none">○ Ki67• Statut p53

A.6.1 L'AGE

L'âge jeune est un facteur pronostique péjoratif tant en termes de récurrence locale qu'en termes de récurrence métastatique. Ainsi, après traitement chirurgical conservateur d'un cancer du sein, les femmes âgées de moins de 35 ans ont 4 fois plus de risque de récurrence locale que les femmes de plus de 55 ans [36, 37]. De même, le risque de décès lié au cancer est maximal chez les femmes de moins de 30 ans [38]. Il faut par ailleurs souligner que le cancer du sein chez la femme jeune est souvent lié à un contexte de prédisposition génétique héréditaire (mutation des gènes de prédisposition *BRCA1* ou *BRCA2*). Ces patientes font l'objet d'une enquête oncogénétique. Les formes héréditaires liées à une mutation *BRCA1* sont le plus souvent des formes agressives n'exprimant ni le RE, ni le RP, ni HER2.

A.6.2 LE STADE TNM

Le stade TNM (Tableau 3) est défini par trois critères : la taille tumorale (T = Tumeur), l'envahissement ganglionnaire lymphatique (N = Nœuds lymphatiques) et la présence de métastases à distance (M = Métastases). Ce système de stadification international, qui est régulièrement révisé en fonction des connaissances et de l'évolution des techniques de prise en charge, comporte 2 volets :

- un système de stadification purement clinique (TNM), basé sur la détermination **clinique** de la taille tumorale, de l'envahissement ganglionnaire et des métastases à distance (recherche de métastases à distance par le bilan radiologique d'extension). Ce stade clinique est le premier à être établi, et permet au clinicien de choisir la stratégie thérapeutique initiale.
- un système de stadification pathologique (pTNM, dernière mise à jour UICC 2009), effectué au décours de la chirurgie et basé sur une appréciation **histologique** de la taille et de l'envahissement ganglionnaire. Le stade histopathologique permet d'orienter le traitement adjuvant et fournit des informations pronostiques.

Le caractère pronostique du stade TNM est désormais clairement établi [35, 38-40]. Ainsi, la survie à 5 ans de patientes présentant un stade M1 (avec métastases à distance) est inférieure à 30% [38, 39].

Tableau 3 : Classification (p) TNM des tumeurs du sein (UICC 2009)

pT	
pTx	Détermination de taille de la tumeur primitive impossible
pT0	Pas de signe de tumeur primitive
pTis	Carcinome in situ
pTis (CCIS)	Carcinome canalaire in situ
pTis (CLIS)	Carcinome lobulaire in situ
pTis (Paget)	Maladie de Paget du mamelon sans tumeur décelable
pT1	Tumeur ≤ 2cm dans sa plus grande dimension
pT1mic	Micro-invasion ≤ 0.1cm
pT1a	0.1cm < Tumeur ≤ 0.5cm
pT1b	0.5cm < Tumeur ≤ 1cm
pT1c	1cm < Tumeur ≤ 2cm
pT2	2cm < Tumeur ≤ 5cm
pT3	Tumeur > 5cm
T4	Tumeur de toute taille avec extension à la paroi thoracique et/ou à la peau
T4a	Extension à la paroi thoracique
T4b	Extension à la peau
T4c	Extension à la paroi thoracique et à la peau
T4d	Cancer du sein inflammatoire (entité clinique spécifique)
pN	
pNx	Atteinte ganglionnaire impossible à préciser
pN0	Absence d'envahissement ganglionnaire
pN0 (i+)	Présence de cellules tumorales isolées de taille ≤ 0.2mm
pN0 (mol+)	Absence de signe histologique d'envahissement mais test moléculaire (RT-PCR) positif
pN1mi	Micro-métastase(s) de taille > 0.2mm et ≤ 2mm
pN1	Envahissement ganglionnaire modéré
pN1a	1 à 3 ganglions axillaires envahis

pN1b	Ganglions sentinelles mammaires internes envahis (diagnostic histologique)
pN1c	Critères associés pN1a et pN1b
pN2	Envahissement ganglionnaire important
pN2a	4 à 9 ganglions axillaires métastatiques
pN2b	Métastases ganglionnaires mammaires internes cliniques sans envahissement axillaire
pN3	Envahissement ganglionnaire massif
pN3a	≥ 10 ganglions axillaires envahis ou métastase ganglionnaire sous claviculaire
pN3b	Métastases mammaires internes et axillaires
pN3c	Métastase ganglionnaire sus-claviculaire

M

M0	Absence de métastase à distance
M1	Métastase(s) à distance

p : caractéristique déterminée exclusivement par le pathologiste ; T : Tumeur ; N: Nœuds lymphatiques ; M : Métastases.

A.6.3 L'ENVAHISSEMENT GANGLIONNAIRE AXILLAIRE

L'envahissement ganglionnaire axillaire peut être évalué soit sur pièce de curage axillaire, soit par la technique du ganglion sentinelle (premier relais ganglionnaire lymphatique de drainage de la tumeur). Il s'agit à l'heure actuelle du facteur pronostique le plus important dans la prédiction de la rechute métastatique et de la survie liée au cancer du sein [35, 38]. L'envahissement des ganglions axillaires est associé à un pronostique défavorable : la survie globale à 5 ans passe de plus de 85% pour les patientes sans métastase ganglionnaire (patientes « N -») à 75% pour les patientes avec envahissement ganglionnaire (patientes « N +») dans les cohortes SEER et EURO CARE [38]. Le nombre de ganglions atteints est corrélé au risque de rechute métastatique à distance. Les séries anciennes rapportent des taux de rechute de 25% pour les patientes N-, de 65% pour les patientes N+ avec 1 à 3 ganglions atteints, et de 86% pour les patientes N+ avec plus de 4 ganglions envahis [41].

A.6.4 LA TAILLE TUMORALE

La taille tumorale mesurée par le pathologiste lors de l'examen macroscopique et microscopique de la pièce opératoire est corrélée à l'envahissement des ganglions axillaires : 20% des tumeurs de moins de 1 cm sont associées à la présence de métastases ganglionnaires contre 70% pour les tumeurs de plus de 5 cm. La survie globale à 5 ans passe de 91% pour les tumeurs de moins de 2 cm, à 63% pour les tumeurs de plus de 5 cm [41]. De façon plus spécifique, une étude sur plus de 2800 patientes présentant une tumeur de moins de 2 cm montre que les patientes ayant une tumeur ≤ 5 mm ont une survie sans métastase à distance de 100% à 9 ans [42].

A.6.5 LE GRADE HISTOLOGIQUE

Le grade histologique (Tableau 4) est déterminé sur les caractéristiques morphologiques de la tumeur. Si plusieurs systèmes existent, le grade histologique de Scarff Bloom et Richardson modifié par Elston et Ellis (grade de Nottingham) est le plus largement utilisé à l'heure actuelle [43]. Il constitue un facteur pronostique important et indépendant pour la rechute métastatique et la survie liée au cancer, tant dans le groupe des patientes N- que N+. Dans la série de 2 219 patientes publiée par l'équipe de Elston et Ellis en 2008, la survie liée au cancer à 10 ans était de plus de 90% pour les tumeurs de grade I, autour de 90% pour les tumeurs de grade II et de 70% pour les tumeurs de grade III [6]. Le grade histologique apporte une information pronostique supplémentaire : à titre d'exemple, dans cette même série, les patientes N+ avec une tumeur de grade II ont un meilleur pronostic que les patientes N- avec une tumeur de grade III [6].

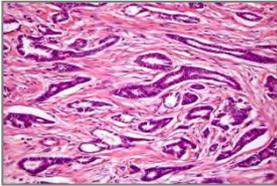
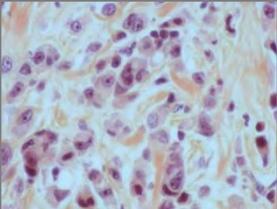
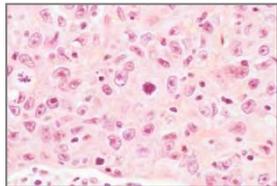
Il est important de souligner que le point le plus important dans le grade histologique est la détermination de l'activité mitotique, reflétant la prolifération tumorale. Ce point, à lui seul, est aussi corrélé à la survie sans rechute ou à la survie globale, mais les seuils utilisés pour séparer les patientes à haut et bas risque de rechute restent largement critiqués compte tenu d'un manque de standardisation. Néanmoins, il est désormais clairement établi que la prolifération tumorale occupe une place primordiale dans la détermination du pronostic évolutif des patientes atteintes de cancer du sein.

Enfin, l'équipe de Nottingham a proposé d'inclure le grade histologique dans une combinaison des 3 facteurs pronostiques les plus importants (statut ganglionnaire, taille tumorale et grade histologique), permettant la prise de décision thérapeutique : il s'agit de l'Index Pronostique de Nottingham (NPI)[44]. Il se calcule selon la formule suivante :

$$\text{NPI} = 0.2 \text{ T (cm)} + \text{grade (I à III)} + \text{score ganglionnaire (1 à 3)}$$

Cet index pronostique a été validé sur plusieurs séries indépendantes et est utilisé en pratique courante au Royaume Uni [6].

Tableau 4 : Grade histopronostique de Scarff Bloom Richardson modifié par Elston et Ellis (grade de Nottingham) [43]

Différenciation architecturale		<i>Proportion de formation de structures tubulo-glandulaires dans la tumeur</i>	
	Score 1	Bien différencié (> 75% de la tumeur)	
	Score 2	Moyennement différencié (10 à 75%)	
	Score 3	Peu différencié (< 10% de la tumeur)	
Pléomorphisme nucléaire		<i>Atypies nucléaires</i>	
	Score 1	Noyaux réguliers entre eux de taille < à 2 fois la taille de noyaux de cellules normales	
	Score 2	Critères intermédiaires	
	Score 3	Noyaux irréguliers avec anisocaryose ou de taille > à 3 fois celle de noyaux normaux, avec nucléoles proéminents	
Mitoses		<i>Compte mitotique sur 10 champs au fort grossissement rapporté au diamètre du champ (ici : 0,57 mm de diamètre)</i>	
	Score 1	0 à 9 mitoses	
	Score 2	10 à 18 mitoses	
	Score 3	> 18 mitoses	
Grade histopronostique		Score total obtenu en additionnant les 3 items	
I		3 à 5	Pronostic favorable
II		6 et 7	Pronostic intermédiaire
III		8 et 9	Pronostic défavorable

A.6.6 INDEX DE PROLIFERATION

La prolifération tumorale joue un rôle central dans la caractérisation des cancers du sein et l'évaluation de leur pronostic. En pratique courante, la prolifération cellulaire est évaluée par deux approches :

- Le compte mitotique sur 10 champs de surface tumorale à fort grossissement, rapporté en nombre de mitoses/mm², qui fait partie du grade histologique. Le compte doit être effectué au niveau des zones les plus mitotiques. La technique du compte mitotique est standardisée selon les recommandations de Elston et Ellis [43] et la reproductibilité du compte mitotique est bonne.
- L'immunomarquage des cellules en cycle avec l'anticorps anti-Ki67 est très largement utilisé actuellement. Ki67 est une protéine nucléaire et nucléolaire codée par le gène *MKI67* sur le chromosome 10q25. Elle est impliquée dans les phases précoces de la synthèse des ARN ribosomiaux dépendante de la polymérase I et est exprimée dans les phases G1, S, G2 et M du cycle cellulaire [45]. Son expression est détectée en IHC, le plus souvent avec le clone MIB1. L'interprétation des immunomarquages Ki67 en pourcentage de cellules tumorales marquées fait l'objet de multiples travaux, notamment dans le but de standardiser les techniques et méthodes de lecture [46, 47]. Les recommandations les plus récentes issues d'un groupe de travail international sur le Ki67 établissent clairement que la mesure du Ki67 par IHC est actuellement la méthode de choix pour évaluer la prolifération tumorale en pratique courante [46]. L'index Ki67 est corrélé au type histologique, au compte mitotique [48] et au grade histologique [49]. Le seuil de positivité au-delà duquel on considère une tumeur comme hautement proliférante est de 20% en France [24, 46-52]. L'index de prolifération évalué par l'immunomarquage anti-Ki67 est un facteur pronostique indépendant de niveau de preuve Ib selon les résultats de vastes méta-analyses incluant plus de 10 000 patientes [47, 53, 54].

A.6.7 LE TYPE HISTOLOGIQUE

Certains types histologiques, comme les carcinomes infiltrants de type tubuleux, mucineux, adénoïde kystique ou cribriforme, sont classiquement décrits comme associés à un bon pronostic. Les carcinomes lobulaires infiltrants ont globalement le même pronostic que les carcinomes canaux infiltrants [11].

A.6.8 LES EMBOLES VASCULAIRES CARCINOMATEUX PERI-TUMORAUX

Il s'agit de l'intravasation de cellules carcinomateuses dans les structures vasculaires (le plus souvent lymphatiques, mais aussi sanguines) situées autour de la tumeur. Ces images sont systématiquement recherchées à l'examen microscopique, car leur présence est un facteur de mauvais pronostic indépendant, tant dans la population de patientes N- (prédiction de la rechute métastatique et de la survie) que de patientes N+ (prédiction de la rechute locale) [55].

A.6.9 LES RECEPTEURS HORMONAUX

L'expression par la tumeur des récepteurs hormonaux (RH), *i.e.* du RE et du RP, est systématiquement recherchée par technique immunohistochimique devant tout diagnostic de cancer infiltrant du sein. Parmi l'ensemble des cancers du sein, 75 à 80% expriment les RE et 60 à 70% expriment les RP, 20% environ des tumeurs étant négatives pour les deux récepteurs [8, 56]. Cette recherche systématique repose cependant plus sur l'utilisation de ce marqueur en tant que facteur prédictif de réponse à l'hormonothérapie qu'en tant que facteur pronostique. En effet, la valeur pronostique du statut des RH, même si elle est reconnue de façon consensuelle, est de moindre importance en comparaison à sa valeur prédictive. Néanmoins, il est clairement établi que la co-expression de ces deux RH (RE et RP) est un facteur de bon pronostic, et ce d'autant plus que le niveau d'expression est élevé [56, 57]. A l'opposé, une absence totale d'expression de ces deux récepteurs est corrélée à un pronostic défavorable [58]. Par ailleurs, une expression dissociée des récepteurs (profil phénotypique tumoral RE+ RP-) est également de moins bon pronostic, comme le montre une étude sur plus de 13 000 patientes publiée en 2005 : les tumeurs RE+/RP- sont plus proliférantes, plus souvent aneuploïdes, expriment trois fois plus l'EGFR et surexpriment plus souvent HER2 que les tumeurs RE+/RP+ [57]. Les récentes classifications moléculaires des cancers du sein et les outils moléculaires pronostiques viennent fortement appuyer ces données.

La détermination du statut des RH s'effectue par technique immunohistochimique sur coupes histologiques de tumeurs fixées et incluses en paraffine. Cette technique largement répandue, automatisée et désormais mieux standardisée, permet de visualiser l'expression de l'antigène au niveau des cellules tumorales et de préciser sa localisation (nucléaire). Le résultat est apprécié par le pathologiste de façon semi-quantitative, par évaluation du pourcentage de cellules marquées et de l'intensité du marquage (faible, modérée, forte). Le seuil de positivité retenu en Europe est de 10% de cellules tumorales marquées (quelle que soit l'intensité du marquage), tout carcinome infiltrant présentant au moins 10% de cellules marquées étant considéré comme positif et pouvant de ce fait justifier d'une hormonothérapie adjuvante. Dans certains pays comme les Etats-Unis, le seuil fixé est plus bas, utilisant un système de scoring différent

combinant le pourcentage de cellules positives et l'intensité du marquage (score d'Allred) [59, 60]. Malgré cette persistante controverse sur le seuil de positivité retenu, l'ensemble des équipes s'accorde désormais sur l'importance d'une démarche qualité extrêmement rigoureuse pour la détermination immunohistochimique du statut des RH, strictement appliquée par une grande majorité des laboratoires selon les recommandations nationales et internationales [59].

Sur le plan prédictif, les RH sont corrélés, en premier lieu, à la réponse à l'hormonothérapie : environ 60% des tumeurs exprimant le RE répondent initialement aux traitements hormonaux et en particulier au tamoxifène [61], contre moins de 10% de réponse en l'absence d'expression des RH.

Par ailleurs, des analyses plus fines ont montré que le niveau d'expression des RH (RE et RP) constitue également un facteur prédictif de réponse au tamoxifène : chez 398 patientes recevant du tamoxifène en première ligne métastatique, il a été observé 62% de réponse objective chez les patientes dont la tumeur exprime les RE à des taux très élevés contre 42% de réponse chez celles dont le niveau d'expression des RE est faible [62]. Dans la même étude, il apparaît que le taux de réponse est également corrélé au niveau d'expression des RP, témoin de la fonctionnalité des RE : les taux de réponse observés sont de 61%, 53% et 43% lorsque les tumeurs expriment le RP respectivement à des taux fort, modéré ou faible. Par ailleurs, les tumeurs RE+ / RP- présentent une moindre sensibilité au traitement par tamoxifène que les tumeurs RE+ / RP+ : le pourcentage de réponse objective en situation métastatique est de 27% pour les tumeurs RE+ / RP- versus 77% pour les tumeurs RE+ / RP+ [57, 63].

A.6.10 L'ONCOGENE HER2

Un chapitre particulier sera dédié à l'oncogène *HER2* et à la protéine HER2. Cependant, notons ici que l'évaluation du statut HER2 dans les cancers du sein avait, historiquement, un intérêt uniquement pronostique. Les tumeurs surexprimant HER2 étaient associées à un pronostic défavorable de par leurs rechutes précoces et leur évolution métastatique rapide [42, 64, 65]. Ainsi, dans l'étude du registre finlandais, la survie sans récurrence métastatique à 9 ans passe de 89% en l'absence de surexpression à 73% en présence d'une surexpression de HER2 pour les tumeurs pT1N0M0 ($p=0.0003$) [42]. De même, dans une étude de 2 026 patientes N-, Chia et al montrent que la survie sans rechute est significativement supérieure pour les patientes présentant une tumeur HER2- par rapport aux patientes avec une tumeur HER2+ (survie sans rechute de 75.5% vs 65.9% respectivement, $p=0,01$; survie sans métastase de 81.8% vs 71.2% respectivement, $p=0.004$) [64]. Néanmoins, à l'heure actuelle et depuis les années 2000, l'évaluation du statut HER2 est surtout pratiquée pour sa valeur prédictive très importante. En

effet, sur le plan prédictif, la détermination du statut HER2 dans le cancer du sein est devenue un enjeu primordial depuis l'avènement du trastuzumab (Herceptin®), anticorps de souris humanisé ciblant spécifiquement les cellules surexprimant HER2. Initialement réservée au stade métastatique, cette thérapie ciblée anti-HER2 est désormais prescrite aux patientes présentant un cancer du sein HER2+ en phase adjuvante, en association à la chimiothérapie, suite aux résultats spectaculaires de 3 grands essais cliniques (HERA, NSABP B31, Intergroup N9831) avec 50% d'amélioration de la survie sans récurrence [66, 67].

A.6.11 LE SOUS-TYPE MOLECULAIRE

Les tumeurs de phénotype Luminal A sont des tumeurs de meilleur pronostic que toutes les autres catégories moléculaires de cancer du sein et en particulier des tumeurs de phénotype Luminal B [12, 20-22, 24]. On sait que l'association entre le statut RE et la mortalité dans le cancer du sein est liée au temps avec des hazard ratios entre les tumeurs RE+ et les tumeurs RE- inférieurs à 1 dans les premières années après le diagnostic de cancer du sein et devenant supérieurs à 1 après 7 à 10 ans [68, 69]. La mortalité des patientes présentant un cancer du sein RE+ est relativement constante dans le temps alors qu'elle est initialement élevée dans les six premières années et diminue de manière importante après pour les tumeurs RE-, en particulier les triples négatives. Dans leur méta-analyse publiée en 2008 compilant les profils transcriptomiques de neuf jeux de données et regroupant plus de 2 100 patientes, Desmedt et coll. ont montré que les processus biologiques impliqués dans l'évolution clinique des cancers du sein étaient différents selon le sous-type moléculaire [70]. Dans les cancers de phénotype Luminal, c'est l'activation des gènes liés à la prolifération cellulaire qui explique les différences pronostiques observées. L'application pratique de ce concept en pathologie mammaire de routine est la détermination systématique du grade histologique, du compte mitotique et de l'index de prolifération Ki67 pour tout carcinome infiltrant du sein.

B. HER2

B.1 BIOLOGIE DE HER2

En 1985, plusieurs équipes ont isolé indépendamment le même oncogène. Elles l'ont appelé simultanément *HER2* (pour Human Epidermal growth factor Receptor 2) et *c-erbB2* à cause de ses similitudes avec le gène du récepteur de l'Epidermal Growth Factor (R-EGF) et avec l'oncogène *v-erbB* du virus de l'érythroblastose aviaire [71-73]. *HER2* est aussi l'homologue humain du gène *NEU*, isolé de cellules de neuroglioblastomes induits chez le rat par l'éthyl-nitroso-urée. La dénomination internationale officielle du gène *HER2* est *ERBB2*. Le gène *HER2* est situé au niveau du bras long du chromosome 17 (17q11.2-q12). Il est composé de 30 528 paires de bases et comporte 27 exons de 4 477 paires de bases au total. Il est naturellement présent en deux exemplaires par noyau.

Le produit de l'oncogène *HER2* est une glycoprotéine transmembranaire de la famille des récepteurs de type I des facteurs de croissance. Elle est composée de 1 255 acides aminés et pèse 185 kDa. Elle comprend trois domaines distincts. Le domaine extracellulaire se compose lui-même de quatre régions. Les deux zones riches en résidus cystéine (sous-domaines II et IV) contribuent à l'agencement spatial de la protéine. Les sous-domaines I et III correspondent aux sites de fixation du ligand. C'est aussi au niveau du domaine extracellulaire que se situent les sites de glycosylation de la protéine. Le domaine transmembranaire, très hydrophobe, permet l'ancrage du récepteur dans la membrane plasmique. Le domaine intracellulaire comprend le domaine à activité tyrosine kinase où se trouvent le site de fixation de l'ATP indispensable à l'activité catalytique, et un domaine C terminal où sont groupés des sites d'autophosphorylation (résidus tyrosine) participant à la signalisation intracellulaire (Figure 4).

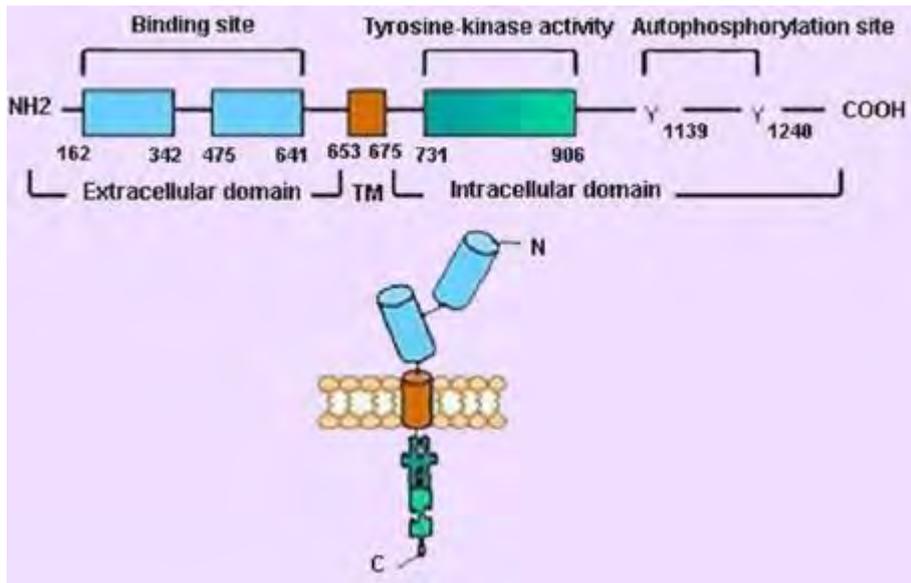


Figure 4 : Structure primaire et tertiaire de la protéine HER2

La famille des récepteurs de type I des facteurs de croissance comporte quatre membres : HER1/EGFR, HER2, HER3 et HER4 [74, 75]. Pour trois d'entre eux, les ligands sont connus. Il s'agit du TGF α , de l'EGF, de l'heparin binding EGF-like growth factor, des neurégulines (1-4), de l'amphiréguline, de l'épiréguline et de la bêtacelluline. Seul HER2 n'a pas de ligand identifié à ce jour. Quand un de ces ligands se fixe sur son récepteur, il provoque sa dimérisation, la stimulation de son activité kinase et l'autophosphorylation de résidus tyrosine. Pour un récepteur donné, chacun de ses ligands est associé à un profil de phosphorylation particulier ; le récepteur peut de cette manière faire la discrimination entre ses ligands. Les phosphotyrosines servent de sites de reconnaissance pour des protéines intracellulaires à l'origine de l'activation des voies de signalisation. Ces sites sont propres à chaque récepteur et un site donné interagit spécifiquement avec une protéine de signalisation intracellulaire [76]. Les deux grandes voies de signalisation associées aux récepteurs de la famille HER sont les voies Ras/Raf/MAPK et PI3K/Akt/mTOR qui régulent la prolifération et la survie cellulaire, respectivement.

Les dimères induits par la fixation d'un ligand sont constitués de deux récepteurs identiques (homodimères) ou différents (hétérodimères). Deux des dix combinaisons possibles présentent une particularité. Les homodimères de HER3 ne sont pas fonctionnels puisque leur kinase est déficiente. Les homodimères de HER2 ne sont induits par aucun ligand. L'absence de ligand spécifique de HER2 n'est pourtant pas un obstacle à son activation : elle est provoquée par les ligands de HER1/EGFR, HER3 et HER4, *via* la formation d'hétérodimères. En fait, HER2 est un corécepteur commun à tous ces ligands qui possèdent un site de basse affinité pour HER2 en plus du site de haute affinité pour leur(s) récepteur(s) spécifique(s). HER2 présente la particularité d'une conformation propice à la dimérisation en l'absence de ligand, ce qui en fait le

partenaire préféré des autres récepteurs HER. Même si HER3 est son partenaire privilégié, HER1/EGFR et HER4 forment également des hétérodimères préférentiellement avec HER2 et cette propriété est accrue par la surexpression de HER2 [77]. Les signaux extracellulaires transmis par le biais de ces hétérodimères sont beaucoup plus puissants essentiellement pour deux raisons [78]. HER2 diminue la vitesse de dissociation du ligand, ce qui prolonge la durée du signal. De plus, la présence de HER2 au sein d'un hétérodimère ralentit son internalisation et favorise son recyclage à la surface de la cellule au lieu de sa dégradation. Dans les cellules où il est exprimé à un niveau faible, les hétérodimères contenant HER2 sont peu nombreux. Les signaux qu'ils transmettent sont faibles, contrôlables, et la croissance cellulaire est normale.

Après cette introduction biologique, nous allons aborder la physiopathologie en décrivant notamment les phénomènes aboutissant à la surexpression protéique de HER2, notamment *via* l'amplification du gène *HER2*.

B.2 AMPLIFICATION DU GÈNE *HER2*

Dans certains cancers, il existe une activation anormale de l'oncogène *HER2* sous-tendue par différents mécanismes : mutation activatrice ou amplification du gène *HER2*, qui se traduit ou non par une surexpression protéique détectable par IHC.

Les mutations activatrices concernent environ 20% de l'ensemble des altérations de *HER2* mises en évidence au sein des tumeurs chez l'homme [79, 80]. Deux grands types de mutations activatrices de *HER2* ont été mis en évidence en cancérologie humaine, concernant soit le domaine extracellulaire du récepteur, soit le domaine tyrosine kinase. Ces mutations sont mutuellement exclusives. Leur caractère oncogénique a été prouvé *in vitro* et *in vivo*. Les mutations du domaine extracellulaire affectent le sous-domaine II du récepteur, modifie sa conformation et permet la formation de dimères HER2 constitutivement actifs [81]. On rencontre ce type de mutation dans 1 à 2% des cancers du sein et des cancers bronchiques et dans 40% des carcinomes urothéliaux micropapillaires. Les mutations du domaine tyrosine kinase affectent préférentiellement les exons 19 et 20 du gène *HER2*. Elles se traduisent par un changement de conformation de la région de la liaison à l'ATP du domaine tyrosine kinase et par une augmentation de son activité. On rencontre ce type de mutation dans 2 à 4 % des cancers du sein et des cancers bronchiques ainsi que dans certains cancers urothéliaux, ovariens et gastriques et dans certains glioblastomes et cholangiocarcinomes [82]. Parmi les cancers du sein, ce sont les carcinomes lobulaires infiltrants qui sont le plus souvent concernés par des mutations activatrices de *HER2* [34, 79, 83, 84]. Dans une majorité des cas, il n'y a pas de surexpression protéique associée aux mutations activatrices de *HER2*. Cependant, dans certains

cas, elles sont associées à des amplifications du gène *HER2* aboutissant à une surexpression protéique de la protéine HER2 [79]. D'autres mutations de *HER2* ont été mises en évidence, en particulier au niveau du domaine transmembranaire et de la queue cytoplasmique du récepteur, mais la récurrence de ces mutations en pratique clinique n'a jamais été montrée, et leur caractère oncogénique est incertain.

L'amplification du gène *HER2* est le mécanisme majoritaire des altérations de HER2 dans les tumeurs humaines. Cette amplification concerne le gène *HER2* et les gènes qui l'entourent sur le bras long du chromosome 17, tels que *STARD3*, *GRB7*, *PNMT* ou *PERLD1* [85, 86]. Si l'amplification d'*HER2* est décrite dans de nombreux types de cancers, elle n'est recherchée en pratique clinique que dans les cancers du sein et dans les cancers gastriques. L'amplification est une multiplication localisée, spécifique, du nombre de copies d'un gène ou d'un petit nombre de gènes adjacents (on parle dans ce cas d'amplicon), indépendamment des régions chromosomiques voisines. Ces amplifications forment, en règle, des amas de copies du gène dans les noyaux interphasiques. L'amplification génique dans les cancers est probablement initiée au niveau de cassures double-brin et ne se produirait que dans des cellules ayant déjà acquis la capacité de progresser dans le cycle cellulaire malgré les dommages à l'ADN. Les mécanismes de l'amplification génique restent largement méconnus. On en décrit trois modes : les doubles minutes correspondant à des copies de gènes extra-chromosomiques ; les répétitions en tandem au sein d'un chromosome formant des amas homogènes cytologiquement visibles appelés HSR (Homogeneously Staining Region) ; et des copies du gène dispersées au sein du génome [87]. Dans le cancer du sein, les répétitions en tandem représenteraient environ 70% des phénomènes d'amplification du gène *HER2*, les 30% restant correspondant à des chromosomes double minutes [88].

L'amplification d'*HER2* s'accompagne d'une surexpression de niveau élevé, c'est-à-dire d'une augmentation du nombre de récepteurs à la surface des cellules tumorales. Celle-ci peut être mise en évidence par IHC. Dans les cellules cancéreuses qui surexpriment HER2, les ligands des récepteurs de type I induisent préférentiellement la formation des hétérodimères contenant HER2 dont découlent des signaux mitotiques très puissants [89]. La stimulation de l'activité mitotique résulterait d'une activation de la transcription des cyclines D et d'une augmentation de leur stabilité; mais aussi dans le cas des dimères HER2-HER3, d'une activité accrue du complexe cycline E/cdk2, principal régulateur de la transition entre les phases G1 et S du cycle cellulaire [76, 89]. Les cellules qui surexpriment HER2 ont une croissance tumorale accélérée et une fréquence plus élevée de récurrence et d'évolution vers des métastases.

En conclusion, l'amplification génique est le mécanisme à l'origine de la surexpression de la protéine dans les cancers. Une tumeur de statut HER2 positif peut donc être définie par le fait soit qu'elle exprime à un niveau élevé la protéine HER2, soit qu'elle présente une amplification du gène.

B.3 LES CANCERS DU SEIN AVEC AMPLIFICATION DE *HER2*

Les tumeurs *HER2* amplifiées représentent 10 à 15% de l'ensemble des cancers du sein, caractérisées par une surexpression de HER2 due à l'amplification du gène *HER2*. L'existence d'une amplification récurrente de l'oncogène *HER2* dans les cancers du sein a été découverte par D.J. Slamon en 1987 [90]. La survenue de l'amplification de *HER2* était alors associée à une évolution défavorable de la maladie.

B.3.1 TAUX DE SUREXPRESSON DE *HER2* DANS LES CARCINOMES MAMMAIRES

Dans le tissu mammaire normal ou hyperplasique (y compris dans les hyperplasies atypiques), l'expression de HER2 est basale (non détectable en IHC). Dans les lésions de carcinome in situ, la surexpression de HER2 est retrouvée dans 3% des lésions de bas grade, 20% des lésions de grade intermédiaire et 70% des lésions de haut grade nucléaire [91]. Cependant, à l'heure actuelle, l'évaluation du statut HER2 ne tient pas compte de ces lésions de carcinome in situ et ne repose que sur l'évaluation du contingent de carcinome infiltrant. Dans les cancers infiltrants, 9 à 30 % des cancers du sein présentent une surexpression de HER2 [42, 64, 92, 93]. Les taux de surexpression de HER2 sont différents en fonction du stade, de la taille, du grade, du statut ganglionnaire axillaire et du type histologique du carcinome infiltrant. Le taux de surexpression moyen (scores 3+ et 2+ amplifiés) des tumeurs T1a-T2 de moins de 3 cm est de 9 à 13% [94-96]. La surexpression 3+ de HER2 en IHC est retrouvée dans 30% des carcinomes micropapillaires, 5% des carcinomes lobulaires, moins de 4% des carcinomes mucineux et 0% pour les carcinomes tubuleux.

B.3.2 APPROCHE MOLECULAIRE DES CARCINOMES MAMMAIRES *HER2* AMPLIFIES

Les carcinomes *HER2* amplifiés ont fait l'objet, ces 10 dernières années, de nombreuses analyses génomiques, phénotypiques et transcriptomiques. Il paraît maintenant clair que plusieurs types de carcinomes *HER2* amplifiés existent, définis par le statut des RE, le type d'altérations génomiques associées ou la nature du stroma. L'amplification de *HER2* est associée dans environ 50% des cas à l'absence d'expression des RE. Les carcinomes *HER2* amplifiés et RE- présentent une expression forte de nombreux gènes de prolifération ; ils sont pour la plupart de grade III et

ont un taux de mutation du gène *TP53* de l'ordre de 75% [21, 22]. Ils sont également caractérisés par une nette surexpression en ARN de *HER2* et d'autres récepteurs à activité tyrosine kinase tels que *FGFR* et *EGFR*. Dans les analyses non supervisées des données transcriptomiques, les carcinomes *HER2* amplifiés, avec ou sans expression des RE, forment deux clusters distincts, mais les carcinomes RE+ sont mêlés à ceux de type luminal B [21, 22]. Ces carcinomes de type luminal B *HER2* amplifiés sont caractérisés par des altérations portant sur *GATA3*, *ESR1* ou *BCL2*. Il faut également noter que les tumeurs *HER2* amplifiées avec RE+ ne présentent une positivité des RP que dans 25% des cas [94, 97]. Les profils génomiques des carcinomes *HER2* amplifiés sont en particulier caractérisés par d'autres régions d'amplification situées, par exemple, sur la partie plus télomérique du bras long du chromosome 17 ou sur d'autres chromosomes (8q, 11q, etc.) [86, 98]. Récemment, il a été montré que les carcinomes *HER2* amplifiés, qu'ils soient associés ou non à l'expression des RE, appartiennent à l'entité moléculaire apocrine, caractérisée entre autres, par de nombreuses altérations de nombre des chromosomes et par l'expression des RA [99]. Les carcinomes *HER2* amplifiés forment également deux groupes de pronostic différent en fonction de la richesse en lymphocytes de leur stroma. Les tumeurs *HER2* amplifiées associées à une signature transcriptomique immune et dont le stroma présente un fort infiltrat lymphocytaire ont un meilleur pronostic et une meilleure réponse au traitement néoadjuvant [100].

B.3.3 STABILITE DU TAUX DE HER2 ENTRE LA TUMEUR PRIMITIVE ET LES METASTASES

Entre 1988 et 2012, plus de 30 études ont analysé la stabilité des RH et de *HER2* entre les sites primaires et secondaires. Des variations de statut de *HER2* sont rapportées chez 7,7% des patients en cas de métastases ganglionnaires et viscérales et dans 7,1% des cas si seules les métastases viscérales sont considérées [101-103]. En pratique, la détermination du statut *HER2* est réalisée sur la tumeur primitive pour ajuster le traitement adjuvant (après la chirurgie). Si l'indication de traitement anti-*HER2* est posée devant une situation clinique métastatique, il est souhaitable de planifier une biopsie de la lésion métastatique, si elle est accessible cliniquement, afin d'évaluer le statut de *HER2* dans les cellules métastatiques ainsi que le statut des RH.

B.3.4 HETEROGENEITE INTRATUMORALE DU STATUT DE HER2

La surexpression de *HER2* est, la plupart du temps, homogène pour toutes les cellules tumorales. Néanmoins, certains cas "hétérogènes" montrent la coexistence de deux contingents intratumoraux, l'un surexprimant *HER2* avec une intensité forte et un marquage complet, l'autre complètement négatif. En accord avec des groupes d'experts [104, 105], les nouvelles recommandations distinguent deux types d'hétérogénéité intratumorale. L'hétérogénéité zonale

correspond à une population de cellules amplifiées contiguës nettement visible en IHC et arborant parfois une architecture ou un grade distinct. L'hétérogénéité cellule à cellule correspond à des cellules amplifiées dispersées en mosaïque au sein de cellules non amplifiées. Certaines équipes prétendent que ce deuxième type d'hétérogénéité n'existerait pas vraiment et serait en réalité un artefact dû à la technique d'hybridation in situ, mais cette donnée reste controversée (Figure 5) [106-109].

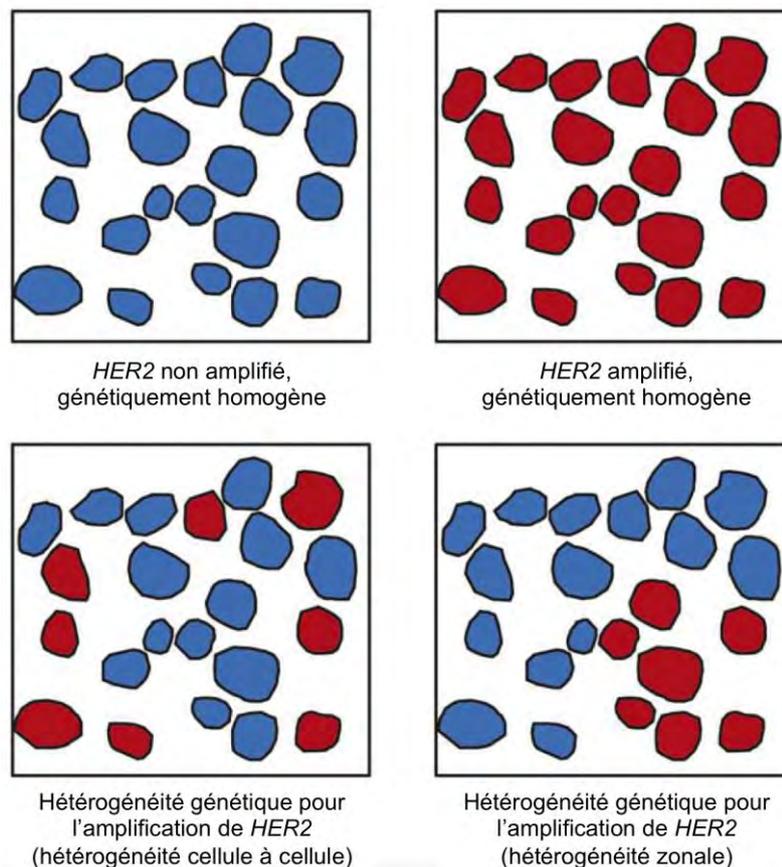


Figure 5 : Représentation schématique des différents profils d'amplification du gène *HER2* dans les cancers du sein (adapté de Hanna et coll. 2014)

On ne prendrait en compte, pour le traitement, que la première catégorie d'hétérogénéité. Les cas d'amplification hétérogène de *HER2* sont relativement fréquents. Ils représenteraient entre 5 et 25% des cas de cancers du sein avec amplification de *HER2* [110-112]. Ils ont une importance clinique majeure pour au moins deux raisons. Premièrement, l'hétérogénéité tumorale peut aboutir à des discordances de statut de *HER2* entre différents blocs d'une même tumeur, entre une biopsie et la pièce opératoire, entre la tumeur primitive et ses métastases, entre les résultats de différents laboratoires et entre les résultats d'IHC et d'hybridation in situ [108]. A ce titre, les recommandations insistent sur la nécessité de tester, le cas échéant, les éventuelles métastases ganglionnaires axillaires ou viscérales avant toute décision de traitement anti-*HER2* [105].

Deuxièmement, sur l'impact de sous-populations tumorales *HER2* amplifiées au sein de tumeurs par ailleurs non amplifiées pour l'évaluation du pronostic et du bénéfice potentiel des thérapies ciblées anti-*HER2*. Ce point sera discuté dans le chapitre relatif aux traitements anti-*HER2*.

B.4 THERAPIES CIBLEES ANTI-HER2

B.4.1 HISTORIQUE

Dès 1988, un an après la mise en évidence d'une amplification récurrente de l'oncogène *HER2* dans les cancers du sein par D.J. Slamon, les immunologistes développent un anticorps de souris qui se lie à *HER2* et l'inactive. D.J. Slamon démontre alors la preuve du concept dans les lignées cellulaires et les xénogreffes. En 1989, Michael Shepard, immunologiste chez Genentech, améliore la production et la purification de l'anticorps anti-*HER2*. Mais le défi, pour que cet anticorps devienne un médicament, est l'humanisation [113]. Ce procédé est accompli par Paul Carter en 1990 [114]. Le trastuzumab vient de naître.

En 1990, D.J. Slamon lance le premier essai clinique du trastuzumab, en association avec le cisplatine, chez des patientes lourdement prétraitées [115]. Des réponses inattendues et de longues rémissions sont observées. D'autres essais de phase II suivent, au Memorial Sloan Kettering Cancer Center de New York, à l'université de Californie et San Francisco et à l'UCLA, à Los Angeles. En 1995, Genentech initie un essai de phase III en première ligne métastatique, qui compare une chimiothérapie standard à la même chimiothérapie associée au trastuzumab. Il s'agit d'un essai mondial incluant 499 patientes en moins de deux ans dans 150 centres. Les résultats de cette étude pivotale sont présentés par D.J. Slamon au congrès américain en oncologie clinique de 1998 : le trastuzumab augmente de façon très significative le taux de réponse, la survie sans progression et la survie globale [116]. Les essais adjuvants sont lancés en 2001 (essai pivotal HERA). Au congrès américain en oncologie clinique de 2005, lors d'une session spéciale, les résultats de trois essais sont présentés (un essai européen : l'essai HERA, et deux essais américains NSABP-B38 et NCCTG-N9831), suscitant une réaction enthousiaste et un tonnerre d'applaudissements : le trastuzumab permet de réduire le taux de récurrences avec une amplitude rarement observée dans les essais adjuvants. Ces données sont rapidement publiées dans le *New England Journal of Medicine* et, dans un éditorial, Gabriel Hortobagyi évoque des résultats stupéfiants [117]. Selon lui, il ne s'agit pas d'une évolution dans les traitements, mais d'une révolution. D'autres cibles et d'autres agents allaient suivre. Il ne se trompait pas : il ne s'agissait que du premier chapitre d'une belle histoire.

En 2005, les études cliniques ont donc confirmé que le trastuzumab améliorait très significativement le pronostic des patientes atteintes d'un cancer du sein *HER2+*, que ce soit à un

stade précoce ou avancé. Le trastuzumab représente la clé de voûte de la prise en charge des cancers du sein HER2+. Cependant, malgré ces excellents résultats, certaines patientes présentent des rechutes après un traitement adjuvant bien conduit et, de façon presque inexorable, des métastases finissent par apparaître dans des délais variables. Malgré ces progressions et ces rechutes, le récepteur HER2 reste une cible pertinente pour de nouvelles stratégies.

La dernière décennie a été marquée par l'apparition de nouvelles molécules ciblant le récepteur HER2 : le lapatinib et le pertuzumab, d'une part, permettent une meilleure inhibition de la cible selon le concept de double blocage ; et, d'autre part, un ancien concept revisité, un anticorps drogue-conjugué, le trastuzumab emtansine (T-DM1), libère la chimiothérapie au niveau des cellules qui surexpriment HER2. Ces nouveaux médicaments ont permis une amélioration de la survie des patientes souffrant de cancers du sein métastatiques et ont été enregistrés dans cette indication.

Parallèlement au ciblage direct du récepteur HER2, d'autres approches sont développées : ciblage des voies de signalisation d'aval (PI3K/AKT/mTOR) et des autres voies de signalisation (RH, VEGF). Enfin, ces dernières années, l'approche immunologique a connu un regain d'intérêt avec les résultats des inhibiteurs de checkpoints dans les mélanomes et les cancers pulmonaires. Dans les cancers du sein HER2+, il existe de nombreuses approches, utilisant aussi bien des vaccins que des associations d'anticorps.

B.4.2 MECANISMES D'ACTION DES THERAPIES CIBLEES ANTI-HER2

Les thérapies ciblées anti-HER2 sont toujours couplées à une chimiothérapie conventionnelle dans la prise en charge des cancers du sein HER2+. Nous allons détailler ici les principales molécules utilisées pour cibler HER2 dans les cancers du sein.

a. Le trastuzumab

Le trastuzumab est un anticorps monoclonal ayant la capacité d'inhiber le récepteur HER2 en reconnaissant, par son fragment Fab (Fragment antigen binding), un épitope situé sur la portion extra-membranaire du récepteur, au niveau du domaine IV [118]. Le mode d'action précis du trastuzumab n'est pas clairement connu mais plusieurs mécanismes sont proposés. L'action du fragment Fab du trastuzumab, lorsqu'il se fixe sur HER2, peut partiellement limiter la dimérisation de HER2 avec un autre partenaire [119]. En conséquence, les voies de signalisation sous-jacentes au récepteur se trouvent inhibées [120]. Il a également été rapporté que le trastuzumab inhibe p27, qui est un inhibiteur des CDK (Cyclin-Dependant Kinases), inhibant ainsi la progression dans le cycle cellulaire et la croissance tumorale [120]. Un autre mode

d'action présumé du trastuzumab se fait par l'intermédiaire de la réponse immune anti-tumorale. En effet, son fragment Fc a la capacité de recruter les cellules effectrices de l'immunité innée, porteuses d'un récepteur Fcγ, afin de déclencher une lyse cellulaire par ADCC (Antibody-Dependant Cellular Cytotoxicity) [121]. De plus, le trastuzumab forme des complexes avec HER2 qui sont internalisés avant d'être rapidement dégradés. Les fragments de HER2 sont ensuite présentés via le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I aux lymphocytes T cytotoxiques, qui provoquent alors la lyse de la cellule tumorale. Le trastuzumab aurait également la capacité de réduire la population de lymphocytes T régulateurs qui ont la capacité d'inhiber la réponse T cytotoxique [122]. Le trastuzumab aurait également la capacité d'inhiber la protéolyse du récepteur HER2 afin d'empêcher le clivage de la portion extramembranaire du récepteur et d'éviter ainsi la formation d'une protéine tronquée HER2 constitutionnellement active.

b. Le pertuzumab

Le pertuzumab est un anticorps monoclonal dirigé contre le domaine de dimérisation de HER2 (domaine II). Le pertuzumab n'est pas utilisé seul. Il est systématiquement utilisé en association avec une autre thérapie ciblée anti-HER2, et notamment avec le trastuzumab. L'étude de phase III CLEOPATRA a montré un bénéfice majeur en termes de survie globale en faveur du double blocage (pertuzumab + trastuzumab) associé au docétaxel en première ligne des cancers du sein métastatiques HER2+ [123, 124].

c. Le lapatinib

Le lapatinib est un inhibiteur réversible de la tyrosine kinase de HER1/EGFR et de HER2. Cette petite molécule inhibitrice entre en compétition avec l'ATP au niveau du site kinase catalytique et prévient la phosphorylation des résidus tyrosine et la signalisation d'aval. Il faut ajouter l'afatinib et le nératinib à cette famille de molécules, qui sont des inhibiteurs de tyrosine kinase de deuxième génération. A l'heure actuelle, parmi ces molécules, seul le lapatinib a une autorisation de mise sur le marché pour le traitement du cancer du sein HER2+ métastatique.

d. Le T-DM1

Il s'agit de l'association du trastuzumab, anticorps monoclonal, avec une molécule cytotoxique puissante ciblant les microtubules : le DM1 ou maytansine. Le DM1 est inactivé dans sa forme conjuguée mais, une fois libéré dans la cellule, il devient hautement cytotoxique. Le trastuzumab est utilisé comme un cheval de Troie qui apporte la molécule cytotoxique au sein des cellules cancéreuses HER2+, permettant leur destruction sélective. Il en résulte une thérapie très efficace et bien tolérée des cancers du sein HER2+ métastatiques [125, 126].

C. EVALUATION DU STATUT HER2

C.1 INTRODUCTION SUR LES NOUVELLES RECOMMANDATIONS

Conscients de leur responsabilité dans le diagnostic des cancers du sein HER2+, les pathologistes de plusieurs pays ont travaillé à standardiser les critères d'amplification de l'oncogène *HER2* et de surexpression de la protéine HER2 [105, 127-129]. Nous nous baserons principalement ici sur les dernières recommandations du Groupe d'étude des facteurs pronostiques immunohistochimiques dans le cancer du sein (GEFPICS), elles-mêmes inspirées des nouvelles recommandations ASCO®/CAP [104, 105]. Ces recommandations ont pour objet d'éviter au maximum les faux négatifs du test HER2 (dus principalement à une mauvaise préparation des tissus), à l'opposé des recommandations de 2007 qui visaient à pallier le risque de faux positifs (en partie dû à l'interprétation des tests) [130]. Néanmoins, à la lecture des données d'études avec relecture centralisée du statut de HER2, comme cela a été le cas pour l'étude ALTTO, force est de constater que le taux de faux positifs retrouvé lors de la relecture centralisée varie toujours de 6 à 14% [131]. Assurer la qualité et la fiabilité des tests HER2 reste donc, en 2016, un important défi pour les pathologistes.

Les changements notables des recommandations portent sur :

- La phase pré-analytique (type de prélèvements, de fixateur, procédé de fixation et de préparation des tissus, lames blanches) ;
- La phase analytique (introduction des techniques d'hybridation in situ non fluorescentes) ;
- La phase post-analytique (modification des seuils de positivité pour l'IHC et l'hybridation in situ, modification de la définition du score 2+, algorithmes décisionnels, situations de « possibles discordances », recommandations pour les comptes rendus des résultats).

Ces recommandations s'adressent également aux oncologues, ainsi qu'aux patients pour leur information. Le statut « éligible au traitement par anti-HER2 » est défini sur des critères précis, dans des situations où le résultat du test est équivoque, ni clairement positif ni clairement négatif. Elles insistent enfin sur la nécessité de mettre en place un programme de contrôle qualité des techniques d'analyse au sein des laboratoires effectuant des tests HER2.

C.2 INDICATIONS DE L'EVALUATION DU STATUT HER2

C.2.1 STADE INITIAL DE LA MALADIE

Une première détermination du statut HER2 doit être réalisée pour tous les cancers du sein

infiltrants au diagnostic, et de préférence sur une microbiopsie, sans restriction concernant l'âge de la patiente ou le type histologique. Lorsque le résultat du test sur microbiopsie est négatif dans les cas de carcinome infiltrant de grade I, RH positifs et dans certains types histologiques particuliers (tubuleux, mucineux, cribriforme, adénoïde kystique, lobulaire classique), il n'est pas nécessaire de tester à nouveau le statut HER2 sur les pièces opératoires. Il est recommandé d'effectuer un nouveau test sur pièce opératoire si le test effectué sur microbiopsie est négatif mais qu'il existe une discordance avec le diagnostic anatomopathologique sur la pièce opératoire, ou en cas de doute sur la représentativité ou la qualité de la biopsie, ou en cas de résultat ambigu après deux tests sur la microbiopsie.

Cependant, il faut éviter d'évaluer le statut HER2 sur pièce opératoire après une chimiothérapie néoadjuvante contenant des taxanes. En effet les taxanes, en inhibant la dépolymérisation des microtubules, induisent une polyploïdie dans certains noyaux par un mécanisme d'endoreduplication. Ce phénomène aboutit à une multiplication de multiples régions du génome pouvant en imposer pour une amplification génique en hybridation in situ [132, 133]

C.2.2 STADE METASTATIQUE

Dans la littérature, plusieurs séries ont montré un changement de statut de HER2 entre la tumeur primitive et les métastases. Cette apparente discordance va jusqu'à 15% des cas testés [134]. Compte tenu de ces données, beaucoup recommandent de biopsier de façon systématique au moins une localisation métastatique (lorsque le geste est techniquement possible). Cette recommandation doit néanmoins être tempérée par le risque lié au geste biopsique. Par exemple, 2% d'incidents graves ont été observés dans l'étude prospective française SAFIRO1, pourtant réalisée dans des centres spécialisés [135]. L'indication de pratiquer une nouvelle biopsie lors de la rechute métastatique doit être discutée au cas par cas en réunion de concertation pluridisciplinaire et avec la patiente. Cette recommandation impose des contraintes importantes pour les équipes cliniques, notamment les préleveurs et les pathologistes. Il faut que la métastase soit accessible à la biopsie, que le geste ne soit pas médicalement contre-indiqué et que la patiente ait donné son accord. Il est possible aussi de tester une nouvelle fois la tumeur primitive ou les ganglions métastatiques, surtout si le test a été réalisé plus de 5 ans auparavant.

C.2.3 FREQUENCE DE POSITIVITE ATTENDUE

Les recommandations ASCO®/CAP 2013 ne suggèrent pas de seuil de positivité attendu pour HER2. Néanmoins, il est rapporté dans la littérature que le taux moyen de positivité de HER2 est compris entre 11 et 20%, avec des pourcentages plus faibles pour les tumeurs de petite taille. Le

taux moyen de cas HER2+ en France est de $12,12 \pm 0,8\%$ selon l'étude HERFrance [136].

C.2.4 PHASE PRE-ANALYTIQUE

Pour assurer la fiabilité des résultats des techniques d'IHC et d'hybridation in situ, les laboratoires devraient effectuer un volume minimal annuel de tests établi à 250 pour l'IHC et à 100 pour l'hybridation in situ. Ces seuils sont donnés à titre indicatif et ne sont pas opposables à l'heure actuelle. L'utilisation de témoins négatifs et positifs pour chaque test, ainsi que la participation à des programmes d'évaluation externe de la qualité portant sur ces tests sont vivement recommandés. La préconisation de grands volumes de tests permet de garantir une expertise technique et analytique suffisante et de travailler dans des conditions rentables financièrement en raison des coûts inhérents à chaque technique (automates, réactifs à délai de péremption court, utilisation de témoins et mobilisation de personnel technique).

La qualité des tests implique les préleveurs – radiologues, chirurgiens, oncologues –, qui doivent être informés de l'importance du bon conditionnement des prélèvements pour la réussite des techniques d'IHC et d'hybridation in situ. Notamment, le temps d'ischémie froide ne doit pas excéder 10 minutes pour les microbiopsies et une heure pour les pièces opératoires. Le fixateur de référence est le formol neutre tamponné à 10%. Les pièces opératoires doivent être tranchées tous les centimètres pour permettre un contact immédiat du formol avec la tumeur. La durée de fixation doit être comprise entre 6 et 72h. Ces conditions rendent nécessaire une optimisation des circuits d'acheminement des échantillons depuis les lieux de prélèvement jusqu'aux laboratoires. En ce qui concerne les automates de déshydratation et d'inclusion, il faut, pour les programmes du week-end, privilégier un départ différé le dimanche soir. Les températures d'imprégnation en paraffine des fragments et de séchage des coupes tissulaires ne doivent pas dépasser 60°C. Enfin, il faut réaliser les techniques sur les coupes fraîches de moins de deux semaines. Un contrôle rigoureux de ces étapes pré-analytiques est un prérequis absolu pour la réalisation de tests fiables [137, 138]. Depuis plusieurs années, des actions de sensibilisation des différents acteurs impliqués ont été mises en place, avec succès.

C.2.5 GENERALITES SUR LA PHASE ANALYTIQUE

Les deux méthodes recommandées actuellement sont l'IHC et l'hybridation in situ sur coupes fixées au formol et incluses en paraffine. Elles présentent une grande spécificité puisqu'elles permettent une visualisation directe du signal recherché au niveau des cellules carcinomateuses infiltrantes. Les techniques moléculaires par des tests commerciaux de RT-PCR ou puces pangénomiques sont réservées aux projets de recherche.

En France, la technique d'IHC est la plus répandue et sert à sélectionner les patientes en

première intention. Seuls les cas équivoques sont actuellement vérifiés par une technique d'hybridation in situ. Comme l'IHC, les techniques d'hybridation in situ colorimétriques chromogéniques ou argentiques permettent un bon contrôle morphologique du tissu [108], le statut HER2 devant être évalué dans le seul contingent infiltrant. Les kits et les automates d'IHC sont préconisés pour limiter au maximum le risque de variation technique.

C.2.6 CRITERES D'INTERPRETATION DE L'IMMUNOHISTOCHEMIE ET CONDUITE A TENIR

Les scores 0 et 1+ en IHC permettent de conclure à une tumeur HER2 négative pour laquelle il n'y a pas d'indication à traiter la patiente par thérapie ciblée anti-HER2. Le score 3+ permet de conclure à une tumeur HER2 positive pour laquelle un traitement anti-HER2 est indiqué. Le score 2+ rassemble les cas pour lesquels l'IHC seule ne permet pas de conclure. Dans ces cas 2+ où la surexpression de HER2 n'est pas franche, une évaluation du statut *HER2* par hybridation in situ est nécessaire.

Le seuil définissant un score 3+ est maintenant fixé à plus de 10% de cellules tumorales avec un marquage membranaire complet et intense, au lieu de 30% auparavant [105]. Par ailleurs, pour le périmètre du score 2+, les nouveaux critères du GEPICS explicitent les marquages modérés et faibles selon qu'ils sont perceptibles ou non au grossissement x4-x5. Le marquage membranaire est complet modéré, visible au faible grossissement (x4-x5) dans plus de 10% des cellules. Il peut également s'agir d'un cas hétérogène avec un marquage complet et intense dans 10% ou moins des cellules tumorales. Le marquage membranaire incomplet basolatéral tel qu'on peut l'observer, par exemple, dans les carcinomes micropapillaires correspond à un marquage membranaire en "U" épargnant le pôle apical des cellules. Ce marquage, classé 2+ par les nouvelles recommandations, doit inciter à pratiquer une technique d'hybridation in situ complémentaire s'il est d'intensité modérée ou forte. Ces critères sont rassemblés dans le Tableau 5.

Tableau 5 : Critères de positivité du statut HER2 par immunohistochimie (actualisé selon les recommandations ASCO®/CAP 2013 et GEPFICS 2014) [104, 105]

Score	Marquage	Interprétation	Indication à un traitement anti-HER2
0	Absence de cellules marquées <i>ou</i> Marquage membranaire complet ou incomplet modéré ou faible $\leq 10\%$ cellules	négatif	non
1+	Marquage membranaire complet ou incomplet faible $> 10\%$ cellules	négatif	non
2+	Marquage membranaire complet modéré $>10\%$ cellules <i>ou</i> Marquage membranaire complet fort $\leq 10\%$ cellules <i>ou</i> Marquage membranaire incomplet basolatéral modéré à fort $> 10\%$ cellules	cas à vérifier	Evaluation du statut HER2 par hybridation in situ avant décision thérapeutique
3+	Marquage membranaire complet fort $>10\%$ de cellules marquées et marquage membranaire complet fort	positif	oui

Les nouvelles recommandations définissent également la notion d'immunomarquage non interprétable permettant de ne pas conclure à un test HER2 :

- En raison de problèmes techniques ne permettant pas de le classer dans l'une des quatre catégories précédentes ;
- En cas de marquage des glandes mammaires normales (risque de faux positif) ;
- En cas d'artefacts tissulaires, tels que l'écrasement lié aux pinces de biopsie ou la polarisation liée au bistouri électrique (risque de faux positif ou de faux négatif).

C.2.7 INTRODUCTION A L'HYBRIDATION IN SITU

a. Généralités

L'hybridation in situ est une technique de biologie moléculaire reposant sur les propriétés de dénaturation et de réassociation spécifique de l'ADN lors du retour à des conditions de renaturation. Elle permet l'énumération et la localisation spatiale de séquences d'ADN spécifiques dans les noyaux au sein des tissus. Dans la technique de FISH (Hybridation In Situ en Fluorescence), les sondes utilisées (HER2 et CEP17) marquées par deux fluorochromes différents s'hybrident spécifiquement au niveau des loci du gène *HER2* et du centromère 17 dans les noyaux. On utilisera également le DAPI, une molécule fluorescente se liant à l'ADN de manière aspécifique, pour repérer les noyaux des cellules en fluorescence. D'autres techniques alternatives validées utilisent des sondes visualisées par l'intermédiaire de chromogènes (Chromogenic ISH) ou d'une réaction argentique (Silver ISH et Dual ISH (DISH)) qui permettent une lecture au microscope optique. Nous ne détaillerons pas ces techniques alternatives ici.

La technique d'hybridation in situ est très sensible et permet d'identifier individuellement chaque copie du gène et du centromère dans les noyaux. Aucune étape complémentaire de révélation et d'intensification du signal n'est nécessaire. Une cellule diploïde normale montrera deux signaux du gène *HER2* et deux signaux du centromère 17 par noyau. Une cellule présentant une amplification pourra présenter plus de 10 copies du gène. Lorsque le test est effectué sur du tissu fixé et inclus en paraffine, comme ce sera le cas dans l'ensemble de ce travail, la technique est précédée par une étape de prétraitement protéolytique afin de permettre l'accessibilité des sondes à l'ADN des noyaux.

La FISH présente des avantages et des inconvénients qui sont énumérés dans le Tableau 6.

Tableau 6 : Avantages et inconvénients de la technique d'hybridation in situ en fluorescence

Avantages	Inconvénients
<ul style="list-style-type: none"> • Reproductibilité supérieure à la technique d'immunohistochimie • Interprétation quantitative du score sous forme d'une variable continue • Automatisation de la technique disponible 	<ul style="list-style-type: none"> • Etape de digestion protéolytique délicate et variable • Investissement en microscopie en fluorescence • Morphologie parfois difficile à apprécier avec difficultés à repérer les zones de carcinome invasif • Perte du signal avec le temps, la chaleur et l'exposition à la lumière • Coût supérieur à l'immunohistochimie • Nécessité d'un personnel entraîné et formé

b. Les sondes d'hybridation in situ en fluorescence

Dans ce travail, nous utiliserons deux types de sondes de FISH : une sonde centromérique et une sonde spécifique de locus. Les sondes centromériques, aussi appelées sondes d'énumération des centromères (Centromere Enumeration Probe en anglais, d'où l'abréviation CEP17 dans ce travail) s'hybrident à des séquences répétitives spécifiques situées au niveau des centromères de chaque chromosome. Les sondes spécifiques de loci sont de loin les plus employées en pratique. Elles s'hybrident spécifiquement au gène d'intérêt, permettant la localisation et l'énumération du nombre de copie d'une région chromosomique particulière. L'utilisation de plusieurs sondes marquées par des fluorochromes différents peut servir à repérer des points de cassure récurrents dans certaines tumeurs, ou à affirmer une amplification d'un gène, comme ce sera le cas dans ce travail. Ces sondes spécifiques de loci mesurent entre 100 et 300 kilobases afin de produire un signal facilement visible. Elles peuvent être préparées à partir de sources très variables : chromosomes bactériens artificiels, chromosomes fongiques artificiels, synthèse chimique. Dans notre travail, nous utiliserons des sondes Dako SureFISH développées *in silico* puis synthétisées chimiquement en utilisant une technologie de synthèse d'oligonucléotides haute fidélité.

c. Déroulement de la technique

Seules les grandes étapes similaires à toute technique de FISH sont présentées ici. Premièrement, le tissu à analyser subit une digestion enzymatique par une protéase, ce qui permet de dégrader les protéines nucléaires et de faciliter l'accès des sondes de FISH au noyau et l'hybridation subséquente. L'ADN cible et les sondes oligonucléotidiques sont dénaturées par chauffage au sein d'un tampon d'hybridation (10 min à 82°C dans notre travail), aboutissant à un

ADN cible et des sondes simple-brin. A partir de cette étape, l'hybridation des sondes oligonucléotidiques sur l'ADN cible est permise. La température est alors abaissée et maintenue pendant plusieurs heures à température constante (45°C pendant 2h pour le tampon Dako IQ-FISH que nous utiliserons dans ce travail) le temps que les sondes oligonucléotidiques puissent s'hybrider correctement et spécifiquement à l'ADN cible (Figure 6). Cette étape d'hybridation est suivie d'un lavage stringent qui a pour but de supprimer les sondes incorrectement hybridées de manière non spécifique sur l'ADN cible. Une contre-coloration des noyaux à l'aide du DAPI (4',6-diamidino-2-phénylindole) est indispensable pour se repérer sur la lame.

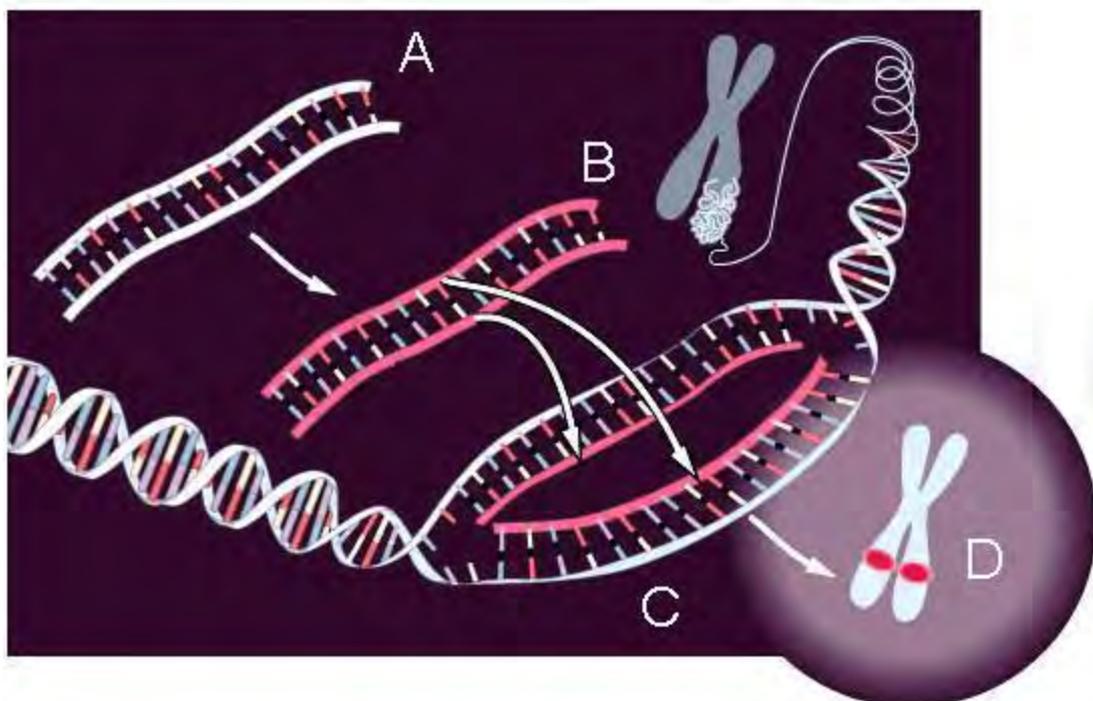


Figure 6 : Principe de l'hybridation in situ en fluorescence. A : Sonde, B : Sonde colorée par un fluorochrome, C : hybridation à l'ADN cible, D : Apparence du chromosome métaphasique où la sonde s'est fixée. (Source : Wikipédia)

d. Principes de la fluorescence

Une molécule fluorescente est une molécule capable d'absorber l'énergie lumineuse à une longueur d'onde donnée (excitation) et de la restituer rapidement sous forme de lumière fluorescente (émission), le plus souvent à une longueur d'onde plus grande. La fluorescence correspond à l'émission de photons qui se produit lors des transitions électroniques d'une molécule d'un état excité vers un état fondamental. Les molécules fluorescentes finissent par se dégrader à force d'excitations itératives. Cette perte de fluorescence s'appelle la photodestruction ou *fading*. Elle est inexorable mais peut être considérablement ralentie par le

froid et l'obscurité.

e. Principes du microscope en fluorescence

En pratique, le microscope à fluorescence utilise le fait que la longueur d'onde d'excitation soit différente de la longueur d'onde d'émission pour repérer les molécules fluorescentes dans les tissus. On excite le tissu à une longueur d'onde donnée (excitation) et recueillons la lumière émise grâce à un filtre ne laissant passer que la longueur d'onde d'émission. Le microscope à fluorescence comprend plusieurs cubes interchangeables spécifiques de différentes lumières d'excitation. Chaque cube est composé de deux filtres et d'un miroir dichroïque :

- un filtre d'excitation qui filtre la source lumineuse (lampe) et ne laisse passer que les photons d'une longueur d'onde définie,
- un filtre barrière du côté de l'observateur (capteur ou oculaires),
- un miroir dichroïque qui réfléchit certaines longueurs d'onde (comprenant la longueur d'onde d'excitation) et est traversé par d'autres (comprenant la longueur d'onde d'émission) (Figure 7).

Un ajustement précis des filtres et un choix de fluorochromes basé sur leurs spectres d'excitation et d'émission sont donc des prérequis techniques indispensables pour la qualité et l'interprétation des résultats de FISH.

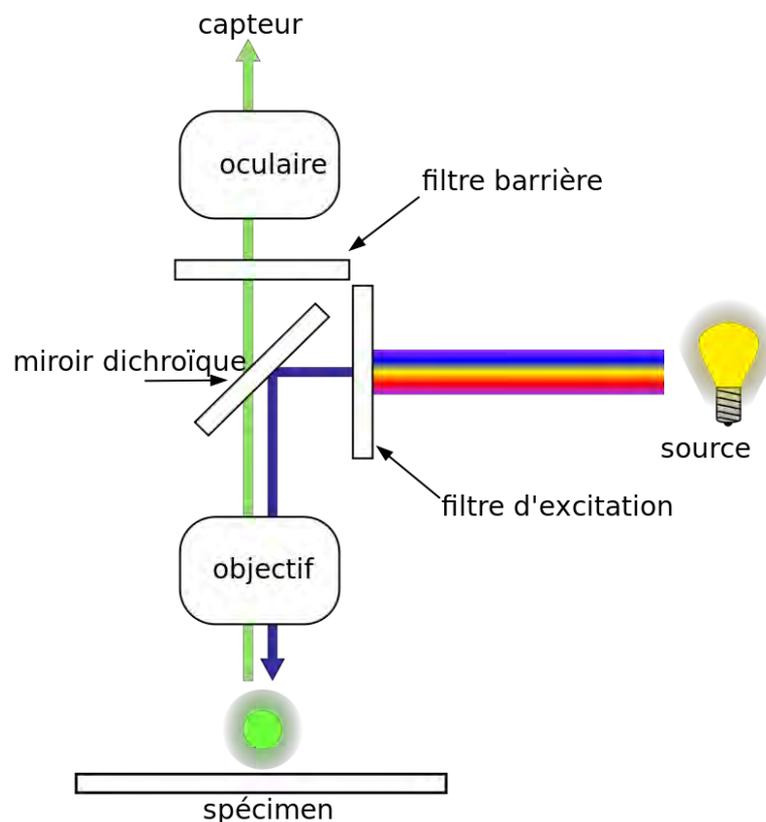


Figure 7 : Schéma du filtrage par le cube d'un microscope à fluorescence
(Source : Wikipédia)

C.2.8 CRITERES D'INTERPRETATION DE L'HYBRIDATION IN SITU EN FLUORESCENCE

a. Généralités

Avant toute chose, il est indispensable de se référer à la lame en coloration standard et à la lame d'IHC avec l'anticorps anti-HER2 avant d'interpréter un résultat de FISH. En effet, comme nous l'avons vu précédemment, l'une des principales difficultés en microscopie en fluorescence est de repérer les foyers carcinomateux infiltrants et de ne pas les confondre avec des foyers de carcinome in situ ou tout autre type cellulaire. Il est donc d'une grande aide de revoir la morphologie du prélèvement avant d'entamer la lecture de la FISH proprement dite.

Le comptage doit se faire dans la zone positive en IHC ou dans les zones paraissant amplifiées sur plus de 20 cellules carcinomateuses contiguës pour ne pas tenir compte des cellules amplifiées isolées. Il est recommandé de commencer par un balayage de la lame à faible grandissement (x20) en excitation DAPI afin de repérer les foyers de carcinome invasif.

Il faut rejeter le test dans les cas suivants :

- Si les signaux ne sont pas interprétables sur plus de 25% des cellules,
- En présence d'autofluorescence ou si la résolution nucléaire est mauvaise (problème de digestion tissulaire),
- S'il y a un bruit de fond gênant la lecture correcte des signaux.

b. Cas classiques

Les critères présentés dans ce chapitre se réfèrent aux dernières recommandations ASCO®/CAP 2013 et GEPFICS 2014 [104, 105].

L'analyse porte d'abord sur le nombre moyen de copies du gène *HER2*.

- Si le nombre de signaux *HER2* est supérieur ou égal à 6 en moyenne, le cas est dit positif (amplifié), quel que soit le nombre de signaux pour la région centromérique du chromosome 17 (CEP17).
- Si le nombre de signaux *HER2* est strictement inférieur à 4 en moyenne, le cas est dit négatif (non amplifié), quel que soit le nombre de signaux pour la région centromérique du chromosome 17. En cela, le GEPFICS se démarque de la Société américaine d'oncologie clinique. En effet, les auteurs des recommandations de l'ASCO®/CAP considèrent les cas avec un nombre de signaux *HER2* par noyau inférieur à 4 mais un ratio supérieur ou égal à 2 (cas monosomiques) comme étant positifs. Selon le GEPFICS, les données cliniques et biologiques sont insuffisantes pour justifier une telle recommandation.

- Pour un nombre de copies $4 \leq HER2 < 6$, il faut regarder le ratio $HER2/CEP17$: si le ratio est supérieur ou égal à 2, le cas est considéré comme positif ; sinon, le cas est dit équivoque. Dans les cas équivoques, il faut réaliser une hybridation in situ sur un autre bloc tumoral. Si celle-ci confirme le statut équivoque, la patiente est alors considérée comme éligible à un traitement par anti-HER2. L'indication d'un tel traitement sera discutée au cas par cas en réunion de concertation pluridisciplinaire en fonction des données clinicopathologiques de sa tumeur.

Notons ici que certains noyaux montrent des signaux *HER2* sous la forme de doublets séparés par un intervalle de la taille d'un spot environ (Figure 8A). Ceux-ci témoignent de la présence de cellules en phase S/G2 ayant déjà accompli la synthèse de l'ADN du gène *HER2* en vue d'une mitose. Ceci est fréquent dans un tissu qui prolifère comme le cancer du sein. Chaque doublet ne doit être considéré que comme un seul signal. Les doublets sont beaucoup moins visibles pour les signaux centromériques, compte tenu de la taille des signaux et de leur fort appariement.

Il faut également savoir repérer les amas (ou *clusters*) de signaux *HER2* (Figure 8B et 8C). Les véritables amplifications sont des multiplications localisées dans le génome du gène *HER2* ; ainsi elles apparaissent sous forme d'amas de signaux dans les noyaux. Ces amas peuvent être petits et denses mais sont néanmoins systématiquement plus gros qu'une copie normale d'*HER2* (Figure 8B). Compte tenu de la densité des signaux dans les amas, il est parfois difficile de les énumérer individuellement. Une évaluation doit être faite à l'œil, en ayant comme référence le diamètre habituel d'un signal *HER2*. Il est recommandé de mentionner l'existence de ces signaux en amas, qui signent les amplifications, dans le compte rendu.

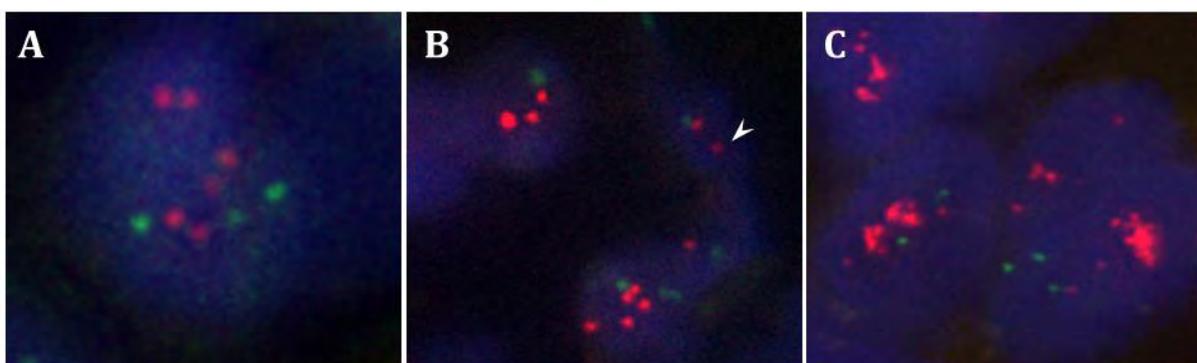


Figure 8 : Signaux *HER2* en doublets (A), petits clusters (B) et gros clusters (C). A : Trois signaux *HER2* en doublets et 3 signaux du centromère 17 dans un noyau ; B : La comparaison avec des signaux *HER2* normaux (tête de flèche) aide au diagnostic.

c. Cas particuliers

Monosomie du centromère 17

Elle est caractérisée par des noyaux tumoraux ne comportant qu'une seule copie du centromère 17. Dans les cas monosomiques avec 2 à 4 copies de *HER2* et 1 seule copie du CEP17, il ne faut pas appliquer le ratio *HER2*/CEP17 car la positivité déclarée sera fausse. Les deux seules situations de monosomie où l'on peut affirmer une amplification sont les cas où l'on détecte un nombre de signaux *HER2* supérieur ou égal à 6 en moyenne ou la présence de clusters, témoins d'une amplification [108]. En général, on signale une monosomie du centromère 17 dans le compte rendu si elle représente au moins 50% des cellules tumorales infiltrantes.

De manière anecdotique, il existerait également d'exceptionnelles nullisomies du chromosome 17. Il n'y aurait alors pas d'hybridation, ni de la sonde CEP17, ni de la sonde *HER2* dans les cellules tumorales et le noyau apparaîtrait vide en FISH. Les cellules non tumorales fourniraient alors le témoin positif de la qualité de la technique en arborant des signaux bien visibles.

Tumeurs aneuploïdes

Les surreprésentations du gène *HER2*, liées à de multiples copies du chromosome 17, ne donnent pas lieu à de véritables amplifications. La connaissance du statut du chromosome 17 est indispensable afin d'interpréter correctement ce phénomène et de ne pas surdiagnostiquer une amplification. On doit évoquer une aneuploïdie si le nombre de copies de *HER2* est compris entre 4 et 6. Cependant, il faut noter qu'il n'existe pas de définition consensuelle de la polysomie [108]. Peu de données cliniques sont disponibles quant à la réponse clinique au trastuzumab des tumeurs aneuploïdes. Aujourd'hui, ces tumeurs sont souvent classées comme « équivoques ».

Cas hétérogènes

Les recommandations ASCO®/CAP 2013 insistent sur l'interprétation des cas hétérogènes. La grande nouveauté réside dans le détail de l'interprétation de la technique d'hybridation in situ, qui doit se faire en référence à la lame d'IHC. Il existe d'authentiques cas hétérogènes pour le statut de *HER2*, même si la règle en termes d'amplification de *HER2* dans les cancers du sein est plutôt « tout ou rien » [108, 112]. Devant un cas hétérogène, il faut d'abord s'assurer qu'il ne s'agit pas d'un artefact technique. En accord avec des groupes d'experts, les nouvelles recommandations ont introduit la notion d'hétérogénéité zonale correspondant à une population de cellules amplifiées contiguës, nettement visible en IHC, par opposition à des cellules amplifiées dispersées au sein de cellules non amplifiées (hétérogénéité cellule à cellule). A l'heure actuelle, on ne prend en compte, pour le traitement, que la première catégorie

d'hétérogénéité. Néanmoins, il convient toujours de tester une éventuelle métastase ganglionnaire axillaire avant de prendre une décision thérapeutique.

Le GEPICs recommande, s'il existe deux populations différentes en IHC et en hybridation in situ, que celles-ci soient décrites dans le compte rendu et que la présence des deux populations clonales soit rapportée, avec leur score et leur représentation en pourcentage. Ces situations rares doivent être discutées au cas par cas en réunion de concertation pluridisciplinaire. Un traitement peut être envisagé en présence de cellules amplifiées contiguës, sous réserve que cette population représente au moins 10% des cellules tumorales. Si cette population représente moins de 10% des cellules tumorales, il s'agit d'un statut HER2 équivoque qui nécessite de faire l'hybridation in situ sur un autre bloc ou de tester un contingent métastatique éventuel avant de prendre une décision thérapeutique en réunion de concertation pluridisciplinaire.

Evaluation du statut HER2 après chimiothérapie néoadjuvante

Après une chimiothérapie néoadjuvante, et en particulier si des taxanes ont été employés, on peut observer de très gros noyaux tumoraux, extrêmement atypiques. Ces gros noyaux peuvent renfermer jusqu'à 15 copies du gène *HER2*, mais aussi d'autres gènes. Ce phénomène, appelé polyploïdisation, affecte tous les chromosomes de ces noyaux de grande taille [132, 133]. C'est un piège car il s'agit d'un cas faussement positif. Le doute peut être levé par le fait que les cellules tumorales moins atypiques présentent manifestement moins de copies de *HER2* car elles ne sont pas touchées par le phénomène de polyploïdisation. D'autre part, on peut réaliser une FISH avec une sonde située sur un autre chromosome (*MDM2*, *ALK* par exemple) et vérifier qu'il existe la même quantité de copies de cet autre gène dans les noyaux très atypiques.

Co-amplification de HER2 et du centromère 17

Dans certains cas, on peut observer dans les noyaux tumoraux un grand nombre de copies du gène *HER2* ainsi qu'un grand nombre de copies du centromère 17 présentant un aspect poussiéreux. Dans ces cas, la superposition des signaux bleus (DAPI), rouges (*HER2*) et verts (CEP17) nous permet de mettre en évidence une colocalisation quasi-parfaite des signaux rouges et verts sous forme d'amas jaunes (Figure 9). Il s'agit alors d'une probable co-amplification du gène *HER2* et du centromère 17 due à un amplicon large englobant à la fois le gène *HER2* et la région ciblée par la sonde centromérique CEP17 [139, 140]. Ces cas correspondent à une véritable amplification du gène *HER2*. Il ne faut pas faire l'erreur d'interpréter le ratio *HER2*/CEP17 qui reste faible (proche de 1) compte tenu du grand nombre de signaux du CEP17. Comme l'indiquent les recommandations, il faut commencer par évaluer le nombre de copies du gène *HER2*, avant d'interpréter si besoin le ratio *HER2*/CEP17. Dans les cas de co-amplification de *HER2* et du centromère 17, le nombre de copies de *HER2* est largement supérieur à 6, ce qui classe d'emblée ces cas en « positifs ».

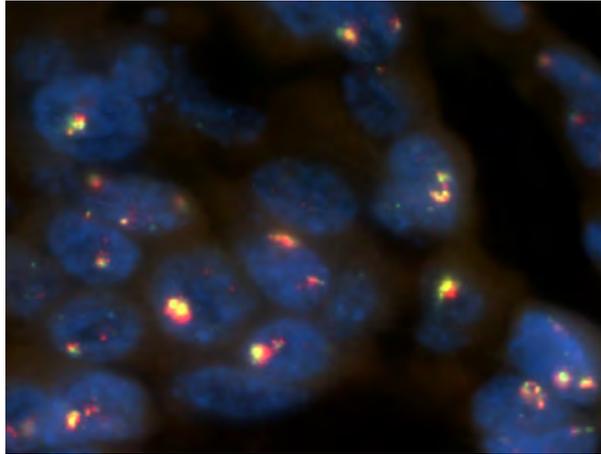


Figure 9 : Co-amplification du gène *HER2* et du centromère 17

d. Artefacts

Digestion protéolytique excessive ou insuffisante

La digestion protéolytique des coupes tissulaires par la pepsine est probablement l'étape la plus délicate de la technique d'hybridation in situ. Elle peut varier en efficacité selon les échantillons et la durée d'application. Les noyaux apparaîtront vides ou « mités » en cas de digestion excessive. Inversement, l'autofluorescence des cytoplasmes et du stroma peuvent recouvrir partiellement les noyaux en cas de digestion insuffisante (Figure 10).

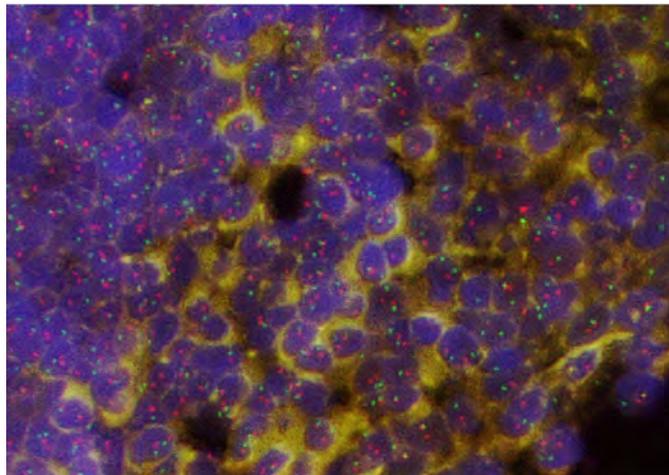


Figure 10 : Exemple de digestion protéolytique insuffisante.

L'autofluorescence des cytoplasmes et du stroma recouvre partiellement les noyaux ; le test est néanmoins lisible.

Bruit de fond

Dans certains cas, on observe un bruit de fond abondant sous forme de granulations fluorescentes pouvant gêner l'interprétation de l'hybridation in situ. Pour distinguer les signaux du bruit de fond, on peut se rappeler que les signaux ne sont présents que dans les noyaux ; et qu'ils sont en règle générale d'un calibre supérieur à celui des grains du bruit de fond.

D. PATHOLOGIE DIGITALE EN ANATOMO-PATHOLOGIE

D.1 HISTORIQUE

L'évaluation histologique des maladies constitue une compétence de base des pathologistes depuis plus de 125 ans [141]. Cependant, au cours de l'histoire, les pathologistes ont étendu leur répertoire en incluant de nouvelles techniques et de nouvelles technologies pour faciliter l'acquisition d'une quantité croissante d'informations provenant des spécimens histologiques. Ces technologies incluent les colorations spéciales, l'IHC, l'hybridation in situ, et plus récemment la pathologie digitale et l'analyse d'image. La pathologie digitale regroupe la numérisation, l'archivage et l'interprétation de spécimens pathologiques à partir de fichiers d'images digitales [142]. Les premiers développements de la pathologie digitale consistaient en une transmission à distance d'images statiques capturées à l'aide d'une caméra branchée sur un microscope. Par la suite, des techniques de télépathologie robotique ont vu le jour. Un pathologiste pouvait alors contrôler à distance la platine d'un microscope afin de visualiser la lame en temps réel [143]. Plus récemment, la pathologie digitale a évolué vers la création d'images digitales de sections histologiques entières *via* le développement de scanner de lames [143, 144]. Même si les fichiers de lames virtuelles restent très volumineux à l'heure actuelle, les principaux avantages de la pathologie digitale sont la facilité de transmission d'images et de données pathologiques à travers le monde, l'archivage sûr, sécurisé et rapidement requêttable de spécimens histologiques et le développement d'outils d'analyse d'image qualitative et quantitative utilisables en pratique courante. La capacité de numérisation de lames en fluorescence (immunofluorescence et hybridation in situ) offerte par certains scanners de lames permet un archivage de ces images qui était totalement inenvisageable auparavant. En effet la fluorescence émise par les fluorochromes s'estompe progressivement en quelques semaines ou mois, même dans des conditions de conservation optimales.

D.2 PATHOLOGIE DIGITALE : UNE ANALOGIE AVEC LA PHOTOGRAPHIE NUMERIQUE

Le scanner de lame 3DHISTECH Panoramic 250 utilisé dans ce travail se comporte exactement

comme un microscope à fluorescence automatisé et muni d'un capteur s'apparentant à un appareil photo numérique. Il existe une vraie analogie entre la pathologie digitale et la photographie numérique, qui nécessitent toutes deux une bonne connaissance de toutes les étapes aboutissant à un bon cliché ou à une lame numérisée de bonne qualité. Ces étapes sont les suivantes : avant le cliché (ou la numérisation), le cliché (ou la numérisation) à proprement parlé et après le cliché (ou la numérisation). Ces étapes sont détaillées et la comparaison photographie numérique et pathologie digitale est représentée dans la Figure 11.

Avant la numérisation, deux grands facteurs vont jouer un rôle dans la qualité finale de la lame numérisée : la qualité du tissu et de la technique et les réglages du matériel. La qualité du tissu et de la technique font intervenir, d'une part, les propriétés intrinsèques du tissu : la présence de fibrose (souvent responsable d'autofluorescence), de tissu adipeux, de nécrose par exemple, et d'autre part sa prise en charge dans le service d'anatomie pathologique : la phase pré-analytique avec notamment la digestion enzymatique, l'hybridation et le montage de la lame. Les réglages du matériel font intervenir, pour une grande part, l'ajustement des filtres en fonction des fluorochromes utilisés, mais également l'exposition, le gain numérique et la mise au point. Ces derniers éléments peuvent se régler par l'intermédiaire du logiciel de contrôle du scanner.

La qualité de l'étape de numérisation proprement dite fait intervenir exactement les mêmes facteurs que ceux de la photographie numérique : la qualité optique (qualité des objectifs) et la qualité du capteur.

Après la numérisation, il s'agit enfin de traitement et d'analyse d'image. Les possibilités offertes par ces approches ne permettent en aucun cas de rattraper de grosses lacunes sur les étapes antérieures. En d'autres termes, il ne faut pas attendre du traitement d'une image numérisée la possibilité de rendre lisible une lame illisible sous le microscope. Les possibilités du traitement d'image sont multiples pour les lames numérisées : réduction du bruit de fond et de l'autofluorescence, adaptation du contraste et de la luminosité, standardisation des couleurs. L'analyse d'image, quant à elle, représente une tentative de « compréhension » ou de « lecture » des lames par le logiciel. Il permet notamment la segmentation (segmentation nucléaire dans notre travail), la reconnaissance et la quantification de certains signaux (les signaux *HER2* et *CEP17* dans notre travail), la classification d'objets à partir d'algorithmes qui s'apparentent à des « règles du jeu » (classification des noyaux dans notre travail) et permet, bien entendu, d'extraire toutes ces données sous forme chiffrées afin de réaliser des analyses statistiques, de procéder à des ajustements post-analyse et de soumettre ces données au processus de *data-mining* par des approches informatiques plus complexes, supervisées ou non.

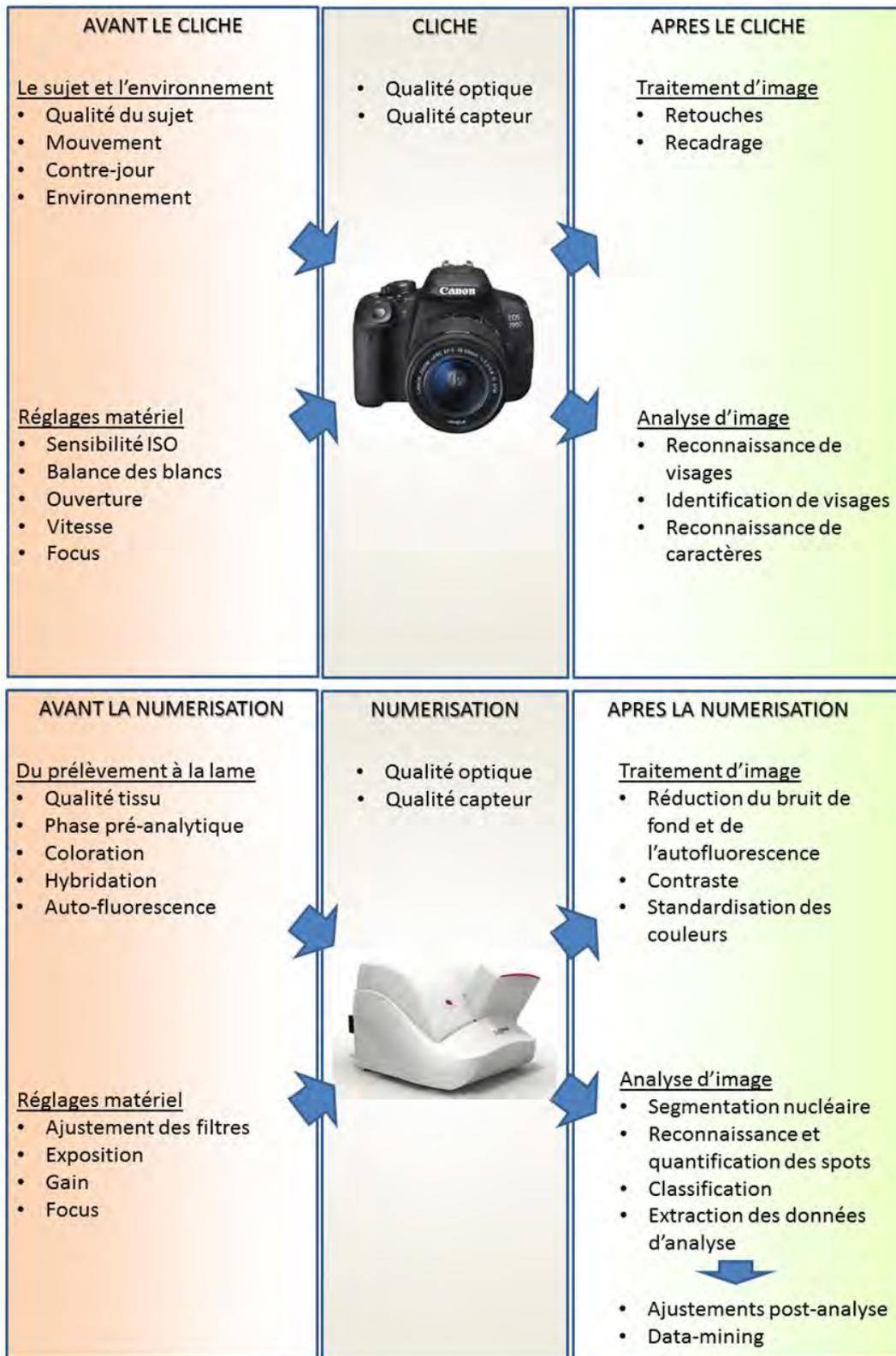


Figure 11 : Comparaison de la photographie numérique et de la pathologie digitale

D.3 FORMATS DE FICHIERS D'IMAGES NUMERISEES

Une image numérisée de lame entière peut avoir une taille de plusieurs centaines de milliers de pixels dans chaque dimension, ce qui pose d'importants problèmes d'archivage, de récupération et de manipulation d'image. Le fichier est souvent si volumineux (plusieurs giga-octets) qu'il ne peut être contenu tout entier dans la mémoire vive d'un ordinateur, empêchant d'emblée son ouverture et sa modification. Les fabricants de scanners de lames utilisent donc un système de streaming navigant au sein de ce que l'on appelle une pyramide d'images (Figure 12). Ce système de pyramide d'images où les couches à fort grossissement sont divisées en dalles s'apparente à l'application Google Earth. Le logiciel ne charge que les dalles que l'utilisateur souhaite visualiser, ce qui permet de réduire énormément le volume de données à afficher. Les fabricants de scanners de lames utilisent généralement des formats de fichiers « propriétaire » qui contiennent différents formats d'image et des fichiers de structures de métadonnées dans le but d'optimiser les performances de leur logiciel de visualisation de lames.

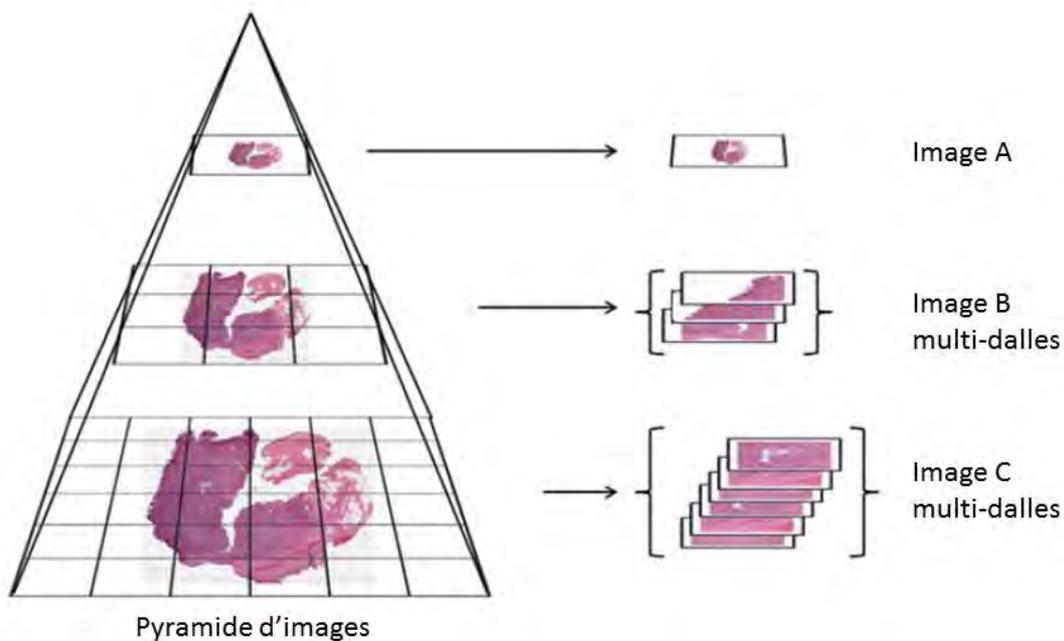


Figure 12 : Pyramide d'images. Représentation d'un fichier de lame entière numérisée sous forme de trois couches à des grossissements différents. Chaque couche est enregistrée sous forme d'une image individuelle ou d'un ensemble d'images (dalles) (adapté de [145]).

D.4 INTRODUCTION AU TRAITEMENT ET A L'ANALYSE D'IMAGE

Le traitement et l'analyse d'image ne doivent pas être confondus. Le traitement de l'image correspond à l'action sur les différentes composantes de l'image : la modification de la luminosité, du contraste et de la netteté, l'harmonisation des couleurs. L'analyse d'image, quant à elle, correspond à la décomposition d'une image en éléments. Ces éléments peuvent être différenciés sur des critères de texture, de couleur, de luminosité, de forme, etc. Les résultats d'analyse d'image sont des images modifiées, mettant en valeur tel ou tel objet, mais surtout de grandes quantités de données chiffrées concernant les différents éléments issus de la décomposition de l'image. Pour l'acquisition de certaines informations contenues dans une image, il est parfois indispensable de coupler le traitement et l'analyse d'image. C'est le cas notamment dans certains algorithmes de segmentation nucléaire (*cf.* p60)

L'analyse automatisée d'image histopathologique est basée sur l'usage d'une série d'algorithmes mathématiques capables de traiter des images, permettre leur segmentation en régions d'intérêt à partir de leurs couleurs et de leurs textures, tout en prenant en compte leur contexte [146]. Actuellement, l'analyse automatisée d'image en est encore à ses balbutiements. Cependant, de nombreux outils d'analyse d'image sont déjà capables de quantifier un immunomarquage tissulaire, et notamment l'expression immunohistochimique des RE, RP, HER2 et Ki67 [147]. Peu de publications concernent l'analyse automatisée d'images de FISH *HER2* [148, 149]. Ces quelques travaux montrent une bonne corrélation entre les résultats manuels et les résultats obtenus à l'aide des logiciels d'analyse d'image, mais elles sont basées sur des recommandations obsolètes. Ces publications n'abordent pas les possibilités d'ajustement manuel des différents réglages et n'analysent pas les résultats noyau par noyau en termes de sensibilité et de spécificité de détection. Il semble pourtant qu'une telle approche permettrait de mettre en lumière les atouts et les faiblesses de ces logiciels dans le but d'affiner les algorithmes de segmentation et de classification.

L'évolution probable de l'analyse d'image entre dans le cadre d'un paradigme émergent en biologie : la phénomique [150]. Alors que l'apport des techniques de génomique et de transcriptomique semble s'atténuer dans le temps, il semble que la phénomique puisse leur apporter un second souffle. La phénomique s'attache à étudier la correspondance entre les caractéristiques phénotypiques des organismes (le phénomène) et leur code génétique ou épigénétique. La précision et le développement croissants des outils d'analyse d'image en font une source privilégiée d'augmentation de la capacité de mesure du phénomène des tumeurs humaines. Le phénomène est une donnée très vaste, infinie. Quel peut-être le phénomène d'une cellule tumorale, appréciable en analyse d'image ? Commençons par ses caractéristiques physiques : taille, forme, rapport nucléo-cytoplasmique, teinte et texture du cytoplasme, teinte et

texture de la chromatine, etc. On peut y ajouter des caractéristiques immunophénotypiques, des données d'hybridation in situ. L'environnement de la cellule fait également partie de son phénomène : localisation dans la tumeur, proximité de cellules immunitaires, caractéristiques du stroma avoisinant, présence de cytokines etc. Au-delà des données d'imagerie, le phénomène de la cellule tumorale comprend également sa réponse au traitement ainsi que les caractéristiques physiques, biologiques et psycho-sociales de son hôte. Comme on le voit, la mesure du phénomène et son interprétation ne peut s'envisager qu'à l'ère du traitement des *Big Data*. Cette approche est fondamentalement transversale et fait intervenir de nombreux acteurs (biologistes, mathématiciens, informaticiens, médecins, sociologues) dont les capacités respectives ont toute leur rôle dans l'évaluation et l'interprétation du phénomène. C'est ainsi que les médecins impliqués dans ce type d'approche doivent connaître les outils d'analyse d'image, comprendre leurs forces et leurs faiblesses et avoir une notion des algorithmes qui les sous-tendent.

D.5 APPROCHE INFORMATIQUE DE L'ANALYSE AUTOMATISEE D'IMAGE DE FISH

Les deux étapes clés de l'analyse automatisée d'image de FISH sont la segmentation nucléaire et la classification des noyaux.

D.5.1 LA SEGMENTATION NUCLEAIRE

La segmentation nucléaire correspond à la « reconnaissance » des noyaux par le logiciel. Pour cette étape, le logiciel n'utilisera que les données de fluorescence des noyaux (canal bleu, DAPI), sans prendre en compte les signaux du gène *HER2* et du CEP17. A partir de ces données en niveau de gris, le logiciel doit définir les contours des noyaux dans le tissu examiné. Les algorithmes de segmentation des noyaux utilisent différents types d'approches : approches probabilistes, approches statistiques avec notamment les réseaux de neurones artificiels, approches morphologiques avec la modélisation de lignes de partage des eaux, etc. Cette étape est particulièrement délicate étant donnée la fréquence des accollements ou des superpositions de noyaux et la qualité parfois médiocre et variable de leur marquage. L'algorithme doit être capable d'exclure les artefacts de l'analyse. Ce point est décisif étant donné qu'il conditionne l'étape suivante : la classification des noyaux.

D.5.2 LA CLASSIFICATION DES NOYAUX

Les algorithmes de reconnaissance des signaux vert et orange/rouge sont nettement moins complexes que ceux de segmentation des noyaux. En effet, il s'agit de signaux punctiformes très brillants qui contrastent nettement avec leur environnement. Le logiciel va compter le nombre

de signaux dans chaque canal à l'intérieur de chaque noyau (dont les limites ont été définies à l'étape de segmentation nucléaire) et appliquer des règles lui permettant de classer ce noyau dans un groupe. Cette étape est régie par l'algorithme de classification des noyaux.

Au terme de cette introduction, nous pouvons identifier les éléments suivants :

- Le cancer du sein est une pathologie fréquente dans laquelle la détermination du statut HER2 est systématique ; les nouvelles recommandations de l'ASCO®/CAP ont considérablement augmenté le nombre de cas 2+ en IHC, induisant une augmentation du nombre de FISH.
- Les cas 2+ en IHC correspondent souvent à des entités d'interprétation difficile en FISH.
- La FISH *HER2* est une technique de lecture difficile, peu répandue (limitée aux centres experts) et chronophage en termes d'interprétation par le pathologiste ; la lecture au microscope en fluorescence en chambre noire est par ailleurs assez pénible.
- Le développement des techniques de pathologie digitale est actuellement suffisamment avancé pour permettre l'acquisition des FISH avec de bons critères de qualité. Le développement de l'analyse d'image pour la FISH est donc une progression naturelle dans ce contexte :
 - Possibilité d'amélioration considérable de la lecture de FISH *HER2* en routine avec une meilleure appréciation de l'hétérogénéité intra-tumorale pour *HER2*, qui reste problématique à l'heure actuelle.
 - Perspectives d'extrapolation à d'autres pathologies, à d'autres sondes, qui ferait de l'analyse d'image un outil majeur d'analyse de l'hétérogénéité intra-tumorale de manière générale.

C'est dans ce cadre que nous avons mené ce travail de thèse.

II. OBJECTIFS DE L'ETUDE

L'objectif principal de cette étude était d'évaluer la concordance de l'évaluation du statut *HER2* en FISH entre l'analyse automatisée de lames numérisées et l'analyse manuelle de lames numérisées.

Les objectifs secondaires de cette étude étaient :

- Evaluer la validité intrinsèque de l'analyse d'image pour la classification des noyaux.
- Comprendre l'impact de modifications de réglages logiciels sur les résultats d'analyse d'image.
- Comparer les comptes moyens de signaux *HER2* par noyau obtenus en analyse d'image et en PCR quantitative.
- Comparer les résultats en termes de statut *HER2* entre le diagnostic initial sur lame de DISH et l'analyse d'image.

III. MATERIELS ET METHODES

A. SELECTION DES PATIENTS

A.1 COHORTE TECHNIQUE

Les cas de la cohorte technique ont été recueillis à partir de résultats d'hybridation in situ argentique (DISH) ou d'IHC réalisés à l'Institut Claudius Regaud ou à l'Institut Universitaire du Cancer – Oncopole de Toulouse entre 2014 et 2016. Le choix des patientes a été réalisé de façon arbitraire afin de représenter un panel limité à 14 cas comprenant des tumeurs mammaires sans amplification de *HER2* avec ou sans suspicion de monosomie du chromosome 17 (n=3 et n=1 respectivement), des cas équivoques (n=2), des cas avec amplification faible de *HER2* (entre 4 et 6 copies du gène) (n=2) et des cas avec amplification forte de *HER2* (n=6).

Les critères d'inclusion étaient les suivants :

- évaluation du statut *HER2* en DISH sur pièce opératoire d'un carcinome infiltrant du sein antérieur à 2016,
- tumeur de plus de 5 mm de diamètre (afin de pouvoir réaliser un punch biopsique sur la zone tumorale sans difficulté).

Les critères d'exclusion étaient les suivants :

- absence de carcinome infiltrant,
- absence de données cliniques,
- absence de matériel disponible ou analysable.

A.2 COHORTE DE VALIDATION

Les cas de la cohorte de validation ont été recueillis à partir de résultats d'IHC avec l'anticorps anti-HER2 et de DISH réalisées à l'Institut Universitaire du cancer – Oncopole de Toulouse au cours de l'année 2015 sur des biopsies mammaires. Le choix des patients a été réalisé de façon arbitraire afin de constituer un panel de 30 cas composé de tous les scores immunohistochimiques envisageables : 5 cas de score HER2 0+, 5 cas de score HER2 1+, 15 cas de score HER2 2+ composés de cas présentant ou non une amplification de *HER2* en DISH et 5 cas de score HER2 3+.

Les critères d'inclusion étaient les suivants :

- évaluation du statut HER2 en IHC et, en cas de cas 2+, en DISH sur biopsie d'un carcinome infiltrant du sein au cours de l'année 2015.

Les critères d'exclusion étaient les suivants :

- absence de carcinome infiltrant ou carcinome infiltrant très peu représenté sur biopsie,
- absence de données cliniques,
- absence de matériel disponible ou analysable.

B. RECUEIL DES DONNEES CLINIQUES ET BIOLOGIQUES

Les données cliniques ont été recueillies à l'aide du logiciel DPI Oncopole (Dossier Patient Informatisé). Les données histopathologiques ont été recueillies à l'aide du logiciel de gestion de laboratoire Diamic Infologic-Santé.

Pour chaque tumeur de la cohorte technique et de la cohorte de validation, les données suivantes ont été recueillies :

- Date de naissance
- Date du prélèvement
- Latéralité
- Taille tumorale
- Score immunohistochimique de l'expression de HER2
- Pourcentage d'expression de HER2
- Nombre de copies du gène *HER2* en hybridation in situ
- Nombre de copies du centromère 17 en hybridation in situ
- Ratio du Nombre de copies du gène *HER2* et du nombre de copies du centromère 17
- Présence ou absence de clusters du gène *HER2*
- Type histologique de la tumeur
- Grade histologique selon Elston et Ellis
- Nombre de mitoses / mm²
- Présence ou absence de carcinome in situ associé
- Pourcentage d'expression des RH
- TNM

Pour les cas de la cohorte de validation (biopsies mammaires), les données suivantes

supplémentaires ont été recueillies

- Identifiant de la pièce opératoire si prise en charge chirurgicale ultérieure
- Justification en cas de prise en charge non chirurgicale
- Traitement ou non par chimiothérapie néoadjuvante
- Score immunohistochimique de l'expression de HER2 sur pièce opératoire
- Pourcentage d'expression de HER2 sur pièce opératoire
- Nombre de copies du gène *HER2* en hybridation in situ sur pièce opératoire
- Nombre de copies du centromère 17 en hybridation in situ sur pièce opératoire
- Ratio du nombre de copies du gène *HER2* et du nombre de copies du centromère 17 sur pièce opératoire

C. COHORTE TECHNIQUE – REALISATION DES BLOCS

Un bloc tumoral a été sélectionné pour chacun des 14 patients de la cohorte technique, en fonction de l'abondance du matériel. La cohorte technique a été complétée par deux cyto blocs de lignées cellulaires surexprimant HER2 (SKBR-3 et ZR75.30) et un bloc de tissu contrôle correspondant à du tissu amygdalien. Une lame en coloration standard hématoxyline-éosine a été réalisée sur chacun de ces blocs afin de cercler une zone tumorale infiltrante suffisamment étendue pour réaliser un prélèvement de 1,5 mm de diamètre. Ces zones ont été reportées sur les blocs. Par la suite, une carotte de tissu de 1,5 mm a été prélevée sur chaque bloc dans la zone cerclée et incluse au sein d'un bloc vierge (une carotte par bloc) à l'aide du tissu microarrayer TMA Grand Master 3DHISTECH (Figure 13A). Cette étape aboutissait à la réalisation de 17 blocs comprenant chacun une carotte de tissu tumoral de 1,5 mm de diamètre (Figure 13B). Pour mémoire, les blocs originaux ont été utilisés pour la cohorte de validation (biopsies).



Figure 13 : Réalisation des blocs de la cohorte technique. A : utilisation du TMA Grand Master 3DHISTECH ; B : blocs de la cohorte technique (en haut) et blocs originaux (en bas).

D. IMMUNOHISTOCHIMIE

L'étude immunohistochimique a été réalisée sur des coupes de 3 µm d'épaisseur à partir des blocs de la cohorte technique (avant utilisation pour la technique de réaction de polymérisation en chaîne (PCR) quantitative) et des blocs originaux de la cohorte de validation. L'anticorps diagnostique utilisé était l'anticorps Ventana® anti-HER2/neu, clone 4B5 (Roche diagnostics). Il s'agissait d'un anticorps monoclonal de lapin prédilué. Les immunomarquages ont été réalisés de manière automatisée sur automate Ventana® Benchmark Ultra. Le protocole d'immunomarquage comprenait entre autres une étape de démasquage antigénique à pH basique (pH = 8,4). La fixation de l'anticorps primaire à la membrane était visualisée avec le kit de révélation Ventana® *ultraView*. L'activité peroxydase était révélée en présence d'eau oxygénée et de DAB (3,3'-diaminobenzidine). Les lames étaient contre-colorées à l'hématoxyline de Mayer.

Les résultats ont été interprétés selon les recommandations ASCO®/CAP 2013 et GEPICS 2014 [104, 105, 150].

E. HYBRIDATION IN SITU EN FLUORESCENCE (FISH)

L'hybridation in situ a été réalisée sur des coupes tissulaires de 3 µm d'épaisseur à partir des blocs de la cohorte technique (avant utilisation pour la technique de PCR quantitative) et des blocs originaux de la cohorte de validation. Les sondes fluorescentes utilisées étaient les sondes Dako SureFISH Chr17 CEP 436 kb P5 green et 17q12 HER2 191 kb orange red. Les spectres d'excitation et d'émission (ex/em) de ces sondes sont 495/517 nm pour la sonde green et 547/565 nm pour la sonde orange red. Les filtres adéquats sont le filtre FITC pour la sonde green et le filtre Cy3 pour la sonde orange red. Pour chaque lame, 0,5 µL de chacune des sondes étaient dilués dans 9 µL tampon Dako IQ FISH pour un volume total de 10 µL. Les spectres d'excitation et d'émission du DAPI, de l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) et de la cyanine 3 (Cy3) sont représentés sur la Figure 14.

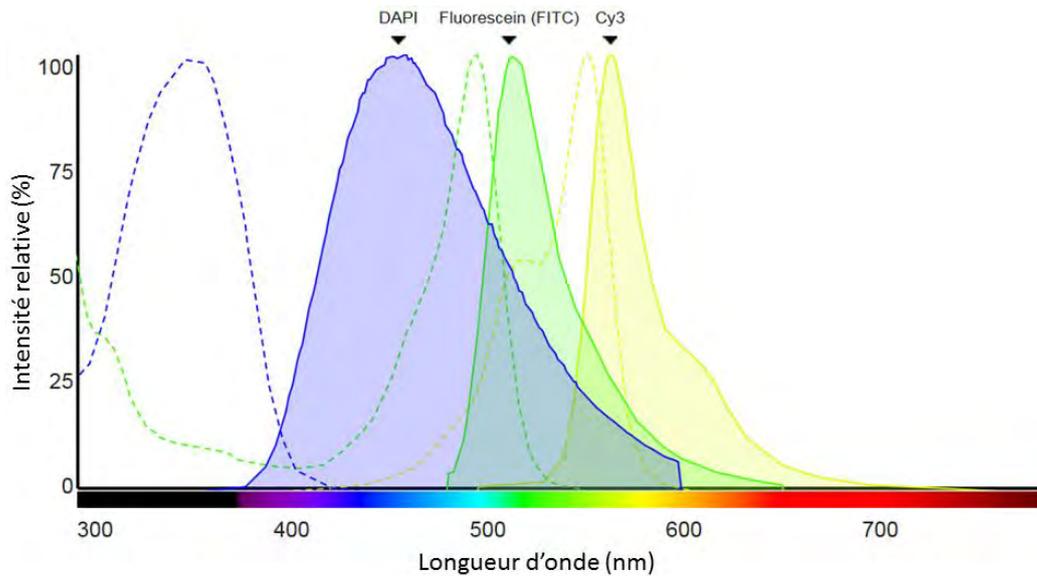


Figure 14 : Spectres d'excitation (pointillés) et d'émission (traits pleins) du DAPI, de la fluorescéine (FITC) et de la cyanine 3 (Cy3)

Le protocole d'hybridation in situ recommandé par le fabricant (Dako) et utilisé pour ce travail était le suivant :

- Déparaffinage et réhydratation

Xylène	2 x 5 min
Ethanol 100%	2 x 2 min
Ethanol 70%	2 x 2 min
Tampon de lavage	2 min

- Prétraitement au bain-marie

Immerger les lames dans la solution de prétraitement	10 min à 97°C
Sortir le bac et le laisser refroidir	15 min à T° ambiante
Rincer les lames dans le tampon de lavage	2 x 3 min

- Digestion enzymatique par la pepsine prête à l'emploi

Appliquer la pepsine froide pour recouvrir l'échantillon (5 à 8 gouttes / lame)	
Placer immédiatement les lames sur l'Hybridizer (Dako) avec couvercle ouvert à 37°C	
Incuber les lames sur l'Hybridizer (Dako)	5 min à 37°C
Eliminer la pepsine et placer les lames dans le tampon de lavage	2 x 3 min

- Déshydratation

Déshydrater les coupes en les immergeant dans des bains
d'alcool à 70%, 90% et 100% 2 min chaque bain

Laisser sécher les lames en position verticale 15 - 30 min

- Application de la sonde

Appliquer la sonde diluée au centre de la coupe 10 µL par lame

Appliquer immédiatement la lamelle pour permettre à la sonde de s'étaler

- Dénaturation et hybridation automatiques avec l'Hybridizer

Dénaturation 10 min à 82°C

Hybridation 120 min à 45°C

- Lavage stringent

Préparer 2 bacs de tampon de lavage stringent dilué

Placer 1 bac avec couvercle dans le bain-marie pour préchauffer 63°C

Garder le deuxième bac à température ambiante

Retirer la colle et les lamelles des lames de la chambre d'hybridation

Placer les lames dans le bac de tampon de lavage stringent à T° ambiante

Transférer les lames dans le bac de tampon de lavage stringent

au bain-marie 10 min à 63°C

Rincer dans le tampon de lavage 2 x 3 min

- Déshydratation

Déshydrater les coupes en les immergeant dans des bains
d'alcool à 70%, 90% et 100% 2 min chaque bain

Laisser sécher les lames en position verticale 15 - 30 min

- Montage des lames

Appliquer le milieu de montage contenant le DAPI 15 µL par lame

Stocker les lames 2 à 8°C

Notons ici que les lames de DISH réalisées pour les diagnostics initiaux avaient été réalisées de manière automatique avec le kit INFORM HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail (Roche diagnostic) sur automate Ventana® Benchmark Ultra selon les recommandations du fabricant.

F. LECTURE ET INTERPRETATION DES LAMES DE FISH

La lecture et l'interprétation des lames de FISH de la cohorte de validation ont été réalisées selon deux modalités différentes. Les lames numérisées ont été examinées via le logiciel 3DHISTECH Case Viewer 2.0 permettant une superposition des trois canaux DAPI, FITC, Cy3. Chaque cas de FISH a aussi été analysé de manière automatisée via le logiciel 3DHISTECH QuantCenter 2.0 avec les réglages optimum selon les résultats obtenus sur la cohorte technique (*cf* partie IV. B. p89).

Selon les recommandations du GEPICS, l'évaluation du statut *HER2* devait se faire dans la zone positive en IHC ou dans les zones paraissant amplifiées sur plus de 20 cellules carcinomateuses contiguës pour ne pas tenir compte des cellules amplifiées isolées. Les noyaux chevauchants devaient être évités.

G. PCR QUANTITATIVE

G.1 EXTRACTION D'ADN

L'extraction d'ADN a été réalisée à partir des blocs de paraffine de la cohorte technique avec le kit Promega Maxwell® 16 FFPE Tissue LEV DNA Purification kit. Une vingtaine de coupes de 10 µm d'épaisseur étaient débitées et utilisées pour l'extraction. Une coupe de 3 µm d'épaisseur était étalée en fin de bloc pour contrôle morphologique en coloration standard. Le dosage des ADN extraits était réalisé par technique fluorométrique avec 1 µL d'échantillon à tester, le test Invitrogen™ Qubit™ et le dispositif ThermoFisher Scientific Qubit™ 3.0 Fluorometer.

G.2 PROTOCOLE DE PCR QUANTITATIVE

Nous avons utilisé le protocole précédemment décrit par Jacquemier J et coll. utilisant 10 couples d'amorces réparties comme suit : 2 pour *HER2* (exon 8 et 26), 5 pour la détection d'une polysomie du chromosome 17 (*TAOK1* en 17q11.2, *UTP6* en 17q 11.2, *MRM1* en 17q12, *MKS1* en 17q22 et *SSTR2* en 17q24), et 3 pour contrôle de la diploïdie (*TSN* en 2q14, *LAP3* en 4p15 et *ADAMTS16* en 5p15) [151]. Les séquences des couples d'amorces sont détaillées dans le Tableau 7.

Tableau 7 : Couples d'amorces utilisés pour la PCR quantitative

Gène	Localisation	Taille	Séquence 5' vers 3'
ERBB2	17q21.1	84	U ACGGACGTGGGATCCTGCA
			L CTTCTCACACCGCTGTGTTCCAT
	17q21.1	80	U ACATGACCCCAGCCCTCTACA
			L GGGCAACGTAGCCATCAGTCT
TAOK1	17q11.2	75	U CAGGCCAGGTGAAACTTGCTGA
			L ACGGCGTTCCCACAAAGGAA
UTP6	17q11.2	88	U CCTTGGTAGACCTGAGAACTGTGGA
			L TTTAGCTACAAATGCCTCTGCTGACT
MRM1	17q12	68	U TTTGGGGCTGTGCTGCGTT
			L CTGTTTCTCCGGCTGGTGATGA
MKS1	17q22	59	U CCTGTGTA CTCTGAAGGTGGATAGCA
			L CCGTGAAGTCAGGCTTTACTGTGAT
SSTR2	17q24	63	U GGTCAAGGTGAGCGGCACAGAT
			L AGCCGGGATTTGTCCTGCTTACT
TSN	2q14	70	U CAGCGTGACTGCTGGAGACTACT
			L ACCGGAATCCAGCTCATTGAT
LAP3	4p15	62	U TGATGCTGAGGGGAGGCTCATA
			L TCGGGTTAAACGTGTGTGCGTA
ADAMTS16	5p15	69	U TGGTCTCTGCCTACGAGGTTGA
			L GCCGCTGATGGTGCATGAT

Chaque échantillon était analysé en duplicat dans un volume de réaction de 10 µL. Chaque puits contenait :

- 5 µL de SYBR Premix Ex Taq™ (Tli RNaseH Plus), ROX Plus Takara,
- 0,25 µL d'amorce sens,
- 0,25 µL d'amorce antisens,
- 2 µL d'échantillon d'ADN,
- 2,5 µL d'eau distillée stérile.

La PCR quantitative était réalisée en 40 cycles sur le thermocycleur ThermoFisher Scientific StepOne Plus™ Real-Time PCR System selon le schéma présenté en Figure 15.

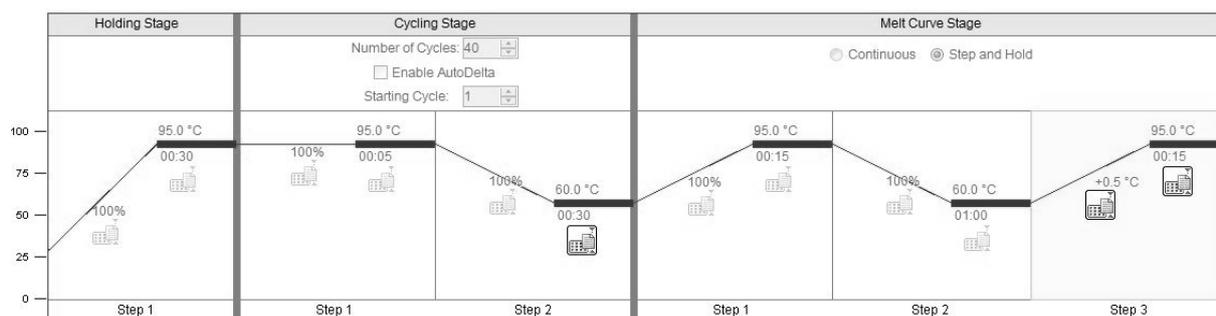


Figure 15 : Caractéristiques du cycle de PCR utilisé pour l'analyse en PCR quantitative

Les résultats (courbes de fusion et courbes d'amplification) étaient analysés avec le logiciel StepOne Software v2.2.2. Les seuils d'amplification utiles pour l'évaluation du Ct (*Cycle threshold*) étaient le plus souvent satisfaisants en mode automatique et conservés pour l'analyse. Les Ct de chaque réaction étaient consignés dans le tableur Excel utilisé par Jacquemier et coll. permettant un calcul automatique du nombre de copies du centromère 17 et de *HER2* avec pour référence les gènes témoins de diploïdie. Pour être comparables avec la FISH, les données de qPCR étaient exprimées par le nombre médian de copies des cinq gènes utilisés comme contrôle du centromère 17 et de la polysomie du chromosome 17, et le nombre médian de copies du gène *HER2*. Ces deux nombres étaient alors utilisés pour calculer le ratio *HER2*/centromère17.

H. NUMERISATION DES LAMES ET ANALYSE D'IMAGE

H.1 SCANNER DE LAME ET LOGICIEL DE CONTROLE DU SCANNER

Le scanner de lame utilisé pour l'ensemble des numérisations de ce travail était le 3DHISTECH Panoramic 250. Le mode « fond clair automatique » était utilisé pour la numérisation des lames en coloration standard et des lames d'IHC. Le mode « fluorescence manuel » était utilisé pour la numérisation des lames de FISH de la cohorte technique et de la cohorte de validation. Le système de gestion utilisé était la plateforme Imag'IN IUC. Le contrôle du scanner s'effectuait avec le logiciel Panoramic Scanner.

H.2 CHOIX DES FILTRES

Un profil de filtres a été créé pour ce travail, comprenant les filtres SR DA+FI+TR+Cy5 pour le DAPI, ZS 38HE GFP SFree pour le FITC et ZS 43HE Cy3 SFree pour la Cy3. Les bandes passantes des différents filtres et les longueurs d'onde d'excitation/émission des fluorochromes sont consignées dans le Tableau 8.

Tableau 8 : Profil de filtres utilisé pour la numérisation de l'ensemble des lames de FISH

Filtre	Type	Couleur	Bande passante (Ex/Em) (nm)	Fluorochrome	Longueur d'onde (Ex/Em) (nm)
ZS 38HE GFP SFree	1-Band	Vert	472-490 / 500-550	FITC Dako	495 / 520
ZS 43HE Cy3 SFree	1-Band	Orange	538-562 / 570-640	Cy3 Dako	547 / 565
SR DA+FI+TR+Cy5-B	4-Band	Bleu	381-393 / 420-460	DAPI	360 / 460
		Vert	475-495 / 508-534	Aucun	Aucun
		Orange	544-576 / 587-627	Aucun	Aucun
		Rouge	644-656 / 674-726	Aucun	Aucun

H.3 SCANMAP

Des ScanMap, correspondant à une prévisualisation grossière du tissu *via* uniquement le canal bleu (DAPI), ont été réalisées pour l'ensemble des lames de la cohorte de validation afin de repérer les zones de carcinome infiltrant en référence à la lame en coloration standard et à la lame d'IHC. Ces zones ont été cerclées afin que la numérisation définitive soit centrée sur ces foyers infiltrants. Le cerclage des zones d'intérêt a été réalisé grâce au logiciel 3DHISTECH Case Viewer 2.0.

H.4 REGLAGES DE MISE AU POINT ET D'EXPOSITION

Les réglages de mise au point et d'exposition étaient effectués lame par lame dans l'onglet « Hardware » du logiciel de contrôle du scanner pour l'ensemble des lames de FISH de ce travail. Ces réglages étaient réalisés canal par canal (filtre par filtre), notamment pour le temps d'exposition. Les valeurs classiques de temps d'exposition étaient de 2 à 20 ms pour le canal bleu avec un gain digital de 1 à 2 ; 40 à 100 ms pour le canal orange avec un gain digital de 4 à 5 ; et 60 à 110 ms pour le canal vert avec un gain digital de 4 à 5. La fréquence d'ajustement du focus (sur le canal bleu) était d'un réglage toutes les deux dalles acquises.

H.5 AUTRES REGLAGES

L'acquisition des images en fluorescence se faisait en 9 niveaux d'acquisition autour du point de focus (évalué sur le canal bleu) séparés de 0,4 µm pour les trois canaux (Figure 16). L'acquisition des trois canaux était réalisée pour chaque dalle avant de passer à la suivante. Après acquisition, chaque série de 9 images était compilée pour ne former qu'une seule image fusionnée : il s'agit du mode « focus étendu ». Le canal utilisé pour l'ajustement des dalles étaient le canal bleu (DAPI).

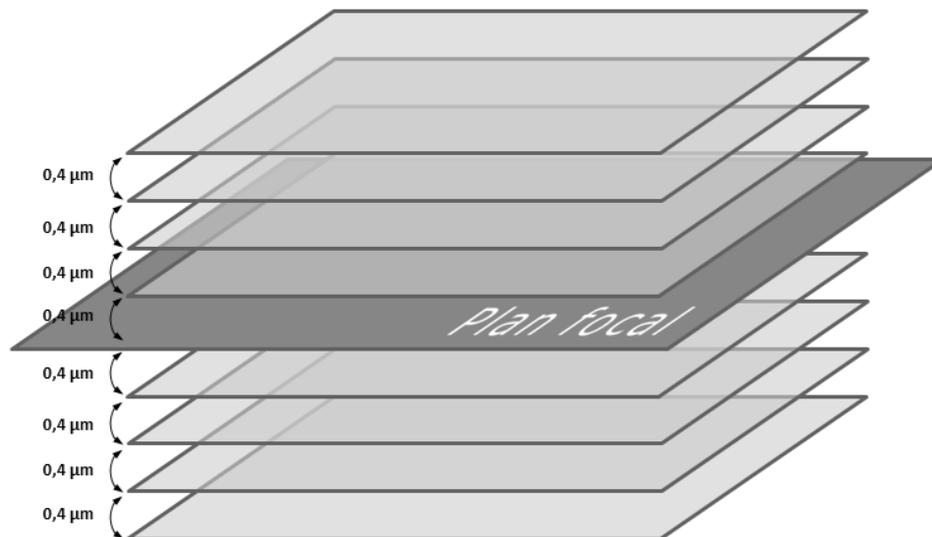


Figure 16 : Schéma représentant l'acquisition en 9 niveaux, soit 4 niveaux de part et d'autre du plan focal

H.6 ANALYSE D'IMAGE

Toutes les analyses d'image ont été réalisées grâce au logiciel 3DHISTECH QuantCenter 2.0, module FISHQuant. Les profils utilisés correspondaient aux algorithmes développés pour ce travail (cf. p. 74). Chacune des zones analysées correspondait à une annotation tracée dans le logiciel 3DHISTECH Case Viewer 2.0.

H.6.1 COHORTE TECHNIQUE

L'échantillon « D10 » de la cohorte technique a été utilisé comme témoin positif et témoin négatif des analyses automatisées de FISH étant donné qu'il comportait un foyer de carcinome infiltrant avec amplification forte du gène *HER2* (cerclé comme « contrôle positif ») et un foyer de glandes mammaires non tumorales adjacent (cerclé comme « contrôle négatif »). La tumeur de l'échantillon « D10 » était de grade III selon Elston et Ellis, avec un grade nucléaire de 3. Sur ces contrôles positif et négatif ont été réalisées de multiples analyses avec différents réglages de taille des noyaux. Des tailles de noyaux entre 5 et 11 µm ont été testées sur chacun de ces témoins et avec les trois algorithmes. Afin d'évaluer la qualité de la segmentation et du classement des noyaux en termes de sensibilité et de spécificité, chacun de ces noyaux a été revu manuellement et corrigé si besoin. Les erreurs de segmentation manifestes étaient reclassées systématiquement en « artefact » si ce n'était pas le cas.

Tous les échantillons de la cohorte technique ont été analysés avec le réglage optimal en terme de taille des noyaux et d'algorithme de classification des noyaux afin d'obtenir notamment la surface moyenne des signaux *HER2* par noyau et le rapport moyen de la surface des signaux *HER2* sur la surface du noyau. Ces résultats étaient par la suite comparés aux résultats de PCR quantitative dans le but d'évaluer la corrélation entre la surface des signaux *HER2* et le nombre de copies du gène *HER2* en PCR quantitative.

H.6.2 COHORTE DE VALIDATION

L'ensemble des cas de la cohorte de validation ont été analysés avec les trois algorithmes de classification des noyaux, avec un réglage de taille des noyaux basé sur la taille de noyau optimale obtenue sur l'échantillon D10 de la cohorte technique.

I. DEVELOPPEMENT DES ALGORITHMES

Le développement des algorithmes de classification des noyaux était réalisé à partir des fichiers `_ActualProbes_fish.xml` et `ProbeRepository.xml` présents dans le répertoire `C:\ProgramData\3DHISTECH\IA\XML`. Le langage utilisé est le XML (*Extensible Markup Language*, langage de balisage extensible), avec pour interface les logiciels NotePad++ v6.9.1 sur Windows et TextWrangler sur Mac.

J. ANALYSE STATISTIQUE

Afin d'évaluer la normalité de distribution des échantillons utilisés pour comparer les caractéristiques des noyaux vrais positifs et faux positifs d'une part et vrais négatifs et faux négatifs d'autre part, le test de Shapiro-Wilk a été réalisé avec un intervalle de confiance de 95%. Si le p était inférieur à 0,05, l'hypothèse nulle était rejetée et les données étaient considérées comme non issues d'une population normalement distribuée. Afin d'évaluer des variances des échantillons utilisés pour comparer les caractéristiques des noyaux vrais positifs et faux positifs d'une part et vrais négatifs et faux négatifs d'autre part, le test d'égalité des variances ou test de Fisher a été réalisé avec un intervalle de confiance de 95%. Si le p était inférieur à 0,05, l'hypothèse nulle était rejetée et les variances des deux groupes étaient considérées comme différentes. Les tests d'indépendances des proportions ont été réalisés par un test du χ^2 avec un intervalle de confiance de 95%. Afin de comparer les moyennes des différentes caractéristiques des noyaux vrais positifs et faux positifs d'une part et vrais négatifs et faux négatifs d'autre part, le test Wilcoxon non apparié a été réalisé avec un intervalle de confiance de 95%. Pour mesurer la corrélation entre la surface moyenne des signaux *HER2* par noyau et le nombre de copies de

HER2 par noyau en PCR quantitative, une analyse de régression linéaire a été effectuée avec un intervalle de confiance de 95%. Pour mesurer le degré de concordance entre les différentes techniques de lecture, le coefficient Kappa de Cohen (κ) a été estimé avec un intervalle de confiance de 95%. L'interprétation des résultats était basée sur l'échelle proposée par Landis et Koch [152] : un κ entre 0,8 et 1 représente une concordance presque parfaite, un κ entre 0,6 et 0,8 représente une concordance forte et un κ entre 0 et 0,6 représente une concordance faible à modérée. Les résultats étaient considérés comme statistiquement significatifs lorsque $p < 0,05$.

Les analyses statistiques ont été réalisées avec les logiciels Excel 2010 pour Windows, R-3.3.1 pour Windows et GraphPad Prism 5.

IV. RESULTATS

A. DEVELOPPEMENT DES ALGORITHMES DE CLASSIFICATION DES NOYAUX

L'algorithme de classification des noyaux est requis après l'étape de segmentation nucléaire et correspond aux « règles » que l'on dicte au logiciel afin de classer les noyaux dans différentes catégories en fonction du nombre et du type de signaux observés. Nous avons développé trois algorithmes basés sur trois approches différentes :

- Un algorithme se basant *stricto sensu* sur les dernières recommandations du GEFPICS [104], appelé « FXF » (Figure 17),
- Un algorithme correspondant à une adaptation du précédent algorithme permettant de surseoir à certaines anomalies et prenant en compte différents cas particuliers, appelé « adapt » (Figure 18),
- Un algorithme basé sur une approche cytogénétique selon les habitudes du service de cytogénétique de l'Institut de Cancérologie Gustave Roussy à Villejuif, appelé « cyto » (Figure 19).

```

<Probe
  Name="HER2_FXF"
  AberrationType="Locus specific"
  Kind="Amplification HER2_FXF">
  <Channel
    Name="Nuclei_Channel"
    Gene="DAPI"
    Color="FF0000FF" />
  <Channel
    Name="Gene"
    Gene="HER2"
    Color="FFFF0000" />
  <Channel
    Name="Control"
    Gene="CEP17"
    Color="FF00FF00" />
  <Cluster
    Name="Negative"
    Color="FF008000">
    <Expression><![CDATA[(Gene > 0 && Control > 0) && (Gene < 4)]]></Expression>
  </Cluster>
  <Cluster
    Name="Amplification"
    Color="FFFF0000">
    <Expression><![CDATA[(Gene > 0 && Control > 0) && ((Gene >= 6) || ((Gene >= 4 && Gene < 6) && (Gene/Control >= 2)))]></Expression>
  </Cluster>
  <Cluster
    Name="Ambiguous"
    Color="FFFA500">
    <Expression><![CDATA[(Gene > 0 && Control > 0) && ((Gene >= 4 && Gene < 6) && (Gene/Control < 2))]]></Expression>
  </Cluster>
  <Cluster
    Name="Empty Nuclei"
    Color="FF808080">
    <Expression><![CDATA[Gene+Control==0]]></Expression>
  </Cluster>
  <Cluster
    Name="Other/Artefact"
    Color="FFFFFFF">
    <Expression><![CDATA[true]]></Expression>
  </Cluster>
</Probe>

```

Figure 17 : Algorithme "FXF"

```

<Probe
  Name="Amplification HER2_adapt_CF"
  AberrationType="Locus specific"
  Kind="Amplification HER2_CF">
  <Channel
    Name="Nuclei_Channel"
    Gene="DAPI"
    Color="FF0000FF" />
  <Channel
    Name="Gene"
    Gene="HER2"
    Color="FFFF0000" />
  <Channel
    Name="Control"
    Gene="CEP17"
    Color="FF00FF00" />
  <Cluster
    Name="Negative"
    Color="FF008000">
    <Expression><![CDATA[(Gene > 1 && Gene < 4) && (Control > 0 && Control < 4)]]></Expression>
  </Cluster>
  <Cluster
    Name="Monosomy"
    Color="FFF5F5DC">
    <Expression><![CDATA[(Gene==1 && Control == 1)|(Gene==0 && Control ==1)|(Gene==1 && Control==0)]]></Expression>
  </Cluster>
  <Cluster
    Name="Equivocal - Polysomy"
    Color="FFFFFFF0">
    <Expression><![CDATA[(Control > 2 && Control < 6) && (Gene > 3 && Gene < 6)]]></Expression>
  </Cluster>
  <Cluster
    Name="Amplification - weak"
    Color="FFFA500">
    <Expression><![CDATA[(Control > 0) && ((Gene == 4 && Gene/Control >= 2)|(Gene == 5 && Gene/Control >=2)]]></Expression>
  </Cluster>
  <Cluster
    Name="Amplification - strong"
    Color="FFF0000">
    <Expression><![CDATA[(Control > 0 && Control < 4) && ((Gene > 5) && (Gene/Control >=2)]]></Expression>
  </Cluster>
  <Cluster
    Name="CEP 17 coamplification - Overlapping"
    Color="FFFB6C1">
    <Expression><![CDATA[(Gene > 0 && Control > 0) && ((Gene >= 6) && (Gene/Control < 2)]]></Expression>
  </Cluster>
  <Cluster
    Name="Other/Artefact"
    Color="FFFFFFF">
    <Expression><![CDATA[true]]></Expression>
  </Cluster>
  <Cluster
    Name="Empty Nuclei"
    Color="FF808080">
    <Expression><![CDATA[Gene+Control==0]]></Expression>
  </Cluster>
</Probe>

```

Figure 18 : Algorithme "adapt"

```

<Probe
  Name="Amplification HER2_cyto_CF"
  AberrationType="Locus specific"
  Kind="Amplification HER2_cyto">
  <Channel
    Name="Nuclei_Channel"
    Gene="DAPI"
    Color="FF0000FF" />
  <Channel
    Name="Gene"
    Gene="HER2"
    Color="FFFF0000" />
  <Channel
    Name="Control"
    Gene="CEP17"
    Color="FF00FF00" />
  <Cluster
    Name="Negative"
    Color="FF008000">
    <Expression><![CDATA[(Gene == 2) && ((Control == 2)|(Control == 1))]]></Expression>
  </Cluster>
  <Cluster
    Name="Monosomy"
    Color="FFF5F5DC">
    <Expression><![CDATA[(Gene == 1 && Control == 1)|(Gene == 0 && Control == 1)|(Gene == 1 && Control == 0)]]></Expression>
  </Cluster>
  <Cluster
    Name="Polysomy"
    Color="FFFFFFF0">
    <Expression><![CDATA[(Gene > 2 && Gene < 7) && (Control == Gene)]]></Expression>
  </Cluster>
  <Cluster
    Name="Gain"
    Color="FFFA500">
    <Expression><![CDATA[(Gene > 2) && ((Gene/Control <= 2) && (Gene/Control > 1)]]></Expression>
  </Cluster>
  <Cluster
    Name="Amplification"
    Color="FFFF0000">
    <Expression><![CDATA[(Gene > 4) && (Gene/Control > 2)]]></Expression>
  </Cluster>
  <Cluster
    Name="Other/Artefact"
    Color="FFFFFFF">
    <Expression><![CDATA[true]]></Expression>
  </Cluster>
  <Cluster
    Name="Empty Nuclei"
    Color="FF808080">
    <Expression><![CDATA[Gene+Control==0]]></Expression>
  </Cluster>
</Probe>

```

Figure 19 : Algorithm "cyto"

A.1 ALGORITHME « FXF »

Cet algorithme se base sur les recommandations actuelles en termes d'évaluation du statut *HER2* en hybridation in situ. Il n'a fait l'objet d'aucun ajustement. Le fichier créé est nommé « ProfilIQHER2_FXF.xml » et se situe dans le répertoire C:\ProgramData\3DHISTECH\IA\XML. La définition des règles se situe entre les balises <Probe et </Probe>.

A.1.1 CLUSTER « NEGATIVE »

```
<Cluster
  Name="Negative"
  Color="FF008000">
  <Expression><![CDATA[(Gene > 0 && Control > 0) && (Gene < 4)]]></Expression>
</Cluster>
```

Ce cluster définit les noyaux qui doivent être considérés **négatifs** selon les critères suivants :

- Au moins une copie de *HER2* et une copie du CEP17
- Moins de 4 copies de *HER2*

Ces noyaux seront colorés en vert.

A.1.2 CLUSTER « AMPLIFICATION »

```
<Cluster
  Name="Amplification"
  Color="FFFF0000">
  <Expression><![CDATA[(Gene > 0 && Control > 0) && ((Gene >= 6) || ((Gene >= 4
&& Gene < 6) && (Gene/Control >= 2)))]></Expression>
</Cluster>
```

Ce cluster définit les noyaux qui doivent être considérés **amplifiés** selon les critères suivants :

- Au moins une copie de *HER2* et une copie du CEP17
- 6 copies ou plus de *HER2* ou 4 à 6 copies de *HER2* avec un ratio *HER2*/CEP17 supérieur ou égal à 2.

Ces noyaux seront colorés en rouge.

A.1.3 CLUSTER « AMBIGUOUS »

```
<Cluster
  Name="Ambiguous"
  Color="FFFA500">
  <Expression><![CDATA[(Gene > 0 && Control > 0) && ((Gene >= 4 && Gene < 6) &&
(Gene/Control < 2))]]></Expression>
</Cluster>
```

Ce cluster définit les noyaux qui doivent être considérés **équivoques** selon les critères suivants :

- Au moins une copie de *HER2* et une copie du CEP17
- Entre 4 et 6 copies de *HER2*
- Ratio *HER2*/CEP17 inférieur à 2.

Ces noyaux seront colorés en orange.

A.1.4 CLUSTER « EMPTY NUCLEI »

```
<Cluster
  Name="Empty Nuclei"
  Color="FF808080">
  <Expression><![CDATA[Gene+Control==0]]></Expression>
</Cluster>
```

Ce cluster définit les noyaux qui doivent être considérés **vides** selon les critères suivants :

- Aucun signal *HER2* ni CEP17

Ces noyaux seront colorés en gris.

A.1.5 CLUSTER « OTHER/ARTEFACT »

```
<Cluster
  Name="Other/Artefact"
  Color="FFFFFFFF">
  <Expression><![CDATA[true]]></Expression>
</Cluster>
```

Ce cluster définit les noyaux qui doivent être considérés comme **artéfactuels** selon les critères suivants :

- Noyau qui ne correspond à aucune autre catégorie

Ces noyaux seront colorés en blanc.

A.2 ALGORITHME « ADAPT »

Cet algorithme est une adaptation de l'algorithme FXF prenant en compte l'existence de différents niveaux d'amplification et de cas particuliers tels que les monosomies du chromosome 17, les tumeurs aneuploïdes et les co-amplifications du centromère 17. Le fichier créé est nommé « ProfilIQHER2_adapt_CF.xml » et se situe dans le répertoire C:\ProgramData\3DHISTECH\IA\XML. La définition des règles se situe entre les balises <Probe et </Probe>.

A.2.1 CLUSTER « NEGATIVE »

```
<Cluster
  Name="Negative"
  Color="FF008000">
  <Expression><![CDATA[(Gene > 1 && Gene < 4) && (Control > 0 && Control <
4)]]></Expression>
</Cluster>
```

Ce cluster définit les noyaux qui doivent être considérés **négatifs** selon les critères suivants :

- 2 ou 3 copies de *HER2*
- 1, 2 ou 3 copies du CEP17 (certaines monosomies du chromosome 17 se retrouvent dans cette catégorie)

Ces noyaux seront colorés en vert.

A.2.2 CLUSTER « MONOSOMY »

```
<Cluster
  Name="Monosomy"
  Color="FFF5F5DC">
  <Expression><![CDATA[(Gene==1 && Control == 1) | (Gene==0 && Control
==1) | (Gene==1 && Control==0)]]></Expression>
</Cluster>
```

Ce cluster définit les noyaux qui doivent être considérés comme présentant une **monosomie du chromosome 17** selon les critères suivants :

- Une copie de *HER2* et une copie du CEP17
- OU une copie du CEP17 et aucune copie de *HER2*
- OU une copie de *HER2* et aucune copie du CEP17

Ces noyaux seront colorés en beige.

A.2.3 CLUSTER « *EQUIVOCAL – POLYSOMY* »

```
<Cluster
  Name="Equivocal - Polysomy"
  Color="FFFFFFF0">
  <Expression><![CDATA[(Control > 2 && Control < 6) && (Gene > 3 && Gene <
6)]]></Expression>
</Cluster>
```

Ce cluster définit les noyaux qui doivent être considérés comme **équivoques** ou présentant une **polysomie du chromosome 17** selon les critères suivants :

- 3 à 5 copies du CEP17
- 4 ou 5 copies de *HER2*

Ces noyaux seront colorés en jaune.

A.2.4 CLUSTER « *AMPLIFICATION – WEAK* »

```
<Cluster
  Name="Amplification - weak"
  Color="FFFA500">
  <Expression><![CDATA[(Control > 0) && ((Gene == 4 && Gene/Control >= 2) | (Gene
== 5 && Gene/Control >=2))]></Expression>
</Cluster>
```

Ce cluster définit les noyaux qui doivent être considérés comme présentant une **amplification faible** selon les critères suivants :

- Au moins une copie du CEP17
- 4 ou 5 copies de *HER2* et ratio *HER2/CEP17* supérieur ou égal à 2

Ces noyaux seront colorés en orange.

A.2.5 CLUSTER « AMPLIFICATION – STRONG »

```
<Cluster
  Name="Amplification - strong"
  Color="FFFF0000">
  <Expression><![CDATA[(Control > 0 && Control < 4) && ((Gene > 5) &&
(Gene/Control >=2))]]></Expression>
</Cluster>
```

Ce cluster définit les noyaux qui doivent être considérés comme présentant une **amplification forte** selon les critères suivants :

- 1 à 3 copies du CEP17
- Au moins 6 copies de *HER2* avec un ratio *HER2/CEP17* supérieur ou égal à 2

Ces noyaux seront colorés en rouge.

A.2.6 CLUSTER « CEP 17 COAMPLIFICATION – OVERLAPPING »

```
<Cluster
  Name="CEP 17 coamplification - Overlapping"
  Color="FFFFB6C1">
  <Expression><![CDATA[(Gene > 0 && Control > 0) && ((Gene >= 6) &&
(Gene/Control < 2))]]></Expression>
</Cluster>
```

Ce cluster définit les noyaux qui doivent être considérés comme présentant une **co-amplification de *HER2* et du centromère 17** ou correspondant à des **artefacts de superposition** de noyaux selon les critères suivants :

- Au moins une copie de *HER2* et une copie du CEP17
- Au moins 6 copies de *HER2* avec un ratio *HER2/CEP17* inférieur à 2

Ces noyaux seront colorés en rouge.

A.2.7 CLUSTER « OTHER.ARTEFACT »

```
<Cluster
  Name="Other/Artefact"
  Color="FFFFFFF7">
  <Expression><![CDATA[true]]></Expression>
</Cluster>
```

Ce cluster définit les noyaux qui doivent être considérés comme **artéfactuels** selon les critères suivants :

- Noyau qui ne correspond à aucune autre catégorie

Ces noyaux seront colorés en blanc.

A.3 ALGORITHME « CYTO »

Cet algorithme correspond à une approche différente de l'interprétation de résultats de FISH : l'approche des cytogénéticiens. Elle consiste à répertorier l'ensemble des profils de noyaux existants et à les classer selon le phénomène biologique en cause. Nous avons développé un algorithme basé sur le modèle utilisé par l'équipe de cytogénétique de l'Institut de Cancérologie Gustave Roussy à Villejuif (Tableau 9). Une suspicion de monosomie du chromosome 17 est rapportée dans le compte rendu quand les noyaux monosomiques (présentant soit une copie de *HER2* et une copie du CEP17, soit uniquement une copie de *HER2*, soit uniquement une copie du CEP17) représentent plus de 50% de la population de cellules tumorales infiltrantes. Dans ce cas, le ratio *HER2/CEP17* n'est pas calculé. Le fichier créé est nommé « ProfilIQHER2_cyto_CF.xml » et se situe dans le répertoire C:\ProgramData\3DHISTECH\IA\XML. La définition des règles se situe entre les balises <Probe et </Probe>.

Tableau 9 : Exemple de grille de lecture d'une FISH *HER2* en cytogénétique. N : normal ; G : gain ; P : polysomie ; A : amplification

CEP17 (vert)	2	2	2	2	3	3	3	3	4	4	4	4	5-6	5-6
<i>HER2</i> (rouge)	2	3-4	5-6	7-8	3	4-5	6-7	8-9	4	5-6	7-8	10-12	5-6	8-10
Nbre de cellules	18	30	14	5	4	2	5	5	2	5	2	3	2	3
Statut du gène	N	G	A	A	P	G	A	A	P	G	G	A	P	G

A.3.1 CLUSTER « NEGATIVE »

```
<Cluster
  Name="Negative"
  Color="FF008000">
  <Expression><![CDATA[(Gene == 2) && ((Control == 2) | (Control ==
1))] ]></Expression>
</Cluster>
```

Ce cluster définit les noyaux qui doivent être considérés **négatifs** selon les critères suivants :

- 2 copies de *HER2*
- 1 ou 2 copies du CEP17

Ces noyaux seront colorés en vert.

A.3.2 CLUSTER « MONOSOMY »

Sa définition est identique au cluster « Monosomy » de l'algorithme « adapt ».

```
<Cluster
  Name="Monosomy"
  Color="FFF5F5DC">
  <Expression><![CDATA[(Gene==1 && Control == 1) | (Gene==0 && Control
==1) | (Gene==1 && Control==0)] ]></Expression>
</Cluster>
```

Ce cluster définit les noyaux qui doivent être considérés comme présentant une **monosomie du chromosome 17** selon les critères suivants :

- Une copie de *HER2* et une copie du CEP17
- OU une copie du CEP17 et aucune copie de *HER2*
- OU une copie de *HER2* et aucune copie du CEP17

Ces noyaux seront colorés en beige.

A.3.3 CLUSTER « POLYSOMY »

```
<Cluster
  Name="Polysomy"
  Color="FFFFFFF0">
  <Expression><![CDATA[(Gene > 2 && Gene < 7) && (Control ==
Gene)]]></Expression>
</Cluster>
```

Ce cluster définit les noyaux qui doivent être considérés comme présentant une **polysomie du chromosome 17** selon les critères suivants :

- 3 à 6 copies de *HER2*
- Nombre de copies du CEP17 = nombre de copies de *HER2*

Ces noyaux seront colorés en jaune.

A.3.4 CLUSTER « GAIN »

```
<Cluster
  Name="Gain"
  Color="FFFA500">
  <Expression><![CDATA[(Gene > 2) && ((Gene/Control <= 2) && (Gene/Control >
1))]]></Expression>
</Cluster>
```

Ce cluster définit les noyaux qui doivent être considérés comme présentant un **gain du chromosome 17** selon les critères suivants :

- 3 copies ou plus de *HER2*
- Ratio *HER2*/CEP17 supérieur à 1 et inférieur ou égal à 2

Ces noyaux seront colorés en orange.

A.3.5 CLUSTER « AMPLIFICATION »

```
<Cluster
  Name="Amplification"
  Color="FFFF0000">
  <Expression><![CDATA[(Gene > 4) && (Gene/Control > 2)]]></Expression>
</Cluster>
```

Ce cluster définit les noyaux qui doivent être considérés comme présentant une **amplification** selon les critères suivants :

- 5 copies ou plus de *HER2*
- Ratio *HER2/CEP17* supérieur à 2

Ces noyaux seront colorés en rouge.

A.3.6 CLUSTER « OTHER/ARTEFACT »

```
<Cluster
  Name="Other/Artefact"
  Color="FFFFFFF" >
  <Expression><![CDATA[true]]></Expression>
</Cluster>
```

Ce cluster définit les noyaux qui doivent être considérés comme **artéfactuels** selon les critères suivants :

- Noyau qui ne correspond à aucune autre catégorie

Ces noyaux seront colorés en blanc.

A.4 AUTRES CONSIDERATIONS SUR LES ALGORITHMES

Outre ces « règles » de classification des noyaux, ces algorithmes renferment également des critères non accessibles *via* l'interface utilisateur du logiciel. Citons notamment deux réglages :

A.4.1 FILTRE NUCLEAIRE PAR FORME

```
<Nuclei_filter_by_shape
  Filter="False"
  Minimum="0"
  Maximum="0" />
```

Ce réglage est situé au sein du paragraphe `NucleiSegmentationParameters`. Il pourrait permettre de donner un seuil concernant la variable « Shape factor » pour la segmentation nucléaire. Ce réglage n'a pas été modifié pour notre travail mais cette possibilité sera discutée plus loin.

A.4.2 PARAMETRE DE DISTANCE DE FUSION DES SIGNAUX

```
<FusionDistanceParameters
  AutoFusionDistance="True"
  FusionDistance="1" />
```

Ce réglage est situé au sein du paragraphe `ProbeProperties`. Il pourrait permettre d'adapter la distance maximale autorisée entre deux signaux pour qu'ils soient considérés comme une seule copie du gène. Ce réglage n'a pas été modifié pour notre travail.

B. PARAMETRES DE L'ANALYSE D'IMAGE

B.1 INTERFACE DU LOGICIEL ET VARIABLES D'ENTREE

Après le chargement de la lame et l'ouverture du module FISHQuant dans le QuantCenter, l'interface du logiciel se présente comme le montre la Figure 20. Sur la droite de l'écran, si l'option « Scenario Builder » est activée, nous pouvons visualiser en temps réel un aperçu approximatif des résultats de segmentation nucléaire et de classification des noyaux obtenus avec les réglages définis.

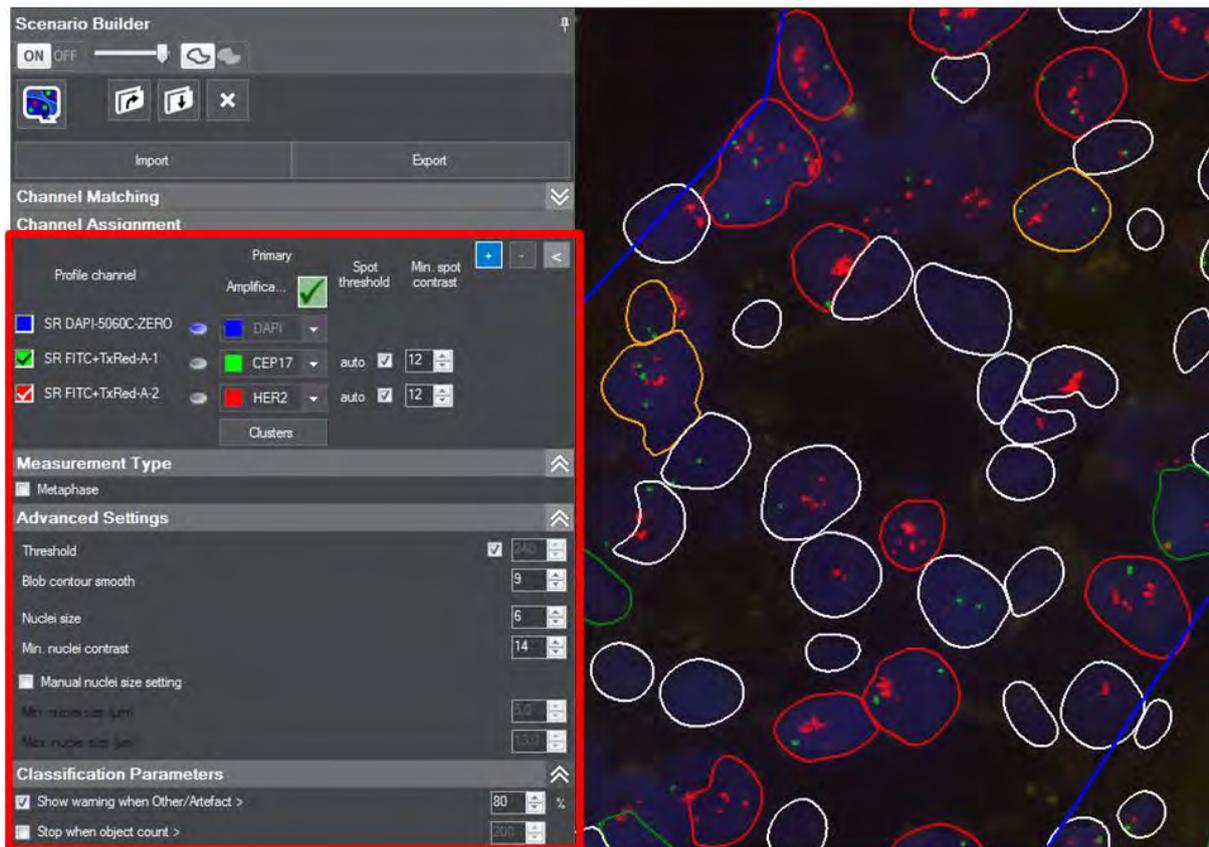


Figure 20 : Interface du module FISHQuant du logiciel 3DHTECH QuantCenter

La partie gauche de l'écran comprend de multiples réglages (cadre rouge, Figure 20). Nous considérerons ces réglages comme les variables d'entrée de l'analyse d'image, étant donné qu'ils précèdent et conditionnent la mise en œuvre des algorithmes de segmentation et de classification des noyaux :

- La partie « Channel Assignment » définit les canaux du profil de fluorochromes utilisé et nous propose de définir le seuil de sensibilité de détection des signaux *HER2* et *CEP17*. Par défaut, le mode « automatique » est coché. Nous n'avons pas modifié ce paramètre dans notre travail.
- La partie « Advanced Settings » définit :
 - Le **seuil de détection des noyaux** (canal DAPI), que nous avons laissé, par défaut, en automatique dans notre travail.
 - Le **lissage des contours** : il s'agit d'un index situé entre 1 et 15 permettant un adoucissement des contours des noyaux segmentés. Nous l'avons fixé à 9 pour l'ensemble de notre travail.
 - La **taille des noyaux** : cette taille est exprimée en μm , sans plus de précision sur

la méthode de mesure. Elle donne une approximation de la mesure moyenne des noyaux après segmentation. Au cours de notre travail, nous avons modifié ce paramètre de la valeur 5 à la valeur 11 afin de rendre compte de l'impact de cette taille sur les résultats obtenus.

- Le **contraste minimal des noyaux** : cette valeur diminue drastiquement le nombre de noyaux segmentés quand on l'augmente, et entraîne des erreurs de segmentation quand on le diminue tout en augmentant la part de noyaux artéfactuels (Figure 21). La valeur « 14 » définie par défaut et conseillée par le fabricant a été maintenue pour l'ensemble du travail.
- Le **réglage manuel de taille des noyaux** : ce réglage facultatif permet de définir les tailles minimale et maximale des noyaux segmentés. Notre expérience montre un comportement imprévisible de l'algorithme de segmentation lors de l'utilisation de ce réglage (données non présentées). Nous n'avons donc pas utilisé ce réglage pour notre travail.

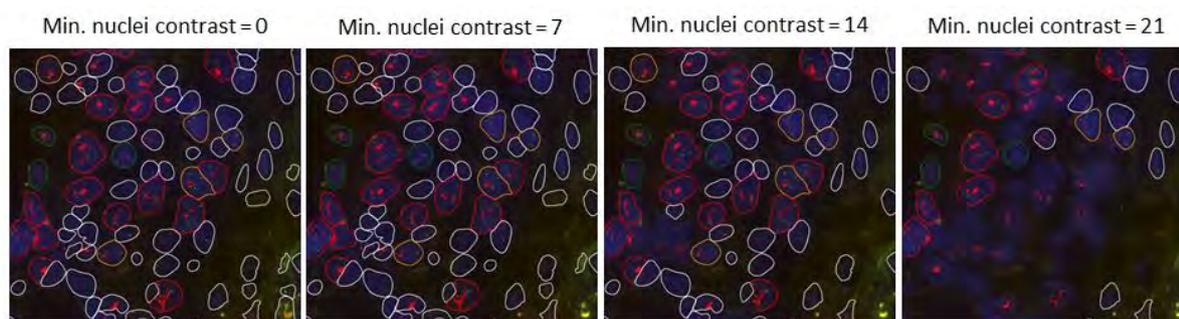


Figure 21 : Modification de la segmentation nucléaire en fonction de la valeur de la variable "Min. nuclei contrast". Echantillon "D10", algorithme « cyto ». Les noyaux cerclés de blanc sont classés comme artéfactuels. Les noyaux cerclés de rouge sont classés comme amplifiés.

- La partie « Classification Parameters » permet de définir une alerte quand le nombre de noyaux artéfactuels dépasse un certain pourcentage, et de définir un nombre d'objet à compter au-delà duquel l'analyse d'image est interrompue. Pour notre travail, nous avons laissé les valeurs par défaut pour ces réglages.

B.2 EXPORTATION DES DONNEES ET VARIABLES DE SORTIE

Les données d'analyse d'image peuvent être exportées sous trois formes différentes dans le module FISHQuant :

- Les **données générales** comprennent le nombre d'objets classés dans chaque catégorie (selon les règles de l'algorithme de classification des noyaux) et leur pourcentage par

rapport à l'ensemble des noyaux segmentés.

- Les **données par objet** comprennent les données détaillées de chaque objet (ou noyau) segmenté sous forme de multiples variables que nous nommerons « variables de sortie » :
 - La **surface** de l'objet.
 - Le **périmètre** de l'objet.
 - Le **facteur de forme** de l'objet : compris entre 0 et 1. Un cercle parfait ayant la valeur maximale de 1.
 - Le **nombre**, la **surface moyenne** et le **diamètre moyen des signaux CEP17** dans l'objet.
 - Le **nombre**, la **surface moyenne** et le **diamètre moyen des signaux HER2** dans l'objet.

Au cours de ce travail, nous avons créé d'autres variables de sortie à partir de calculs sur les variables de base fournies par le logiciel :

- La **surface totale des signaux HER2 et CEP17** par objet.
- Les **ratios HER2/CEP17** en termes de nombres de signaux et de surface totale de ces signaux par objet. Pour pouvoir affirmer l'intérêt éventuel du ratio *HER2/CEP17* en terme de surface totale de ces signaux par noyau, nous avons montré que la taille moyenne des signaux *HER2* et *CEP17* avait le même ordre de grandeur sur plus de 3 000 noyaux segmentés à partir de l'échantillon « D11 » correspondant au tissu amygdalien (témoin négatif). On mesurait une surface de $0,53 \mu\text{m}^2$ pour les signaux *CEP17* et $0,54 \mu\text{m}^2$ pour les signaux *HER2*.
- Les **données de répartition** des différentes combinaisons de nombres de signaux *HER2* et *CEP17* au sein de chaque classe. Ces données de répartition n'ont pas été utilisées dans notre travail. Ce point sera abordé dans le chapitre discussion.

C. ETAPE TECHNIQUE

L'étape technique avait pour but de préparer au mieux l'analyse d'image de la cohorte de validation. Plusieurs objectifs étaient définis :

- Sur un échantillon comportant une zone "témoin positif" et une zone "témoin négatif" :
 - Evaluer la validité intrinsèque de chaque algorithme
 - Evaluer la validité intrinsèque des différents réglages de taille des noyaux
 - Evaluer les ajustements post-analyse pertinents selon les variables de sortie
- Sur l'ensemble de la cohorte technique
 - Evaluer le comportement global en termes de classification des noyaux
 - Apprécier les artefacts courants de l'analyse d'image de lames de FISH et leur impact possible sur les résultats d'analyse
 - Evaluer le nombre moyen et la surface moyenne des signaux *HER2* par noyau pour chaque cas afin de le comparer au nombre moyen de copies de *HER2* en PCR quantitative, afin de valider l'évaluation automatisée du nombre de copie de *HER2* par noyau.

C.1 DESCRIPTION DE LA COHORTE TECHNIQUE

La cohorte technique était composée de 14 tumeurs du sein, de deux contrôles positifs sous la forme de cyto blocs de lignées cellulaires surexprimant *HER2* : ZR75.30 et SKBR-3 (cas E13 et F17 respectivement), et d'un témoin négatif correspondant à du tissu amygdalien. L'ensemble des prélèvements était fixé au formol et inclus en paraffine. Les tumeurs mammaires provenaient de patientes prises en charge par tumorectomie (n = 8), mastectomie (n = 5) ou métastasectomie (n=1) à l'Institut Claudius Regaud ou à l'Institut Universitaire du Cancer – Oncopole de Toulouse entre 2014 et 2016. Les caractéristiques cliniques et biologiques des patientes de la cohorte technique sont résumées dans le Tableau 10. L'anisocaryose, deuxième objet de l'évaluation du grade histologique selon Elston et Ellis, était cotée à 2 dans quatre tumeurs sur les 13 tumeurs gradables et était cotée à 3 dans les 11 autres tumeurs gradables (métastasectomie exclue). Les deux cyto blocs de lignées cellulaires ont été créés par le Dr Magali Lacroix-Triki à l'Institut Claudius Regaud en 2007. Le tissu amygdalien provient d'un patient opéré au Centre Hospitalo-Universitaire Toulouse – Rangueil en 2016 pour amygdalite chronique.

C.2 DESCRIPTION DU CAS « D10 » : TEMOIN POSITIF ET NEGATIF

L'échantillon « D10 » présentait deux foyers épithéliaux distincts et bien individualisables : un

foyer de carcinome infiltrant avec amplification forte de *HER2* et un foyer de glandes mammaires péri-tumorales, qui, par définition, ne présentait pas d'amplification de *HER2* (Figure 22). La qualité technique de la lame de FISH était bonne (peu de bruit de fond, peu d'autofluorescence) et toutes les caractéristiques de la phase pré-analytique, du tissu à la lame, étaient comparables.

Deux zones ont été cerclées :

- Témoin positif : zone de 43 021 μm^2 représentée dans la Figure 22C.
- Témoin négatif : zone de 19 290 μm^2 représentée dans la Figure 22D.

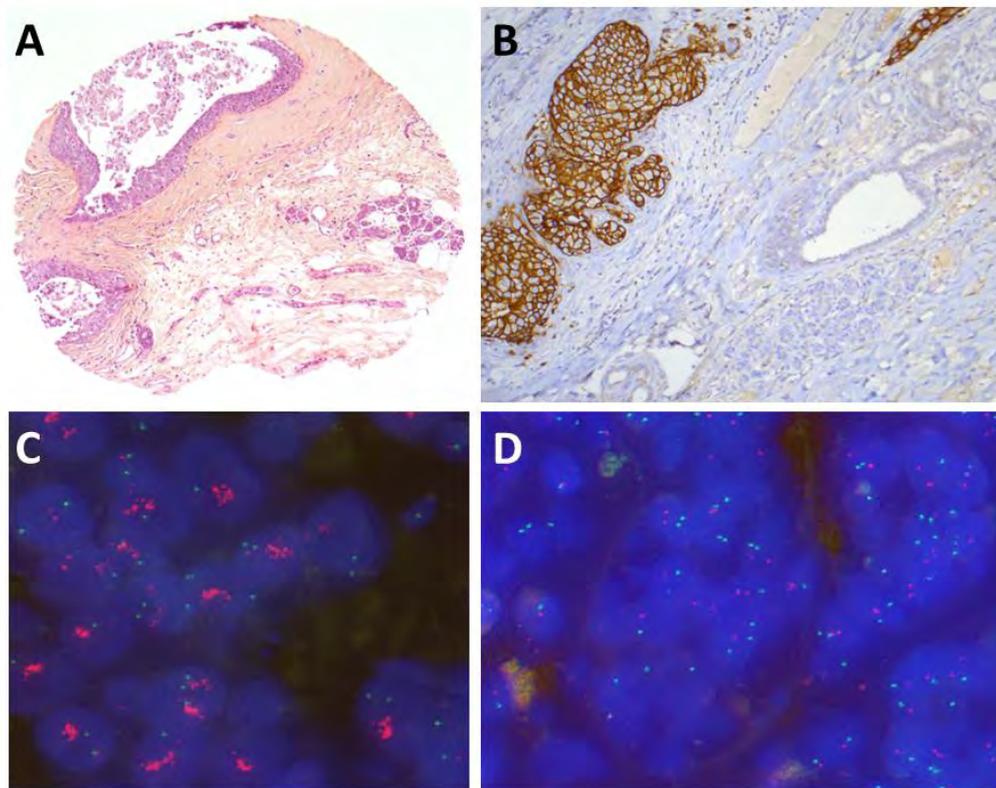


Figure 22 : Echampion D10. A : présence de carcinome infiltrant en haut et à gauche (p63 négative) et d'un foyer de glandes mammaires normales en bas à droite (coloration hématoxyline - éosine) ; B : immunohistochimie avec l'anticorps anti-HER2 (score 3+ sur les cellules tumorales et aucun marquage des glandes normales) ; C : zone "témoin positif" en FISH avec clusters *HER2* ; D : zone "témoin négatif" en FISH.

Tableau 10 : Caractéristiques cliniques et biologiques des cas de la cohorte technique. CLI : Carcinome lobulaire infiltrant classique ; CLIP : Carcinome lobulaire infiltrant pléomorphe ; NST : Carcinome infiltrant de type non spécifique ; NA : Non Applicable ; NR : Non Renseigné.

No	Age (an)	Taille (mm)	Type (OMS)	Grade*	Immunohistochimie HER2		Hybridation in situ <i>HER2 (DISH)</i>				
					Intensité de marquage**	Cellules marquées (%)	Nombre de copies de <i>HER2</i>	Nombre de copies du CEP17	Ratio <i>HER2/CEP17</i>	Signaux <i>HER2</i> en clusters	Conclusion
A1	44	25	NST	III (3)	2	80	5,6	1,6	3,5	Absence	Amplification faible
A2	64	6	NST	II (2)	2	50	1,9	1,09	1,7	Absence	Suspicion de monosomie, HER2-
A3	58	7	NST	II (2)	2	30	2	1,45	1,37	Absence	Suspicion de monosomie, HER2-
B4	76	6	NST	II (3)	3	100	15	3	5	Gros clusters	Amplification
B5	70	12	NST	II (3)	2	30	4,42	3,32	1,33	Absence	Equivoque
B6	59	5	NST	III (3)	2	80	6,7	2,6	2,53	Petits clusters	Amplification
C7	64	12	NST	III (3)	3	90	15	3	5	NR	Amplification
C8	71	50	CLIP	II (3)	3	90	4,3	2,5	1,7	Petits clusters	Equivoque
C9	37	40	NST	III (2)	3	70	7,9	1,65	4,78	Gros clusters	Amplification
D10	74	10	NST	III (3)	3	100	NA	NA	NA	NA	NA
D12	76	NR	NA	NA	3	100	6,2	1,96	3,16	Petits clusters	Amplification
E14	54	18	NST	III (3)	2	20	4,6	1,85	2,48	Absence	Amplification faible
E15	86	22	Micropapillaire	III (3)	2	50	3,1	4	0,775	Absence	Suspicion de polysomie, HER2-
F16	80	55	Mixte CLI et NST	II (2)	2	10	1,42	1	1,42	Absence	Suspicion de monosomie, HER2-

* le chiffre entre parenthèses correspond au grade nucléaire

** marquage complet

C.3 VALIDITE INTRINSEQUE DE L'ANALYSE D'IMAGE POUR LA DETECTION DES NOYAUX NEGATIFS ET POSITIFS

Le but de cette partie de notre travail était de déterminer la sensibilité et la spécificité de l'analyse d'image pour la détection des noyaux négatifs et positifs. La relecture manuelle réalisée après l'analyse d'image permettait de classer chaque noyau en vrai positif, vrai négatif, faux positif ou faux négatif. Les critères de classement sont détaillés dans le Tableau 11.

Tableau 11 : Classification des noyaux négatifs et positifs. FN : faux négatif ; FP : faux positif ; VN : vrai négatif ; VP : vrai positif

Classification	Cluster défini par analyse d'image	Cluster défini manuellement
<i>Noyaux négatifs</i>		
VP	Négatif ou Monosomie	Négatif ou Monosomie
VN	Autre que Négatif ou Monosomie	Autre que Négatif ou Monosomie
FP	Négatif ou Monosomie	Autre que Négatif ou Monosomie
FN	Autre que Négatif ou Monosomie	Négatif ou Monosomie
<i>Noyaux positifs</i>		
VP	Amplification	Amplification
VN	Autre que Amplification	Autre que Amplification
FP	Amplification	Autre que Amplification
FN	Autre que Amplification	Amplification

C.3.1 RESULTATS DE SEGMENTATION NUCLEAIRE COMMUNS A TOUS LES ALGORITHMES

Comme attendu, l'algorithme de classification des noyaux n'avait pas d'impact sur le nombre de noyaux segmentés. Quel que soit l'algorithme utilisé, l'analyse d'image détectait entre 156 et 207 noyaux au total, dans les zones « témoin négatif » et « témoin positif », pour des réglages de taille des noyaux de 5 et 8 μm respectivement. En moyenne, 192 noyaux étaient détectés.

C.3.2 VALIDITE INTRINSEQUE DE L'ANALYSE D'IMAGE AVEC L'ALGORITHME « FXF »

Les résultats sont résumés dans le Tableau 12. Des discordances en termes de clusters entre l'analyse d'image et la relecture manuelle étaient retrouvées dans 16 à 24% des noyaux, pour des tailles de noyaux de 5 et 6 μm et de 10 μm respectivement. Des discordances en termes d'amplification vs absence d'amplification étaient retrouvées dans 5 à 11% des noyaux, pour des tailles de 6 μm et 9 et 10 μm respectivement. La sensibilité de détection des noyaux négatifs variait entre 98 et 100%, et la spécificité variait entre 86 et 89%. La sensibilité de détection des noyaux positifs variait entre 88 et 100%, et la spécificité variait entre 88 et 94%.

Tableau 12 : Validité intrinsèque de l'analyse d'image avec l'algorithme "FXF". Se : sensibilité ; Sp : spécificité ; VPN : valeur prédictive négative ; VPP : valeur prédictive positive.

	Taille des noyaux (μm)						
	5	6	7	8	9	10	11
Nombre de noyaux détectés	156	187	196	207	203	199	199
Nombre de discordances (clusters) n (%)	25 (16)	30 (16)	36 (18)	38 (18)	43 (21)	47 (24)	42 (21)
Nombre de discordances (amplification) n (%)	12 (8)	10 (5)	14 (7)	16 (8)	22 (11)	21 (11)	18 (9)
Détection des noyaux négatifs							
Se	98%	98%	98%	98%	100%	100%	100%
Sp	88%	87%	86%	88%	89%	88%	89%
VPP	81%	79%	78%	78%	76%	70%	74%
VPN	99%	99%	99%	99%	100%	100%	100%
Détection des noyaux positifs							
Se	88%	96%	93%	100%	92%	95%	97%
Sp	93%	94%	92%	91%	88%	88%	90%
VPP	60%	71%	67%	67%	65%	64%	68%
VPN	98%	99%	99%	100%	98%	99%	99%

C.3.3 VALIDITE INTRINSEQUE DE L'ANALYSE D'IMAGE AVEC L'ALGORITHME « ADAPT »

Les résultats sont résumés dans le Tableau 13. Des discordances en termes de clusters entre l'analyse d'image et la relecture manuelle étaient retrouvées dans 13 à 21% des noyaux, pour des tailles de noyaux de 5 μm et 9 μm respectivement. Des discordances en termes d'amplification vs absence d'amplification étaient retrouvées dans 5 à 9% des noyaux, pour des tailles de 6 et 9 μm respectivement. La sensibilité de détection des noyaux négatifs variait entre 98 et 100%, et la spécificité variait entre 88 et 91%. La sensibilité de détection des noyaux positifs variait entre 86 et 97%, et la spécificité variait entre 92 et 95%.

Tableau 13 : Validité intrinsèque de l'analyse d'image avec l'algorithme "adapt". Se : sensibilité ; Sp : spécificité ; VPN : valeur prédictive négative ; VPP : valeur prédictive positive.

	Taille des noyaux (μm)						
	5	6	7	8	9	10	11
Nombre de noyaux détectés	156	187	196	207	203	199	199
Nombre de discordances (clusters) n (%)	21 (13)	30 (16)	33 (16)	36 (17)	42 (21)	37 (18)	39 (20)
Nombre de discordances (amplification) n (%)	9 (6)	10 (5)	12 (6)	13 (6)	18 (9)	15 (8)	13 (7)
Détection des noyaux négatifs							
Se	98%	99%	99%	98%	100%	100%	100%
Sp	91%	88%	89%	89%	91%	91%	88%
VPP	89%	83%	85%	81%	83%	82%	76%
VPN	99%	99%	99%	99%	100%	100%	100%
Détection des noyaux positifs							
Se	88%	92%	93%	97%	86%	92%	92%
Sp	95%	95%	93%	93%	92%	93%	94%
VPP	68%	73%	69%	72%	71%	74%	77%
VPN	99%	99%	99%	99%	97%	98%	98%

C.3.4 VALIDITE INTRINSEQUE DE L'ANALYSE D'IMAGE AVEC L'ALGORITHME « CYTO »

Les résultats sont résumés dans le Tableau 14. Des discordances en termes de clusters entre l'analyse d'image et la relecture manuelle étaient retrouvées dans 12 à 20% des noyaux, pour des tailles de noyaux de 5 et 6 μm et 10 μm respectivement. Des discordances en termes d'amplification vs absence d'amplification étaient retrouvées dans 4 à 10% des noyaux, pour des tailles de 5 μm et 7 μm respectivement. La sensibilité de détection des noyaux négatifs variait entre 94 et 100%, et la spécificité variait entre 96 et 99%. La sensibilité de détection des noyaux positifs variait entre 87 et 100%, et la spécificité variait entre 90 et 96%.

Tableau 14 : Validité intrinsèque de l'analyse d'image avec l'algorithme "cyto". Se : sensibilité ; Sp : spécificité ; VPN : valeur prédictive négative ; VPP : valeur prédictive positive.

	Taille des noyaux (μm)						
	5	6	7	8	9	10	11
Nombre de noyaux détectés	156	187	196	207	203	199	199
Nombre de discordances (clusters) n (%)	18 (12)	22 (12)	32 (16)	38 (18)	37 (18)	40 (20)	33 (17)
Nombre de discordances (amplification) n (%)	7 (4)	11 (6)	19 (10)	17 (8)	19 (9)	17 (9)	14 (7)
Détection des noyaux négatifs							
Se	97%	98%	98%	96%	98%	94%	100%
Sp	97%	96%	96%	98%	99%	98%	98%
VPP	95%	92%	92%	95%	98%	94%	94%
VPN	98%	99%	99%	99%	99%	98%	100%
Détection des noyaux positifs							
Se	94%	100%	90%	94%	87%	87%	87%
Sp	96%	93%	90%	91%	91%	93%	93%
VPP	74%	68%	62%	69%	71%	74%	74%
VPN	99%	100%	98%	99%	97%	97%	97%

C.3.5 SYNTHÈSE DE LA VALIDITÉ INTRINÈQUE DE L'ANALYSE D'IMAGE

Nous avons comparé les proportions de discordances en termes de clusters et de résultats « amplification vs absence d'amplification » obtenues avec les différents algorithmes et pour différentes tailles de noyaux. On ne retrouvait pas de différence significative entre les proportions de noyaux discordants en termes d'amplification vs absence d'amplification, que ce soit pour les différents algorithmes ($p = 0,24$) ou pour les différentes tailles de noyaux ($p = 0,11$). On ne retrouvait pas non plus de différence significative entre les proportions de noyaux discordants en termes de clusters entre les différents algorithmes ($p = 0,12$). En revanche, on retrouvait une différence significative entre les proportions de noyaux discordants en termes de clusters pour les différentes tailles de noyaux ($\chi^2 = 15,9$; $p = 0,01$). L'algorithme « cyto » était associé à un nombre plus faible de discordances en termes de clusters par rapport aux autres algorithmes (non significatif). De la même manière, les tailles de noyaux 5 et 6 μm étaient significativement associées à un nombre plus faible de discordances de clusters que les autres tailles de noyaux. Les tailles de noyaux 9 et 10 μm étaient associées à plus de discordances de clusters.

Les données de sensibilité et de spécificité de l'analyse d'image pour la reconnaissance des noyaux négatifs d'une part, et positifs d'autre part sont synthétisées dans la Figure 23. Les sensibilités et spécificités de détection des noyaux négatifs et positifs variaient entre 86 et 100%. Le meilleur compromis entre les quatre valeurs correspondait aux résultats obtenus avec l'algorithme « cyto » et des tailles de noyaux de 5 μm et 6 μm . La taille de noyaux 6 μm apportait l'avantage d'un plus grand nombre de noyaux détectés pour une proportion de discordances comparable. Le meilleur compromis retenu pour la suite de notre travail était donc l'utilisation de l'algorithme « cyto » associé à un réglage de taille des noyaux à 6 μm .

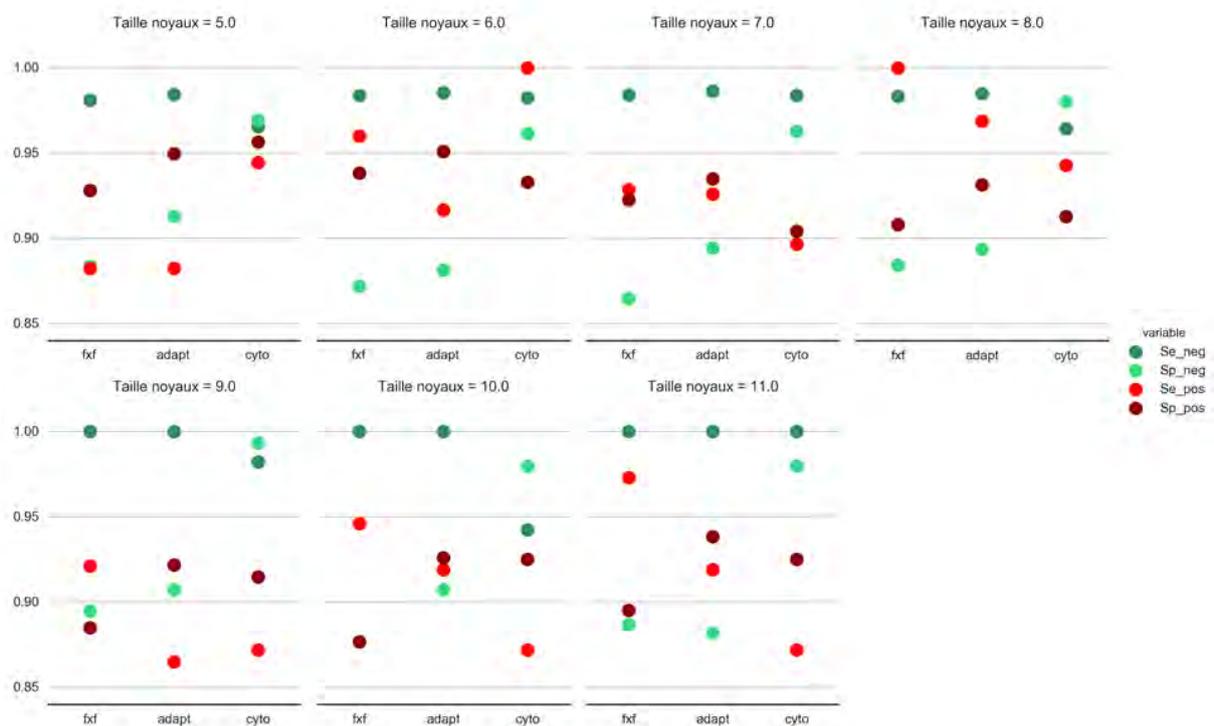


Figure 23 : Synthèse des données de validité intrinsèque de l'analyse d'image pour la détection des noyaux positifs et négatifs. Se_neg et Sp_neg : sensibilité et spécificité de détection des noyaux négatifs ; Se_pos et Sp_pos : sensibilité et spécificité de détection des noyaux positifs.

C.4 CARACTERISTIQUES DES NOYAUX MAL CLASSES PAR L'ANALYSE D'IMAGE

Afin de définir les ajustements post-analyse d'image les plus pertinents, nous avons étudié les caractéristiques des noyaux mal classés par l'analyse d'image.

C.4.1 CARACTERISTIQUES DES NOYAUX CLASSES DANS LE CLUSTER « AMPLIFICATION » EN ANALYSE D'IMAGE

On ne retrouvait pas de différence significative entre les noyaux vrais positifs (classés également dans le cluster « Amplification » en relecture manuelle) et les noyaux faux positifs (reclassés dans un cluster autre que « Amplification » en relecture manuelle) pour les variables suivantes : surface moyenne et totale et diamètre moyen des signaux CEP17, ratio surface des signaux CEP17/surface du noyau, nombre de signaux *HER2* et surface totale des signaux *HER2*. En revanche, on retrouvait des différences significatives entre les noyaux vrais positifs et les noyaux vrais négatifs pour les variables suivantes : surface du noyau ($p = 0,0009$), périmètre du noyau ($p < 0,0001$), nombre de signaux CEP17 ($p = 0,003$), facteur de forme du noyau ($p < 0,0001$), surface et diamètre moyens des signaux *HER2* ($p = 0,001$), ratio surface des signaux *HER2*/surface du noyau ($p = 0,01$), ratios *HER2*/CEP17 en termes de nombre et de surface des signaux *HER2* et CEP17 ($p < 0,0001$). Les différences les plus significatives sont représentées dans la Figure 24.

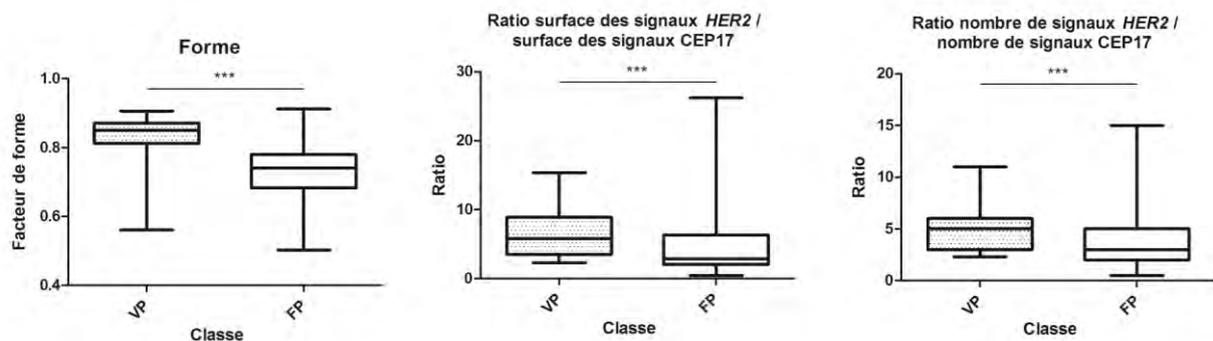


Figure 24 : Comparaison des noyaux vrais positifs et faux positifs du cluster "Amplification". *** : $p < 0,0001$; VP : vrais positifs ; FP : faux positifs.

Nous avons défini un seuil pour la variable « Forme » permettant d'exclure un maximum de noyaux faux positifs tout en conservant une bonne sensibilité des noyaux vrais positifs. La courbe ROC obtenue est présentée dans la Figure 25. L'aire sous la courbe était de 0,89. Un seuil fixé à 0,8 permettait d'obtenir une sensibilité et une spécificité de détection des noyaux positifs de 83%.

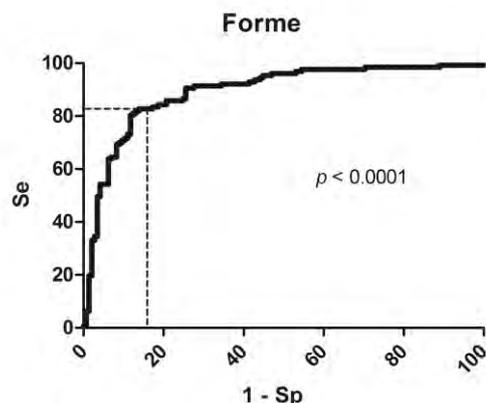


Figure 25 : Courbe ROC de la validité intrinsèque de la variable "Forme" pour la détection des noyaux positifs. Le trait pointillé représente l'abscisse et l'ordonnée du point seuil = 0,8. Se : sensibilité ; Sp : spécificité.

C.4.2 CARACTERISTIQUES DES NOYAUX CLASSES DANS LES CLUSTERS « NEGATIVE » ET « MONOSOMIE » EN ANALYSE D'IMAGE

On ne retrouvait pas de différence significative entre les noyaux vrais positifs (classés également dans le cluster « Negative » ou dans le cluster « Monosomie » en relecture manuelle) et les noyaux faux positifs (reclassés dans un cluster autre que « Negative » ou « Monosomie » en relecture manuelle) pour les variables suivantes : surface et diamètre moyens des signaux CEP17 et HER2, ratio surface des signaux HER2/surface du noyau. En revanche, on retrouvait des différences significatives entre les noyaux vrais positifs et les noyaux vrais négatifs pour les variables suivantes : surface et périmètre du noyau ($p < 0,0001$), facteur de forme du noyau ($p < 0,0001$), nombre de signaux CEP17 et HER2 ($p < 0,0001$), surface totale des signaux CEP17 et HER2 ($p < 0,0001$), ratio surface des signaux CEP17/surface du noyau ($p = 0,04$) et ratios HER2/CEP17 en termes de nombre et de surface des signaux HER2 et CEP17 ($p < 0,0001$ et $p = 0,004$ respectivement). Les différences les plus pertinentes sont représentées au sein de la Figure 26.

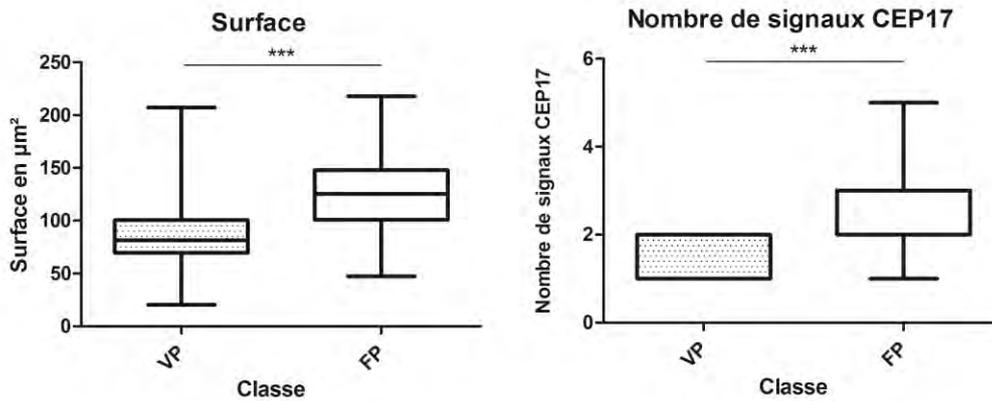


Figure 26 : Comparaison des noyaux vrais positifs et faux positifs des clusters "Negative" et « Monosomie ».
 *** : $p < 0,0001$; VP : vrais positifs ; FP : faux positifs.

La différence observée en termes de surface des noyaux segmentés ne permettait pas de définir un seuil convenable. Ce point sera discuté plus loin. La différence en termes de nombre de signaux CEP17 témoigne du fait que les algorithmes autorisant un classement des noyaux contenant 3 signaux CEP17 ou plus dans le cluster « Negative » (algorithmes « FXF » et « adapt ») entraînent des erreurs de classification de ces noyaux. Dans la grande majorité des cas, ces noyaux avec trois signaux CEP17 étaient reclassés dans le cluster « Other/Artefact ».

D'autre part, la différence observée entre vrais positifs et faux positifs pour la variable « Forme » était moins flagrante que pour les noyaux positifs (classés dans le cluster « Amplification ») (Figure 27, à gauche). Cependant, nous avons évalué l'impact du seuil de 0,8 défini précédemment pour la variable « Forme ». La courbe ROC obtenue est présentée dans la Figure 27 (à droite). L'aire sous la courbe était de 0,74. Un seuil à 0,8 permettait d'obtenir une sensibilité de détection des noyaux positifs de 73% et une spécificité de 58%.

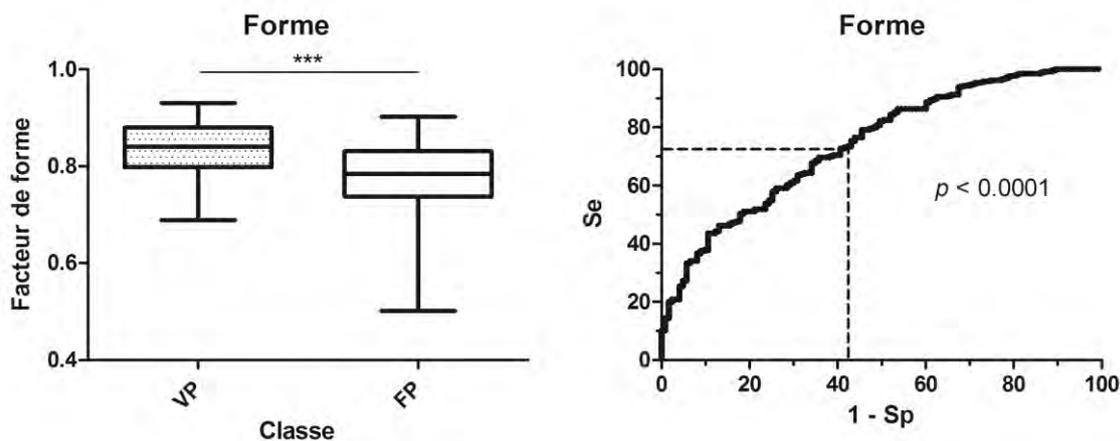


Figure 27 : Comparaison des noyaux vrais positifs et faux positifs des clusters "Negative" et « Monosomie » pour la variable « Forme » (à gauche) et courbe ROC de la validité intrinsèque de la variable "Forme" pour la détection des noyaux négatifs. Le trait pointillé représente l'abscisse et l'ordonnée du point seuil = 0,8. Se : sensibilité ; Sp : spécificité ; *** : $p < 0,0001$; VP : vrais positifs ; FP : faux positifs.

C.5 ANALYSE D'IMAGE DES LAMES DE LA COHORTE TECHNIQUE

Cette analyse a été réalisée en utilisant l'algorithme « cyto » et une taille des noyaux à 6 μm . Les objectifs de cette analyse étaient d'évaluer le comportement global de l'algorithme en termes de classification des noyaux et de poursuivre l'appréciation des artefacts rencontrés couramment lors de l'analyse automatisée de lames de FISH.

C.5.1 CAS NON ANALYSABLES

Deux cas de la cohorte technique n'étaient pas analysables en FISH sur lames digitalisées compte tenu d'artefacts techniques importants : le cas A2 et le cas C8. Ces deux cas présentaient très peu de cellules tumorales (dans les zones prélevées sur les blocs originaux), le cas A2 présentait une autofluorescence verte importante et le cas C8 des signaux très peu visibles (Figure 28).

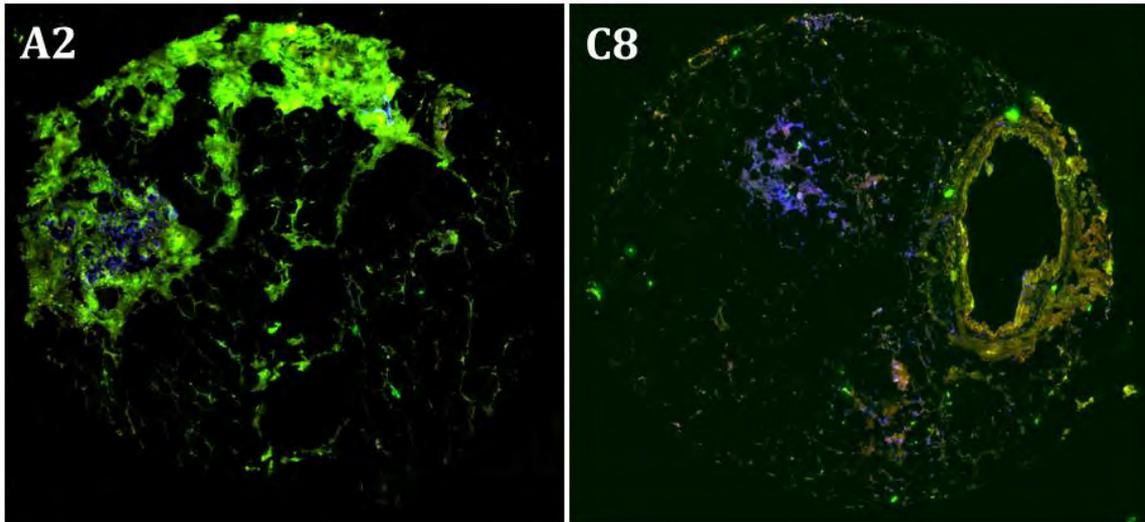


Figure 28 : Aspect en FISH des deux cas non analysables de la cohorte technique

C.5.2 ERREURS DE SEGMENTATION

Les erreurs de segmentation nucléaire étaient très fréquentes et correspondaient à la quasi-totalité des cas de reclassement de noyaux vers le cluster « Other/Artefact » au cours de la relecture manuelle. Ces erreurs de segmentation étaient le plus souvent causées par des chevauchements nucléaires aboutissant à un classement à tort dans les clusters « Ambiguous », « Equivocal – Polysomy », « Gain » ou « Polysomy » (Figure 29). Plus rarement, elles étaient causées par une surdigestion enzymatique (noyaux mités ou en forme d'anneau) (Figure 30).

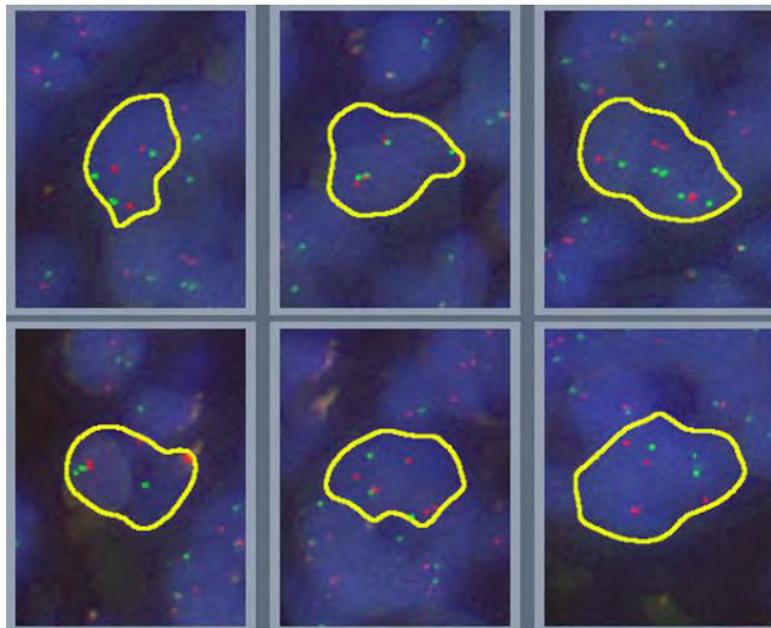


Figure 29 : Exemples d'erreurs de segmentation nucléaire par chevauchement de noyaux aboutissant à un classement à tort dans le cluster "Polysomy"

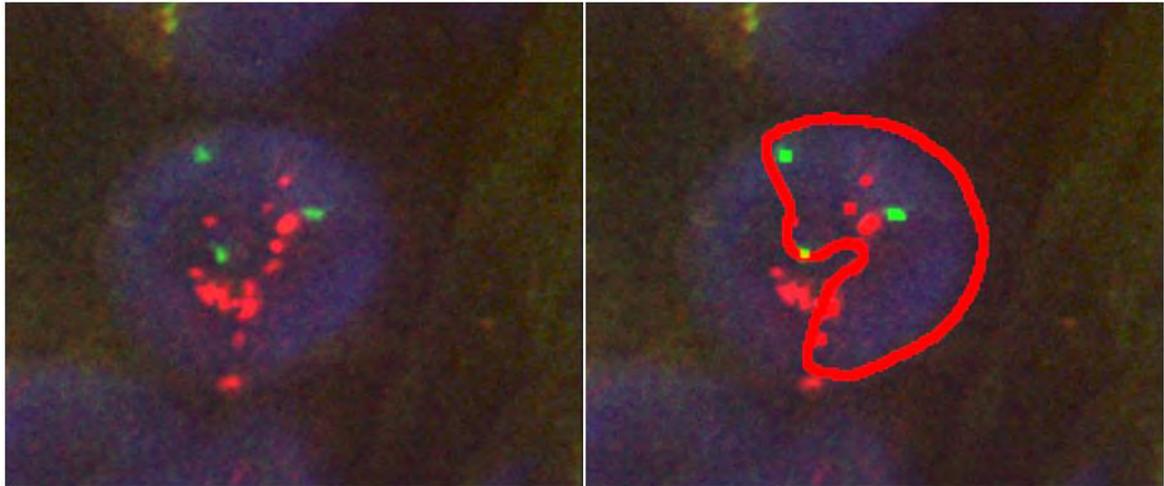


Figure 30 : Exemple d'erreur de segmentation par surdigestion enzymatique. Ce noyau a été reclassé dans le cluster "Other/Artefact" au cours de la relecture manuelle.

C.5.3 ERREURS DE DETECTION DES SIGNAUX CEP17 ET HER2.

Les cas présentant une forte autofluorescence ou un bruit de fond granuleux entraînaient des erreurs de reconnaissance des signaux CEP17 et *HER2* (Figure 31). Dans ce cas, les noyaux étaient reclassés selon le nombre de signaux appréciés par le relecteur.

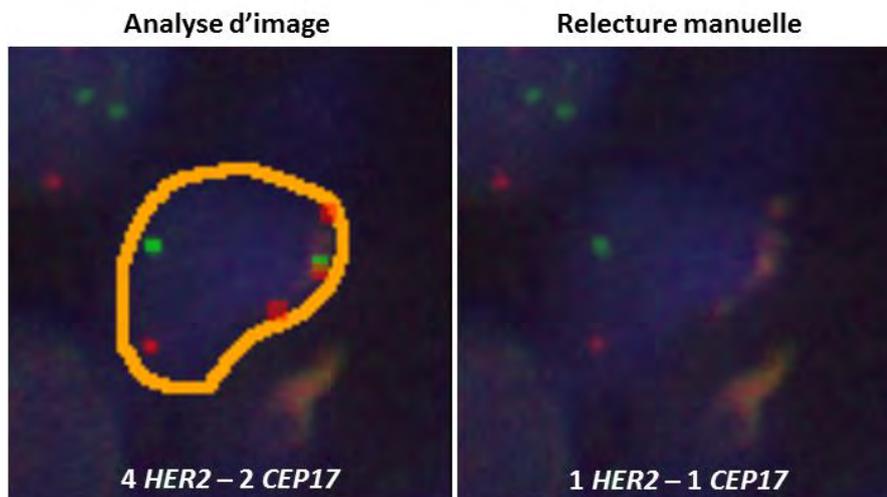


Figure 31 : Exemple de fausse reconnaissance de signaux CEP17 et HER2 dans une cellule dont le cytoplasme présente de l'autofluorescence. Ce cas a été classé en "Gain" par l'analyse d'image et a été reclassé en « Monosomy » en relecture manuelle.

C.5.4 GRANDE PROPORTION DE NOYAUX DANS LE CLUSTER « MONOSOMIE »

Le cluster « Monosomie » comprenait entre 25 et 77% des noyaux interprétables après analyse d'image (moyenne = 49%), noyaux du cluster « Other/Artefact » exclus. Notamment, on notait la présence de 40% des noyaux dans le cluster « Monosomie » après analyse de la lame D11, témoin négatif correspondant à du tissu amygdalien. Ceci témoigne du caractère au moins partiellement artéfactuel de ces noyaux monosomiques. Cette question sera discutée ultérieurement.

C.5.5 DISCORDANCES ENTRE LE NOMBRE DE COPIES DE *HER2* EN ANALYSE D'IMAGE ET LA SURFACE DES SIGNAUX *HER2*

Nous avons estimé qu'il existait parfois une discordance flagrante entre le nombre de signaux *HER2* dénombrés en analyse d'image et la taille des clusters observés (Figure 32). Le plus souvent, cette discordance allait dans le sens d'une sous-estimation du nombre de signaux *HER2*.

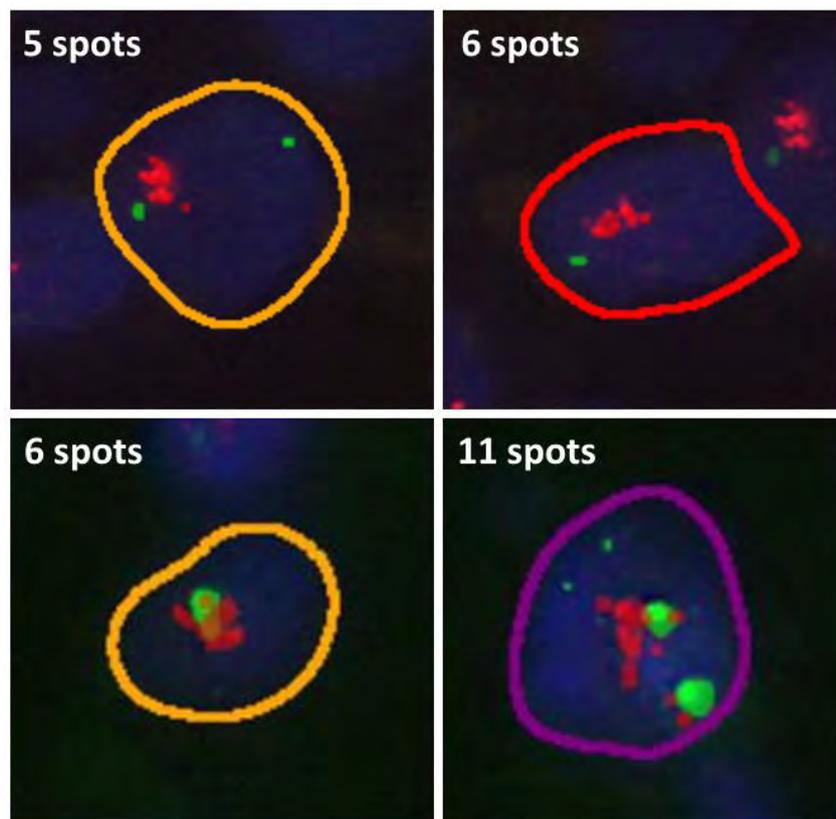


Figure 32 : Exemples de mauvaise estimation du nombre de signaux *HER2* par l'analyse d'image

Nous avons réalisé une PCR quantitative selon le protocole décrit par Jacquemier et coll. afin de mesurer le nombre moyen de copies de *HER2* dans les cas de la cohorte technique. Les données d'extraction d'ADN des blocs de la cohorte technique sont présentées dans le Tableau 15 : Concentration des ADN extraits à partir des blocs de la cohorte technique. Les quantités d'ADN

extraites étaient très disparates (de quelques centièmes de nanogrammes à 1 414 ng). Les résultats de la PCR quantitative sont présentés dans le Tableau 16. Les deux contrôles positifs E13 et F17 avaient un statut HER2 positif en PCR quantitative avec un nombre moyen de copies de *HER2* par noyau de 4,08 et 5,23 ce qui est relativement faible par rapport aux résultats attendus. La concordance globale entre les résultats de PCR quantitative et le diagnostic initial en termes de statut HER2 positif, équivoque ou négatif était modérée avec un coefficient κ de 0,419 (0,093 – 0,744) et un accord retrouvé dans 67% des cas. Les discordances allaient systématiquement dans le sens d'une sous-évaluation du nombre de copies de *HER2* en PCR quantitative par rapport au diagnostic initial.

Il n'y avait pas de différence significative entre le nombre de copies de *HER2* évalué en qPCR et le nombre de signaux *HER2* évalué en analyse d'image. La corrélation statistique était meilleure entre le nombre de copies de *HER2* estimé en qPCR et en analyse d'image qu'entre le nombre de copies de *HER2* estimé en qPCR et la surface des signaux *HER2* en analyse d'image ($r^2 = 0,71$ et $r^2 = 0,66$ respectivement). Enfin, il n'y avait pas de différence significative entre le compte de signaux *HER2* en analyse d'image et le compte obtenu par le calcul Surface totale des signaux *HER2*/0,54, ce dernier nombre correspondant à la taille moyenne d'un signal *HER2* sur l'échantillon D11, témoin négatif.

Tableau 15 : Concentration des ADN extraits à partir des blocs de la cohorte technique

Cas	Concentration d'ADN (ng/ μ L)
A1	8
A2	<0,01
A3	2,06
B4	< 0,01
B5	12,3
B6	18,8
C7	4,11
C8	1,11
C9	1,56
D10	3,43
D11	40,4
D12	3,96
E13	21,9
E14	8,03
E15	18,5
F16	3,91
F17	1,42

Tableau 16 : Résultats de la PCR quantitative réalisée sur les cas de la cohorte technique

Cas	Médiane du nombre de copies de <i>HER2</i>	Médiane du nombre de copies du centromère 17	Rapport <i>HER2</i> / centromère 17	Médiane des contrôles de diploïdie
A1	2,22	2,00	1,11	2
A2	1,75	1,44	1,22	2
A3	1,23	1,68	0,73	2
B4	10,65	1,34	7,92	2
B5	1,85	1,78	1,04	2
B6	2,69	1,26	2,14	2
C7	5,51	1,50	3,68	2
C8	1,37	1,41	0,97	2
C9	5,50	1,54	3,58	2
D10	6,35	1,29	4,93	2
D11	1,59	1,48	1,07	2
D12	2,86	1,61	1,77	2
E13	4,08	1,46	2,79	2
E14	2,00	2,00	1,00	2
E15	1,68	2,84	0,59	2
F16	1,90	1,95	0,97	2
F17	5,24	1,29	4,05	2

C.6 SYNTHÈSE DES RÉSULTATS OBTENUS AVEC LA COHORTE TECHNIQUE

Les résultats obtenus sur la cohorte technique permettaient de considérer que l'algorithme « cyto » donnait de meilleurs résultats en termes de validité intrinsèque de détection des noyaux par l'analyse d'image que les deux autres algorithmes. La taille des noyaux devait être définie à 5 ou 6 μm pour obtenir les meilleurs résultats. Dans la suite de notre travail, nous utiliserons une taille de noyaux de 6 μm .

Les ajustements post-analyse pouvaient concerner deux critères :

- Conserver ou non les noyaux du cluster « Monosomie » dans l'analyse
- Conserver ou non les noyaux dont le facteur de forme est inférieur à 0,8

Dans la suite de notre travail, nous testerons l'impact de ces différents ajustements sur la concordance entre les différentes techniques d'analyse de FISH.

D. ÉTAPE DE VALIDATION

D.1 DESCRIPTION DE LA COHORTE DE VALIDATION

Les données clinico-biologiques des patientes de la cohorte de validation sont résumées dans le Tableau 17. Cette cohorte comportait 30 tumeurs réparties comme suit : 10 tumeurs de score HER2 0 et 1+ en IHC, 15 tumeurs de score HER2 2+ en IHC et 5 tumeurs de score HER2 3+ en IHC. Parmi les 15 cas de score 2+, 5 ne présentaient pas d'amplification de *HER2* en DISH, 5 présentaient une amplification de *HER2* et 5 conservaient un statut équivoque après la DISH. Sur les cinq patientes ayant des tumeurs de statut *HER2* équivoque, deux ont été prises en charge par chirurgie et l'évaluation du statut *HER2* était négative sur pièce opératoire.

D.2 RESULTATS DE L'ANALYSE D'IMAGE ET DE LA LECTURE MANUELLE

Parmi les 30 biopsies mammaires étudiées en FISH par analyse d'image, un cas s'avérait techniquement illisible (autofluorescence majeure) et n'a pu être interprété ni en analyse d'image ni en lecture manuelle de la lame numérisée. Il s'agissait d'un cas initialement considéré comme amplifié en DISH.

D.2.1 LECTURE MANUELLE

Entre 20 et 40 noyaux ont été analysés pour chaque cas. Dix-neuf cas étaient considérés comme négatifs et 10 cas étaient considérés positifs (présentant une amplification de *HER2*). Aucun cas n'était considéré équivoque. Sur les cinq cas considérés équivoques en DISH au diagnostic, 4 étaient considérés négatifs et un était considéré positif en FISH. Un cas était illisible (cas exclu) et trois autres cas présentaient une importante autofluorescence.

D.2.2 LECTURE AUTOMATISEE PAR ANALYSE D'IMAGE

Les zones analysées cerclées manuellement par l'utilisateur mesurait entre 0,03 et 1,74 mm² et permettaient d'analyser en moyenne 1 407 noyaux par cas (cluster « Other/Artefact » exclu). Les noyaux du cluster « Monosomie » représentaient entre 6 et 80% des noyaux analysables (moyenne = 39%). Les noyaux dont le facteur de forme était inférieur à 0,8 représentaient entre 17 et 81% des noyaux analysables (moyenne = 35%). La combinaison des noyaux du clusters « Monosomie » et des noyaux dont le facteur de forme était inférieur à 0,8 représentait entre 35 et 88% des noyaux analysables (moyenne = 62%).

Tableau 17 : Données cliniques et biologiques des patientes de la cohorte de validation

	Total	Expression de HER2						
		0 (n=6)	1+ (n=4)	2+ (n=15)			3+ (n=5)	
				Statut <i>HER2</i> en hybridation in situ				
				Total	Non amplifié (n=5)	Equivoque (n=5)	Amplifié (n=5)	
Age								
Médiane, ans	61,5	68	56,5	58	52	86	51	49
(Min - Max)	(35-92)	(50-92)	(46-68)	(35-92)	(49-75)	(51-92)	(35-83)	(44-69)
Latéralité, n (%)								
Gauche	21 (70)	2	4	12	3	4	5	3
Droit	9 (30)	4	0	3	2	1	0	2
Quadrant, n (%)								
Rétro-aréolaire	2 (20)	1	0	3	1	2	0	2
QSE	11 (37)	3	3	5	2	2	1	0
QIE	4 (13)	1	0	2	1	0	1	1
QII	2 (7)	1	0	1	0	0	1	0
QSI	7 (23)	0	1	4	1	1	2	2
Taille tumorale, n (%)								
Médiane, mm	22	26	17	34	20	40	25	20
(Min - Max)	(6-9)	(6-9)	(13-25)	(8-70)	(10-70)	(24-40)	(8-45)	(10-29)
≤ 2 cm	15 (50)	3	3	5	3	0	2	4
> 2 cm et ≤ 5 cm	12 (40)	1	1	9	1	5	3	1
> 5 cm	3 (10)	2	0	1	1	0	0	0
Type histologique, n (%)								
Type non spécifique	21 (70)	5	3	9	2	3	4	4
Lobulaire	6 (20)	1	1	3	3	0	0	1
Mixte	2 (7)	0	0	2	0	1	1	0
Autre	1 (3)	0	0	1	0	1	0	0
Grade de Nottingham (selon Elston et Ellis), n (%)								
II	23 (77)	3	3	13	5	3	5	4
III	7 (23)	3	1	2	0	2	0	1
Mitoses, n (%)								
1	15 (50)	3	2	9	5	1	3	1
2	9 (30)	1	1	4	0	3	1	3
3	6 (20)	2	1	2	0	1	1	1
Carcinome in situ, n (%)								
Oui	19 (63)	4	2	3	2	5	3	3
Non	11 (37)	2	2	2	3	0	2	2
Expression du récepteur aux œstrogènes, n (%)								
< 10%	7 (23)	3	1	1	0	1	0	2
≥ 10%	23 (77)	3	3	14	5	4	5	3
Expression du récepteur à la progestérone, n (%)								
< 10%	14 (47)	3	1	7	3	1	3	3
≥ 10%	16 (53)	3	3	8	2	4	2	2

D.2.3 CONCORDANCE ENTRE LES DIFFERENTES TECHNIQUES D'ANALYSE DE FISH

Quatre résultats en terme de statut HER2 négatif, équivoque ou positif ont été rendus pour chaque cas en fonction des ajustements post-analyse réalisés :

- Aucun ajustement
- Suppression des noyaux du cluster « Monosomie »
- Suppression des noyaux dont le facteur de forme était inférieur à 0,8
- Suppression combinée du cluster « Monosomie » et des noyaux avec facteur de forme inférieur à 0,8

Sans ajustement post-analyse, la concordance entre l'analyse d'image et la lecture manuelle était forte avec un coefficient κ de 0,610 (0,325 – 0,896) et un accord retrouvé dans 83% des cas. La concordance avec le diagnostic initial était modérée avec un coefficient κ de 0,423 (0,177 – 0,668) et un accord retrouvé dans 69% des cas.

Après suppression du cluster « Monosomie », la concordance entre l'analyse d'image et la lecture manuelle était forte avec un coefficient κ de 0,783 (0,567 – 0,998) et un accord retrouvé dans 90% des cas. La concordance avec le diagnostic initial était forte avec un coefficient κ de 0,633 (0,399 – 0,867) et un accord retrouvé dans 79% des cas.

Après suppression des noyaux dont le facteur de forme était inférieur à 0,8, la concordance entre l'analyse d'image et la lecture manuelle était modérée avec un coefficient κ de 0,590 (0,308 - 0,873) et un accord retrouvé dans 83% des cas. La concordance avec le diagnostic initial était faible avec un coefficient κ de 0,350 (0,109 – 0,591) et un accord retrouvé dans 66% des cas.

Après suppression combinée du cluster « Monosomie » et des noyaux dont le facteur de forme était inférieur à 0,8, la concordance entre l'analyse d'image et la lecture manuelle était forte avec un coefficient κ de 0,766 (0,534 – 0,998) et un accord retrouvé dans 90% des cas. La concordance avec le diagnostic initial était modérée avec un coefficient κ de 0,493 (0,250 – 0,737) et un accord retrouvé dans 72% des cas.

On retrouvait également une concordance forte entre la lecture manuelle des lames digitalisées et le diagnostic initial réalisé en DISH, avec un κ de 0,690 (0,474 – 0,903) et un accord retrouvé dans 83% des cas.

Le seul ajustement post-analyse aboutissant à une concordance forte avec à la fois le diagnostic initial et la lecture manuelle était la suppression isolée du cluster "Monosomie" de l'analyse.

D.2.4 CAS DISCORDANTS

Malgré les ajustements post-analyse, il persistait trois cas discordants : deux cas positifs au diagnostic initial et en lecture manuelle et négatifs en analyse d'image (exemple présenté en Figure 33), et un cas positif au diagnostic initial et en lecture manuelle et équivoque en analyse d'image. Ces cas discordants montraient une qualité technique sub-optimale (bruit de fond granuleux et autofluorescence). Concernant les deux premiers cas, le nombre de copies de *HER2* était situé proche du seuil de 4 copies par noyau avec un ratio *HER2*/CEP17 > 2, rendant cruciale une petite différence de nombre de copies de *HER2*. Le dernier cas discordant avait un nombre de copies de *HER2* par noyau proche de 6 avec un ratio *HER2*/CEP17 supérieur à 2.

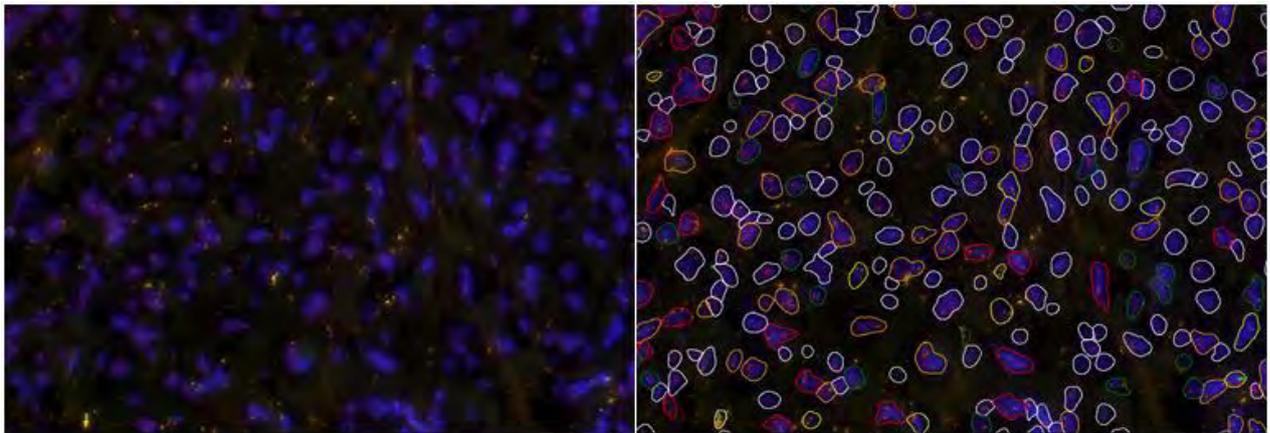


Figure 33 : Cas discordant proche du seuil en termes de nombre de signaux *HER2*. A gauche : aspect de la lame de FISH ; à droite : classification des noyaux par l'analyse d'image. En rouge : « Amplification » ; en orange : « Gain » ; en jaune : « Polysomy » ; en vert : « Negative » ; en beige : « Monosomie » et en blanc : « Other/Artefact ».

V. DISCUSSION

Le statut HER2 est l'une des pierres angulaires de la prise en charge des cancers du sein. Son évaluation est réalisée par le pathologiste pour tout diagnostic de cancer du sein infiltrant selon une séquence IHC \pm hybridation in situ. Les cas présentant une surexpression 2+ de HER2 en IHC doivent faire l'objet d'une évaluation du statut *HER2* en hybridation in situ [104, 105]. Les cas présentant une surexpression 3+ de HER2 en IHC ou une amplification de *HER2* en hybridation in situ sont éligibles à une thérapie anti-HER2. La référence pour l'évaluation du statut *HER2* en hybridation in situ est la FISH. Les principaux inconvénients de cette technique sont le coût de l'équipement en microscopie en fluorescence, la difficulté à identifier certains foyers de carcinome infiltrant, la durée d'analyse et l'absence d'archivage possible des lames dont la fluorescence décroît dans le temps. La numérisation des lames de FISH est rendue possible depuis une dizaine d'années par l'avènement des scanners de lames en fluorescence. Elle permet un archivage des cas et une consultation des lames de FISH sur un écran d'ordinateur. L'analyse d'image automatisée pourrait encore faciliter la lecture des FISH par le pathologiste en fournissant une aide précieuse au diagnostic. Comme toute nouvelle procédure diagnostique, l'analyse automatisée de lames de FISH doit être évaluée et comparée aux techniques de référence.

Etape technique

Notre travail a permis d'aborder plusieurs questions cruciales quant à l'analyse automatisée de lames de FISH. D'abord, notre travail sur une cohorte technique a permis d'évaluer l'analyse automatisée d'image de FISH sur des témoins positifs et négatifs et d'apprécier l'impact de différents paramètres de segmentation des noyaux (réglage de la taille des noyaux) et de différents algorithmes de classification des noyaux.

La validité intrinsèque de l'analyse d'image pour la classification des noyaux positifs et négatifs était significativement meilleure pour un réglage de taille des noyaux de 5 et 6 μm . Au-delà, le nombre de discordances dues à des artefacts de segmentation était plus important. De façon très intéressante, nos résultats montraient une infériorité significative de l'algorithme basé *stricto sensu* sur les recommandations en vigueur (algorithme « FXF »). Notons également que l'absence de cluster « Monosomie » dans cet algorithme empêchait une éventuelle suppression de ces noyaux lors de l'analyse chiffrée du nombre de copies de *HER2*. Une autre source de mauvaise classification des noyaux était d'inclure des noyaux comprenant trois copies du CEP17 dans le cluster « Negative ». Ces noyaux correspondaient le plus souvent à des noyaux artéfactuels. C'était le cas des algorithmes « FXF » et « adapt ». L'algorithme « cyto » donnait le meilleur compromis en termes de validité intrinsèque de classification des noyaux positifs et négatifs.

A partir de ces données obtenues sur les témoins négatif et positif, nous avons également pu définir les éventuels ajustements post-analyse pertinents lors de l'analyse chiffrée du statut *HER2*. En effet, la majorité des noyaux classés positifs ou négatifs par l'analyse d'image et reclassés comme artéfactuels en lecture manuelle présentaient de nombreuses différences significatives par rapport aux noyaux correctement classés. C'était notamment le cas du facteur de forme qui était significativement plus élevé (supérieur à 0,8) dans les noyaux correctement classés par rapport au noyau mal classés en analyse d'image. Ceci se traduit par le fait qu'un noyau correctement segmenté a grossièrement une forme ovalaire régulière, contrairement aux artefacts de segmentation qui aboutissent à des noyaux très cabossés aux contours irréguliers. Un ajustement des résultats d'analyse sur le facteur de forme nous semblait donc pertinent. Cet ajustement pourrait éventuellement être intégré à l'algorithme de segmentation des noyaux. Les noyaux reclassés comme artéfactuels en lecture manuelle avaient également une surface significativement supérieure aux noyaux correctement classés. Cependant, nous n'avons pas jugé pertinent de définir une surface seuil étant donnée la grande variabilité de taille des noyaux tumoraux dans les cancers du sein.

L'analyse d'image de l'ensemble de cette cohorte technique a également permis de mettre en lumière différents artefacts quant au comportement global de classification des noyaux et de détection des signaux *HER2* et CEP17. C'est ainsi que nous avons mis en évidence une très grande proportion de noyaux classés dans le cluster « Monosomie », y compris dans des tissus non tumoraux (amygdale). Ceci témoigne d'une part importante de noyaux artéfactuels dans ce cluster. En termes d'analyse chiffrée des résultats de FISH, ce cluster pourrait avoir un poids très important et aboutir à une nette sous-estimation du nombre de copies de *HER2*. Une explication simple à ce phénomène est que les coupes de 3 μm que nous réalisons sur les tissus permettent une bonne lisibilité des lames mais ne montrent que des noyaux incomplets, sectionnés. En effet,

les noyaux des tumeurs mammaires mesurent en moyenne 8 à 10 μm de diamètre. Un rapide calcul permet de montrer qu'une section de 3 μm d'une sphère de 8 μm de diamètre n'emporte que 43 à 48% du volume de cette sphère. Ceci aboutit à une probabilité de 6% de retrouver les quatre signaux (2 *HER2* et 2 *CEP17*) dans cette section. Tous ces éléments sont en faveur de la nature artéfactuelle du cluster « Monosomie », qui pourrait être supprimé de l'analyse chiffrée des résultats. Cependant, les monosomies du chromosome 17 existent dans les cancers du sein, quoique rares, et leur détection a un impact non négligeable sur l'appréciation du statut *HER2* [108]. La suspicion d'une monosomie implique de ne pas tenir compte du ratio *HER2/CEP17* et d'exiger la présence de clusters ou de plus de 6 copies du gène *HER2* par noyau pour rendre un résultat positif selon les recommandations du GEPFICS [104]. Une meilleure approche consisterait donc à modifier l'algorithme de classification des noyaux afin de mettre en exergue un cluster comprenant les noyaux présentant une amplification de *HER2* et une seule copie du *CEP17*. D'un point de vue clinique, à l'heure actuelle, le fait qu'une tumeur du sein présente une monosomie du chromosome 17 ne modifie pas la prise en charge de la patiente.

Nous avons également montré qu'une attention toute particulière doit être portée sur les lames de FISH présentant une forte autofluorescence ou un bruit de fond granuleux. Ces éléments peuvent être interprétés par le logiciel d'analyse d'image comme des signaux à comptabiliser. La délimitation des zones d'analyse d'image devrait donc être réalisée au plus près des foyers de cellules tumorales en évitant au maximum d'inclure ce type d'artefact dans l'analyse. Cette délimitation des zones d'analyse devrait être réalisée par le pathologiste avec un contrôle morphologique de la lame d'IHC *HER2*. Ceci nous rappelle un précepte évoqué en introduction : l'analyse d'image automatisée ne peut en aucun cas permettre d'obtenir un résultat fiable à partir d'une lame dont les artefacts rendraient la lecture manuelle difficile ou impossible. Une qualité technique irréprochable doit être exigée pour les lames destinées à l'analyse d'image, au même titre que pour les lames destinées à la lecture manuelle. Une autofluorescence verte trop fréquente ou trop systématique devrait faire envisager une adaptation des filtres d'émission ou de la source lumineuse du scanner de lames.

Sur la cohorte technique, nous avons comparé le nombre moyen de copies de *HER2* par noyau en PCR quantitative et le nombre moyen et la surface moyenne des signaux *HER2* comptabilisés en analyse d'image. Malgré une impression visuelle de sous-estimation du nombre de signaux *HER2* en analyse d'image, nous n'avons pas pu montrer de différence significative par rapport à l'évaluation en PCR quantitative. La surface des signaux *HER2* était moins bien corrélée au nombre de copies de *HER2* évalué en PCR quantitative qu'au nombre de signaux *HER2* détectés en analyse d'image. Malgré ces éléments en faveur d'une bonne fiabilité du compte de signaux par noyau, ces résultats doivent être pondérés. Les quantités d'ADN extraites à partir des blocs

de paraffine de la cohorte technique étaient très disparates. Ceci provient certainement du fait que la proportion de cellules (tumoraux ou non) sur les échantillons inclus dans les blocs de la cohorte technique était variable, parfois faible. Cependant, les courbes d'amplification obtenues étaient tout à fait satisfaisantes (données non présentées), avec une excellente superposition des duplicats et des témoins négatifs non amplifiés. Néanmoins, il faut rappeler que les blocs de témoins positifs (lignées cellulaires) étaient vieux de 9 ans au moment de notre travail, pouvant expliquer une dégradation de l'ADN intra-tumoral. Dans l'étude de Jacquemier et coll., l'analyse en PCR quantitative retrouvait entre 25 et 30 copies de *HER2* par noyau dans des cellules SKBR-3 fraîches contre 5,2 dans notre travail [151]. On retrouvait également un nombre moyen de copies du centromère 17 très souvent inférieur à 2, ce qui n'était pas le cas dans l'étude de Jacquemier et coll. Notons enfin que les cas de la cohorte technique avaient, pour la plupart, été choisis sur des données d'hybridation in situ obtenues en routine. Il s'agissait donc principalement de cas étiquetés 2+ en IHC. Cela explique l'absence de très gros clusters du gène *HER2* dans ces tumeurs. Pour toutes ces raisons, nous n'avons pas envisagé d'ajustement post-analyse du nombre de copies de *HER2*.

Outre ces considérations techniques, il faut noter que le nombre de copies de *HER2* dans les clusters n'est pas connu des pathologistes ni des cytogénéticiens. De manière semi-quantitative, nous évoquons de « petits clusters » ou de « volumineux clusters » du gène *HER2*. Cependant, il n'y a aucune étude ni aucune recommandation quant à l'évaluation du nombre de copies de *HER2* dans ces clusters. Ceci est une source de variabilité inter-observateur en termes de résultats chiffrés du statut *HER2*. Ceci nous pousse à poursuivre les recherches dans ce sens afin de pouvoir dicter aux pathologistes des recommandations claires pour l'évaluation chiffrée du nombre de copies de *HER2* dans les clusters. Ceci permettrait également de s'appuyer sur des preuves biologiques pour développer des algorithmes de reconnaissance des clusters et une évaluation automatisée du nombre de copies de *HER2* par cluster en analyse d'image.

Etape de validation

La validation des différents paramètres évalués précédemment était réalisée sur une cohorte de 30 patientes dont les statuts HER2 étaient connus. Les paramètres d'analyse comprenaient l'utilisation de l'algorithme « cyto » et une taille de noyaux réglée à 6 µm, plus ou moins associée à des ajustements post-analyse.

Cette étape mettait en évidence une concordance forte entre l'évaluation du statut HER2 par analyse d'image (avec suppression du cluster « Monosomie ») et l'analyse manuelle de lames de FISH numérisées d'une part, et le diagnostic initial d'autre part. Nos résultats montraient une concordance plus faible ($\kappa=0,783$ et concordance globale de 90%) que celle obtenue par l'équipe de van der Logt qui retrouvait un coefficient κ à 0,940 et une concordance globale de 95% entre la lecture de FISH HER2 au microscope à fluorescence et l'analyse automatisée d'image [149]. Cette équipe utilisait uniquement le ratio *HER2/CEP17* pour définir le statut HER2, selon les recommandations de l'ASCO®/CAP de 2007 qui ne sont plus en vigueur actuellement [130]. C'était également le cas du travail de Ayad E et coll. qui montrait une concordance modérée ($\kappa=0,412$ et concordance globale de 73%) entre la lecture manuelle de FISH et l'analyse automatisée [148]. Selon une communication affichée de Long et coll. à l'USCAP en 2015, 7,7% des cas de cancers du sein changent de statut et 1,95% des cas deviennent positifs lorsque l'on applique les recommandations de 2013 sur des cas initialement classés selon les recommandations de 2007 [153]. Aucun de ces travaux n'abordait la question de la qualité de segmentation des noyaux et de leur classification.

Notons aussi que dans notre travail, la concordance entre l'analyse de FISH au microscope en fluorescence et l'analyse sur lames numérisées était forte ($\kappa=0,690$ et concordance globale de 83%), en accord avec un travail réalisé précédemment dans notre service utilisant des sondes de FISH *break-apart* [154].

L'ajustement post-analyse sur le facteur de forme des noyaux s'est avéré contre-productif, faisant diminuer la concordance entre les résultats d'analyse d'image et de lecture manuelle de lames numérisées d'une part, et du diagnostic initial d'autre part. Le seuil de 0,8 défini après étude de l'échantillon « D10 » comprenant un témoin positif et un témoin négatif s'avérait probablement trop stringent. Le nombre de noyaux exclus de l'analyse par cette méthode était trop important et avait tendance à réduire le nombre moyen de signaux *HER2* par noyau pour des cas pourtant manifestement amplifiés.

De manière plus globale, les discordances observées lors de cette étape de validation allaient le plus souvent dans le sens d'une sous-estimation du nombre de copies de *HER2* aboutissant à des résultats négatifs ou équivoques en analyse d'image pour des cas amplifiés par lecture manuelle

ou selon le diagnostic initial. D'une part, on peut évoquer, comme nous l'avons fait précédemment, une sous-estimation de l'évaluation du nombre de signaux *HER2* par l'analyse d'image, même si cette impression n'a pas pu être confirmée dans notre travail. D'autre part, on ne peut s'affranchir de l'analyse de quelques noyaux non tumoraux en analyse d'image, qui auront tendance à « diluer » le nombre de copies de *HER2* par noyau. Ces cas montraient également une qualité technique sub-optimale associant un bruit de fond granuleux et une autofluorescence importante. Enfin, il faut signaler que ces cas avaient un nombre de copies de *HER2* proche du seuil de 4 ou 6 copies par noyau. Autrement dit, il s'agissait de cas d'interprétation difficile par nature. On sait également que le taux de réponse aux thérapies anti-*HER2* est corrélé au nombre de copies de *HER2* par noyau. L'équipe de Arnould et coll. a comparé le taux de réponse pathologique complète sous thérapie anti-*HER2* pour un nombre de copies de *HER2*>10 ou situé entre 6 et 10 copies par noyau. Ces taux étaient de 56% et 22% respectivement [155]. L'équipe de D.J. Slamon a récemment montré sur de grandes cohortes rétrospectives que les cas équivoques en hybridation in situ ne sont pas significativement associés à de plus mauvaises données de survie sans progression ou de survie globale que les cas négatifs [156]. Ce même travail confirme l'absence de bénéfice du trastuzumab pour les patientes porteuses de tumeurs avec moins de 4 copies de *HER2* par noyau. Malheureusement, cette étude ne précise pas le bénéfice du trastuzumab pour les tumeurs faiblement amplifiées, c'est-à-dire avec un ratio *HER2*/CEP17 \geq 2 et un nombre de copies de *HER2* situé entre 4 et 6. Malgré ces résultats plutôt en faveur d'un bénéfice absent ou très discret des thérapies anti-*HER2* pour les cas équivoques, les recommandations de l'ASCO®/CAP vont dans le sens d'une réduction maximale du nombre de faux négatifs pour le statut *HER2*, au risque de créer des faux positifs.

Afin d'évaluer la validité clinique des données obtenues dans notre travail, plusieurs points doivent encore être abordés. D'une part, les résultats obtenus en analyse d'image sur la cohorte de validation devraient être comparés à ceux obtenus en lecture manuelle au microscope en fluorescence, qui constitue la véritable référence en termes d'évaluation du statut *HER2* en hybridation in situ. Il faudrait également ajouter une évaluation des algorithmes « FXF » et « adapt » sur la cohorte de validation afin de rendre compte des différences entre les trois algorithmes en termes de statut *HER2*.

Perspectives de l'analyse d'image de FISH

Le développement et la progression des outils d'analyse d'image passent nécessairement par leur évaluation rigoureuse, au même titre que n'importe quelle procédure diagnostique. Dans le futur, il faudra compter avec une intégration de ce type d'approches dans les recommandations afin de standardiser l'utilisation de ces outils d'analyse d'image sur le territoire. Si l'approche informatique et algorithmique peut rebuter au premier abord, elle aboutit cependant à une réflexion de fond sur les fondements biologiques des pathologies étudiées et permet de mettre en lumière des caractéristiques des tumeurs passées inaperçues jusqu'alors. Cette réflexion sur les algorithmes de classification ou de segmentation devrait faire systématiquement l'objet d'un travail conjoint entre les ingénieurs (bio-informaticiens, développeurs) et le corps médical afin de créer rapidement des outils applicables en pratique courante.

En recherche, l'évaluation de l'hétérogénéité intra-tumorale dans les cancers, et notamment dans les cancers du sein, prend une part de plus en plus importante dans les projets actuels. En effet, les données actuelles montrent clairement que les populations clonales tumorales sont hétérogènes au moment du diagnostic initial, et que, sous la pression de sélection des traitements reçus, certains clones minoritaires donnent naissance à des métastases. Elle serait en partie responsable des phénomènes de résistance thérapeutique. L'équipe de C. Swanton a développé un protocole de FISH utilisant concomitamment les sondes centromériques CEP2 et CEP15 afin d'évaluer l'instabilité chromosomique de tumeurs du sein [157, 158]. Ce protocole consiste à dénombrer les signaux CEP2 et CEP15 dans les noyaux des cellules tumorales et, selon les combinaisons présentes et leur dispersion, classer la tumeur dans un groupe MCD (pour *Modal Centromere Deviation*). Les groupes MCD varient de 1 à 4 pour des taux d'instabilité chromosomique croissants. Le développement de ce type d'approches couplé à l'analyse d'image permettrait de réaliser des cartographies de l'instabilité chromosomique dans les tumeurs. Nous sommes actuellement en train de développer de telles approches au sein du laboratoire d'Anatomie et Cytologie Pathologiques de l'Institut Universitaire du Cancer – Oncopole de Toulouse et sommes déjà sur le point de réaliser ce type d'analyse pour des essais cliniques (TRACER X, UNICANCER). Les données de répartition des différentes combinaisons de nombres de signaux par noyaux, non utilisées dans le travail actuel, prennent tout leur sens dans cette évaluation de l'instabilité chromosomique qui donne une importance majeure à la dispersion des données. Notons que ce type de données biologiques issues des tissus, combinées à de nombreuses autres variables, constituent une source précieuse d'informations dans le cadre de l'approche phénotypique, actuellement en plein essor (voir le chapitre I. D.4).

Il faut aussi rappeler que la FISH ne se limite pas à l'évaluation du statut HER2 dans les cancers du sein, mais comprend également de nombreuses recherches de réarrangements chromosomiques, que ce soit en pathologie mammaire (translocation ETV6-NTRK3 dans les carcinomes sécrétoires, translocation MYB-NFIB dans les carcinomes adénoïdes kystiques), en pathologie lymphomateuse, sarcomateuse et bien d'autres. A ce titre, notre travail constitue une ouverture vers le développement d'algorithmes permettant une aide au diagnostic dans ces différents cas.

VI. CONCLUSION

Les thérapies anti-HER2 ont révolutionné le pronostic des cancers du sein HER2 positifs. Le pathologiste est responsable de l'évaluation du statut HER2 qui conditionnera la mise en place d'un traitement adapté. Son évaluation repose sur l'association de l'IHC pouvant être complétée par une technique d'hybridation in situ afin d'évaluer la présence ou non d'une amplification du gène *HER2*. Avec l'avènement de la pathologie digitale, les lames de FISH peuvent être numérisées et faire l'objet d'une analyse d'image automatisée. La fiabilité et la robustesse de l'analyse d'image automatisée de FISH pour l'évaluation du statut HER2 dans les cancers du sein n'ont été que peu étudiées, et toujours sur la base de recommandations obsolètes.

Au cours de notre travail, nous avons développé plusieurs algorithmes de classification et testé plusieurs paramètres de segmentation des noyaux sur une première cohorte technique. Nous avons ainsi sélectionné l'algorithme et les paramètres de segmentation nucléaire donnant les meilleurs résultats. Nous avons également apprécié les ajustements post-analyse les plus pertinents permettant de rendre un résultat chiffré le plus fiable possible pour l'évaluation du statut HER2. Dans un deuxième temps, nous avons validé ces différents paramètres en évaluant la concordance du statut HER2 entre le diagnostic initial, la lecture manuelle des lames de FISH numérisées et l'analyse d'image automatisée sur une cohorte de validation de 30 cancers du sein. Nous avons ainsi pu définir, *in fine*, les ajustements post-analyse nécessaires à l'obtention d'une bonne concordance entre ces différentes approches.

Selon nos résultats, l'analyse automatisée des lames de FISH constitue une aide fiable et reproductible à l'évaluation du statut HER2 en FISH. Elle ne pourrait cependant pas se substituer à la lecture manuelle en l'état actuel des choses, en l'absence de recommandations et d'un effort d'harmonisation de ces approches.

VII. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Guerin S, Doyon F, Hill C. [The frequency of cancer in France in 2006, mortality trends since 1950, incidence trends since 1980 and analysis of the discrepancies between these trends]. *Bull Cancer*. 2009;96: 51-7.
2. Chaffer CL, Weinberg RA. A perspective on cancer cell metastasis. *Science*. 2011;331: 1559-64.
3. Chiang AC, Massague J. Molecular basis of metastasis. *N Engl J Med*. 2008;359: 2814-23.
4. Gupta GP, Massague J. Cancer metastasis: building a framework. *Cell*. 2006;127: 679-95.
5. Nguyen DX, Bos PD, Massague J. Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization. *Nat Rev Cancer*. 2009;9: 274-84.
6. Rakha EA, El-Sayed ME, Lee AH *et al*. Prognostic significance of Nottingham histologic grade in invasive breast carcinoma. *J Clin Oncol*. 2008;26: 3153-8.
7. Le Guellec S, Perallon R, Alunni JP *et al*. [Neoadjuvant treatment of breast cancer: implications for the pathologist]. *Ann Pathol*. 2011;31: 442-54.
8. Goldhirsch A, Winer EP, Coates AS *et al*. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. *Ann Oncol*. 2013;24: 2206-23.
9. Lakhani SR, Ellis IO, Schnitt SJ, Tan PH, van de Vijver MJ. WHO Classification of Tumours of the Breast, fourth edition. IARC, editor. Lyon2012.
10. Dabbs DJ. Breast Pathology. Elsevier ed. Philadelphia2012.
11. Ellis IO, Galea M, Broughton N, Locker A, Blamey RW, Elston CW. Pathological prognostic factors in breast cancer. II. Histological type. Relationship with survival in a large study with long-term follow-up. *Histopathology*. 1992;20: 479-89.
12. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB *et al*. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000;406: 747-52.
13. van 't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ *et al*. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature*. 2002;415: 530-6.
14. van de Vijver MJ, He YD, van't Veer LJ *et al*. A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *N Engl J Med*. 2002;347: 1999-2009.

15. Banneau G, Guedj M, MacGrogan G *et al.* Molecular apocrine differentiation is a common feature of breast cancer in patients with germline PTEN mutations. *Breast Cancer Res.* 2010;12: R63.
16. Cheang MC, Voduc D, Bajdik C *et al.* Basal-like breast cancer defined by five biomarkers has superior prognostic value than triple-negative phenotype. *Clin Cancer Res.* 2008;14: 1368-76.
17. Lehmann BD, Bauer JA, Chen X *et al.* Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *J Clin Invest.* 2011;121: 2750-67.
18. Nielsen TO, Hsu FD, Jensen K *et al.* Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2004;10: 5367-74.
19. Alizadeh AA, Ross DT, Perou CM, van de Rijn M. Towards a novel classification of human malignancies based on gene expression patterns. *J Pathol.* 2001;195: 41-52.
20. Hu Z, Fan C, Oh DS *et al.* The molecular portraits of breast tumors are conserved across microarray platforms. *BMC Genomics.* 2006;7: 96.
21. Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R *et al.* Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98: 10869-74.
22. Sorlie T, Tibshirani R, Parker J *et al.* Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100: 8418-23.
23. Parker JS, Mullins M, Cheang MC *et al.* Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *J Clin Oncol.* 2009;27: 1160-7.
24. Cheang MC, Chia SK, Voduc D *et al.* Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2009;101: 736-50.
25. Gusterson B. Do 'basal-like' breast cancers really exist? *Nat Rev Cancer.* 2009;9: 128-34.
26. Lim E, Vaillant F, Wu D *et al.* Aberrant luminal progenitors as the candidate target population for basal tumor development in BRCA1 mutation carriers. *Nat Med.* 2009;15: 907-13.
27. Molyneux G, Geyer FC, Magnay FA *et al.* BRCA1 basal-like breast cancers originate from luminal epithelial progenitors and not from basal stem cells. *Cell Stem Cell.* 2010;7: 403-17.
28. Farmer P, Bonnefoi H, Becette V *et al.* Identification of molecular apocrine breast tumours by microarray analysis. *Oncogene.* 2005;24: 4660-71.

29. Weigelt B, Horlings HM, Kreike B *et al.* Refinement of breast cancer classification by molecular characterization of histological special types. *J Pathol.* 2008;216: 141-50.
30. Chin K, DeVries S, Fridlyand J *et al.* Genomic and transcriptional aberrations linked to breast cancer pathophysiologies. *Cancer Cell.* 2006;10: 529-41.
31. Hicks J, Krasnitz A, Lakshmi B *et al.* Novel patterns of genome rearrangement and their association with survival in breast cancer. *Genome Res.* 2006;16: 1465-79.
32. Curtis C, Shah SP, Chin SF *et al.* The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups. *Nature.* 2012;486: 346-52.
33. Cancer Genome Atlas N. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature.* 2012;490: 61-70.
34. Ciriello G, Gatza ML, Beck AH *et al.* Comprehensive Molecular Portraits of Invasive Lobular Breast Cancer. *Cell.* 2015;163: 506-19.
35. Fitzgibbons PL, Page DL, Weaver D *et al.* Prognostic factors in breast cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Arch Pathol Lab Med.* 2000;124: 966-78.
36. Goldhirsch A, Glick JH, Gelber RD *et al.* Meeting highlights: international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2005. *Ann Oncol.* 2005;16: 1569-83.
37. de la Rochefordiere A, Asselain B, Scholl S *et al.* Simultaneous bilateral breast carcinomas: a retrospective review of 149 cases. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1994;30: 35-41.
38. Sant M, Allemani C, Berrino F *et al.* Breast carcinoma survival in Europe and the United States. *Cancer.* 2004;100: 715-22.
39. Singletary SE, Allred C, Ashley P *et al.* Revision of the American Joint Committee on Cancer staging system for breast cancer. *J Clin Oncol.* 2002;20: 3628-36.
40. Singletary SE, Connolly JL. Breast cancer staging: working with the sixth edition of the AJCC Cancer Staging Manual. *CA Cancer J Clin.* 2006;56: 37-47; quiz 50-1.
41. Carter CL, Allen C, Henson DE. Relation of tumor size, lymph node status, and survival in 24,740 breast cancer cases. *Cancer.* 1989;63: 181-7.
42. Joensuu H, Isola J, Lundin M *et al.* Amplification of *erbB2* and *erbB2* expression are superior to estrogen receptor status as risk factors for distant recurrence in pT1N0M0 breast cancer: a nationwide population-based study. *Clin Cancer Res.* 2003;9: 923-30.
43. Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology.* 1991;19: 403-10.

44. Galea MH, Blamey RW, Elston CE, Ellis IO. The Nottingham Prognostic Index in primary breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 1992;22: 207-19.
45. Yerushalmi R, Woods R, Ravdin PM, Hayes MM, Gelmon KA. Ki67 in breast cancer: prognostic and predictive potential. *Lancet Oncol.* 2010;11: 174-83.
46. Dowsett M, Nielsen TO, A'Hern R *et al.* Assessment of Ki67 in breast cancer: recommendations from the International Ki67 in Breast Cancer working group. *J Natl Cancer Inst.* 2011;103: 1656-64.
47. Luporsi E, Andre F, Spyrtatos F *et al.* Ki-67: level of evidence and methodological considerations for its role in the clinical management of breast cancer: analytical and critical review. *Breast Cancer Res Treat.* 2012;132: 895-915.
48. Aleskandarany MA, Green AR, Benhasouna AA *et al.* Prognostic value of proliferation assay in the luminal, HER2-positive, and triple-negative biologic classes of breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2012;14: R3.
49. Jalava P, Kuopio T, Juntti-Patinen L, Kotkansalo T, Kronqvist P, Collan Y. Ki67 immunohistochemistry: a valuable marker in prognostication but with a risk of misclassification: proliferation subgroups formed based on Ki67 immunoreactivity and standardized mitotic index. *Histopathology.* 2006;48: 674-82.
50. Hugh J, Hanson J, Cheang MC *et al.* Breast cancer subtypes and response to docetaxel in node-positive breast cancer: use of an immunohistochemical definition in the BCIRG 001 trial. *J Clin Oncol.* 2009;27: 1168-76.
51. Penault-Llorca F, Andre F, Sagan C *et al.* Ki67 expression and docetaxel efficacy in patients with estrogen receptor-positive breast cancer. *J Clin Oncol.* 2009;27: 2809-15.
52. Viale G, Giobbie-Hurder A, Regan MM *et al.* Prognostic and predictive value of centrally reviewed Ki-67 labeling index in postmenopausal women with endocrine-responsive breast cancer: results from Breast International Group Trial 1-98 comparing adjuvant tamoxifen with letrozole. *J Clin Oncol.* 2008;26: 5569-75.
53. de Azambuja E, Cardoso F, de Castro G, Jr. *et al.* Ki-67 as prognostic marker in early breast cancer: a meta-analysis of published studies involving 12,155 patients. *Br J Cancer.* 2007;96: 1504-13.
54. Stuart-Harris R, Caldas C, Pinder SE, Pharoah P. Proliferation markers and survival in early breast cancer: a systematic review and meta-analysis of 85 studies in 32,825 patients. *Breast.* 2008;17: 323-34.

55. de Mascarel I, Bonichon F, Durand M *et al.* Obvious peritumoral emboli: an elusive prognostic factor reappraised. Multivariate analysis of 1320 node-negative breast cancers. *Eur J Cancer.* 1998;34: 58-65.
56. Prat A, Cheang MC, Martin M *et al.* Prognostic significance of progesterone receptor-positive tumor cells within immunohistochemically defined luminal A breast cancer. *J Clin Oncol.* 2013;31: 203-9.
57. Arpino G, Weiss H, Lee AV *et al.* Estrogen receptor-positive, progesterone receptor-negative breast cancer: association with growth factor receptor expression and tamoxifen resistance. *J Natl Cancer Inst.* 2005;97: 1254-61.
58. Rakha EA, Reis-Filho JS, Ellis IO. Basal-like breast cancer: a critical review. *J Clin Oncol.* 2008;26: 2568-81.
59. Hammond ME, Hayes DF, Dowsett M *et al.* American Society of Clinical Oncology/College Of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *J Clin Oncol.* 2010;28: 2784-95.
60. Harvey JM, Clark GM, Osborne CK, Allred DC. Estrogen receptor status by immunohistochemistry is superior to the ligand-binding assay for predicting response to adjuvant endocrine therapy in breast cancer. *J Clin Oncol.* 1999;17: 1474-81.
61. Lippman ME, Allegra JC. Quantitative estrogen receptor analyses: the response to endocrine and cytotoxic chemotherapy in human breast cancer and the disease-free interval. *Cancer.* 1980;46: 2829-34.
62. Ravdin PM, Green S, Dorr TM *et al.* Prognostic significance of progesterone receptor levels in estrogen receptor-positive patients with metastatic breast cancer treated with tamoxifen: results of a prospective Southwest Oncology Group study. *J Clin Oncol.* 1992;10: 1284-91.
63. Osborne CK, Yochmowitz MG, Knight WA, 3rd, McGuire WL. The value of estrogen and progesterone receptors in the treatment of breast cancer. *Cancer.* 1980;46: 2884-8.
64. Chia S, Norris B, Speers C *et al.* Human epidermal growth factor receptor 2 overexpression as a prognostic factor in a large tissue microarray series of node-negative breast cancers. *J Clin Oncol.* 2008;26: 5697-704.
65. Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA *et al.* Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science.* 1989;244: 707-12.
66. Piccart-Gebhart MJ, Procter M, Leyland-Jones B *et al.* Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med.* 2005;353: 1659-72.

67. Romond EH, Perez EA, Bryant J *et al.* Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med.* 2005;353: 1673-84.
68. Bellera CA, MacGrogan G, Debled M, de Lara CT, Brouste V, Mathoulin-Pelissier S. Variables with time-varying effects and the Cox model: some statistical concepts illustrated with a prognostic factor study in breast cancer. *BMC Med Res Methodol.* 2010;10: 20.
69. Blows FM, Driver KE, Schmidt MK *et al.* Subtyping of breast cancer by immunohistochemistry to investigate a relationship between subtype and short and long term survival: a collaborative analysis of data for 10,159 cases from 12 studies. *PLoS Med.* 2010;7: e1000279.
70. Desmedt C, Haibe-Kains B, Wirapati P *et al.* Biological processes associated with breast cancer clinical outcome depend on the molecular subtypes. *Clin Cancer Res.* 2008;14: 5158-65.
71. Coussens L, Yang-Feng TL, Liao YC *et al.* Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with neu oncogene. *Science.* 1985;230: 1132-9.
72. King CR, Kraus MH, Aaronson SA. Amplification of a novel v-erbB-related gene in a human mammary carcinoma. *Science.* 1985;229: 974-6.
73. Semba K, Kamata N, Toyoshima K, Yamamoto T. A v-erbB-related protooncogene, c-erbB-2, is distinct from the c-erbB-1/epidermal growth factor-receptor gene and is amplified in a human salivary gland adenocarcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1985;82: 6497-501.
74. Moasser MM. Targeting the function of the HER2 oncogene in human cancer therapeutics. *Oncogene.* 2007;26: 6577-92.
75. Moasser MM. The oncogene HER2: its signaling and transforming functions and its role in human cancer pathogenesis. *Oncogene.* 2007;26: 6469-87.
76. Olayioye MA, Neve RM, Lane HA, Hynes NE. The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *EMBO J.* 2000;19: 3159-67.
77. Tzahar E, Waterman H, Chen X *et al.* A hierarchical network of interreceptor interactions determines signal transduction by Neu differentiation factor/neuregulin and epidermal growth factor. *Mol Cell Biol.* 1996;16: 5276-87.
78. Harari D, Yarden Y. Molecular mechanisms underlying ErbB2/HER2 action in breast cancer. *Oncogene.* 2000;19: 6102-14.
79. Bose R, Kavuri SM, Searleman AC *et al.* Activating HER2 mutations in HER2 gene amplification negative breast cancer. *Cancer Discov.* 2013;3: 224-37.

80. Herter-Sprue GS, Greulich H, Wong KK. Activating Mutations in ERBB2 and Their Impact on Diagnostics and Treatment. *Front Oncol.* 2013;3: 86.
81. Greulich H, Kaplan B, Mertins P *et al.* Functional analysis of receptor tyrosine kinase mutations in lung cancer identifies oncogenic extracellular domain mutations of ERBB2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109: 14476-81.
82. Stephens P, Hunter C, Bignell G *et al.* Lung cancer: intragenic ERBB2 kinase mutations in tumours. *Nature.* 2004;431: 525-6.
83. Desmedt C, Zoppoli G, Gudem G *et al.* Genomic Characterization of Primary Invasive Lobular Breast Cancer. *J Clin Oncol.* 2016;34: 1872-81.
84. Ross JS, Wang K, Sheehan CE *et al.* Relapsed classic E-cadherin (CDH1)-mutated invasive lobular breast cancer shows a high frequency of HER2 (ERBB2) gene mutations. *Clin Cancer Res.* 2013;19: 2668-76.
85. Kauraniemi P, Kuukasjarvi T, Sauter G, Kallioniemi A. Amplification of a 280-kilobase core region at the ERBB2 locus leads to activation of two hypothetical proteins in breast cancer. *Am J Pathol.* 2003;163: 1979-84.
86. Staaf J, Jonsson G, Ringner M *et al.* High-resolution genomic and expression analyses of copy number alterations in HER2-amplified breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2010;12: R25.
87. Albertson DG. Gene amplification in cancer. *Trends Genet.* 2006;22: 447-55.
88. Vicario R, Peg V, Morancho B *et al.* Patterns of HER2 Gene Amplification and Response to Anti-HER2 Therapies. *PLoS One.* 2015;10: e0129876.
89. Rubin I, Yarden Y. The basic biology of HER2. *Ann Oncol.* 2001;12 Suppl 1: S3-8.
90. 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: 177-82.
91. Meijnen P, Peterse JL, Antonini N, Rutgers EJ, van de Vijver MJ. Immunohistochemical categorisation of ductal carcinoma in situ of the breast. *Br J Cancer.* 2008;98: 137-42.
92. 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: 541-6.
93. Revillion F, Bonnetterre J, Peyrat JP. ERBB2 oncogene in human breast cancer and its clinical significance. *Eur J Cancer.* 1998;34: 791-808.

94. Bartlett JM, Ellis IO, Dowsett M *et al.* Human epidermal growth factor receptor 2 status correlates with lymph node involvement in patients with estrogen receptor (ER) negative, but with grade in those with ER-positive early-stage breast cancer suitable for cytotoxic chemotherapy. *J Clin Oncol.* 2007;25: 4423-30.
95. Ignatiadis M, Sotiriou C. Breast cancer: Should we assess HER2 status by Oncotype DX? *Nat Rev Clin Oncol.* 2012;9: 12-4.
96. Rodrigues MJ, Wassermann J, Albiges L *et al.* Trastuzumab treatment in t1ab, node-negative, human epidermal growth factor receptor 2-overexpressing breast carcinomas. *J Clin Oncol.* 2010;28: e541-2.
97. Konecny G, Pauletti G, Pegram M *et al.* Quantitative association between HER-2/neu and steroid hormone receptors in hormone receptor-positive primary breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2003;95: 142-53.
98. Jonsson G, Staaf J, Vallon-Christersson J *et al.* Genomic subtypes of breast cancer identified by array-comparative genomic hybridization display distinct molecular and clinical characteristics. *Breast Cancer Res.* 2010;12: R42.
99. Guedj M, Marisa L, de Reynies A *et al.* A refined molecular taxonomy of breast cancer. *Oncogene.* 2012;31: 1196-206.
100. Staaf J, Ringner M, Vallon-Christersson J *et al.* Identification of subtypes in human epidermal growth factor receptor 2--positive breast cancer reveals a gene signature prognostic of outcome. *J Clin Oncol.* 2010;28: 1813-20.
101. Vincent-Salomon A, Bidard FC, Pierga JY. Bone marrow micrometastasis in breast cancer: review of detection methods, prognostic impact and biological issues. *J Clin Pathol.* 2008;61: 570-6.
102. Vincent-Salomon A, Jouve M, Genin P *et al.* HER2 status in patients with breast carcinoma is not modified selectively by preoperative chemotherapy and is stable during the metastatic process. *Cancer.* 2002;94: 2169-73.
103. Wu JM, Fackler MJ, Halushka MK *et al.* Heterogeneity of breast cancer metastases: comparison of therapeutic target expression and promoter methylation between primary tumors and their multifocal metastases. *Clin Cancer Res.* 2008;14: 1938-46.
104. Penault-Llorca F, Vincent-Salomon A, MacGrogan G *et al.* [2014 update of the GEFPICS' recommendations for HER2 status determination in breast cancers in France]. *Ann Pathol.* 2014;34: 352-65.

105. Wolff AC, Hammond ME, Hicks DG *et al.* Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update. *J Clin Oncol.* 2013;31: 3997-4013.
106. Bernasconi B, Chiaravalli AM, Finzi G, Milani K, Tibiletti MG. Genetic heterogeneity in HER2 testing may influence therapy eligibility. *Breast Cancer Res Treat.* 2012;133: 161-8.
107. Hanna W, Nofech-Mozes S, Kahn HJ. Intratumoral heterogeneity of HER2/neu in breast cancer--a rare event. *Breast J.* 2007;13: 122-9.
108. Hanna WM, Ruschoff J, Bilous M *et al.* HER2 in situ hybridization in breast cancer: clinical implications of polysomy 17 and genetic heterogeneity. *Mod Pathol.* 2014;27: 4-18.
109. Vance GH, Barry TS, Bloom KJ *et al.* Genetic heterogeneity in HER2 testing in breast cancer: panel summary and guidelines. *Arch Pathol Lab Med.* 2009;133: 611-2.
110. Allison KH, Dintzis SM, Schmidt RA. Frequency of HER2 heterogeneity by fluorescence in situ hybridization according to CAP expert panel recommendations: time for a new look at how to report heterogeneity. *Am J Clin Pathol.* 2011;136: 864-71.
111. Cottu PH, Asselah J, Lae M *et al.* Intratumoral heterogeneity of HER2/neu expression and its consequences for the management of advanced breast cancer. *Ann Oncol.* 2008;19: 595-7.
112. Seol H, Lee HJ, Choi Y *et al.* Intratumoral heterogeneity of HER2 gene amplification in breast cancer: its clinicopathological significance. *Mod Pathol.* 2012;25: 938-48.
113. Shepard HM, Lewis GD, Sarup JC *et al.* Monoclonal antibody therapy of human cancer: taking the HER2 protooncogene to the clinic. *J Clin Immunol.* 1991;11: 117-27.
114. Shalaby MR, Shepard HM, Presta L *et al.* Development of humanized bispecific antibodies reactive with cytotoxic lymphocytes and tumor cells overexpressing the HER2 protooncogene. *J Exp Med.* 1992;175: 217-25.
115. Pegram MD, Lipton A, Hayes DF *et al.* Phase II study of receptor-enhanced chemosensitivity using recombinant humanized anti-p185HER2/neu monoclonal antibody plus cisplatin in patients with HER2/neu-overexpressing metastatic breast cancer refractory to chemotherapy treatment. *J Clin Oncol.* 1998;16: 2659-71.
116. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S *et al.* Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med.* 2001;344: 783-92.
117. Hortobagyi GN. Trastuzumab in the treatment of breast cancer. *N Engl J Med.* 2005;353: 1734-6.

118. Cho HS, Mason K, Ramyar KX *et al.* Structure of the extracellular region of HER2 alone and in complex with the Herceptin Fab. *Nature*. 2003;421: 756-60.
119. De P, Hasmann M, Leyland-Jones B. Molecular determinants of trastuzumab efficacy: What is their clinical relevance? *Cancer Treat Rev*. 2013;39: 925-34.
120. Spector NL, Blackwell KL. Understanding the mechanisms behind trastuzumab therapy for human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer. *J Clin Oncol*. 2009;27: 5838-47.
121. Barok M, Isola J, Palyi-Krekk Z *et al.* Trastuzumab causes antibody-dependent cellular cytotoxicity-mediated growth inhibition of submacroscopic JIMT-1 breast cancer xenografts despite intrinsic drug resistance. *Mol Cancer Ther*. 2007;6: 2065-72.
122. Chung A, Cui X, Audeh W, Giuliano A. Current status of anti-human epidermal growth factor receptor 2 therapies: predicting and overcoming herceptin resistance. *Clin Breast Cancer*. 2013;13: 223-32.
123. Baselga J, Cortes J, Kim SB *et al.* Pertuzumab plus trastuzumab plus docetaxel for metastatic breast cancer. *N Engl J Med*. 2012;366: 109-19.
124. Swain SM, Baselga J, Kim SB *et al.* Pertuzumab, trastuzumab, and docetaxel in HER2-positive metastatic breast cancer. *N Engl J Med*. 2015;372: 724-34.
125. Krop IE, Kim SB, Gonzalez-Martin A *et al.* Trastuzumab emtansine versus treatment of physician's choice for pretreated HER2-positive advanced breast cancer (TH3RESA): a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2014;15: 689-99.
126. Verma S, Miles D, Gianni L *et al.* Trastuzumab emtansine for HER2-positive advanced breast cancer. *N Engl J Med*. 2012;367: 1783-91.
127. Bilous M, Dowsett M, Hanna W *et al.* Current perspectives on HER2 testing: a review of national testing guidelines. *Mod Pathol*. 2003;16: 173-82.
128. Cayre A, Mishellany F, Lagarde N, Penault-Llorca F. Comparison of different commercial kits for HER2 testing in breast cancer: looking for the accurate cutoff for amplification. *Breast Cancer Res*. 2007;9: R64.
129. Dowsett M, Hanna WM, Kockx M *et al.* Standardization of HER2 testing: results of an international proficiency-testing ring study. *Mod Pathol*. 2007;20: 584-91.
130. Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN *et al.* American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *J Clin Oncol*. 2007;25: 118-45.

131. McCullough AE, Dell'orto P, Reinholz MM *et al.* Central pathology laboratory review of HER2 and ER in early breast cancer: an ALTTO trial [BIG 2-06/NCCTG N063D (Alliance)] ring study. *Breast Cancer Res Treat.* 2014;143: 485-92.
132. Franchet C, Duprez-Paumier R, Caveriviere P, Bernard-Marty C, Valent A, Lacroix-Triki M. [Gene amplification after taxane-based neoadjuvant chemotherapy: separating the wheat from the chaff.]. *Correspondances en Onco-Théranostic.* 2015;4: 3.
133. Valent A, Penault-Llorca F, Cayre A, Kroemer G. Change in HER2 (ERBB2) gene status after taxane-based chemotherapy for breast cancer: polyploidization can lead to diagnostic pitfalls with potential impact for clinical management. *Cancer Genet.* 2013;206: 37-41.
134. Lindstrom LS, Karlsson E, Wilking UM *et al.* Clinically used breast cancer markers such as estrogen receptor, progesterone receptor, and human epidermal growth factor receptor 2 are unstable throughout tumor progression. *J Clin Oncol.* 2012;30: 2601-8.
135. Andre F, Bachelot T, Commo F *et al.* Comparative genomic hybridisation array and DNA sequencing to direct treatment of metastatic breast cancer: a multicentre, prospective trial (SAFIR01/UNICANCER). *Lancet Oncol.* 2014;15: 267-74.
136. Egele C, Fétique D, Arnould L *et al.* HERFrance - bilan d'étape 2012 du suivi national de trois facteurs pronostiques et prédictifs du cancer du sein : HER2, RO-RP et Ki-67. *Annales de Pathologie* [serial on the Internet]. 2012; 32(5S).
137. de Gramont A, Watson S, Ellis LM *et al.* Pragmatic issues in biomarker evaluation for targeted therapies in cancer. *Nat Rev Clin Oncol.* 2015;12: 197-212.
138. MacGrogan G, Mathieu MC, Poulet B *et al.* [Pre-analytical stage for biomarker assessment in breast cancer: 2014 update of the GEFPICS' guidelines in France]. *Ann Pathol.* 2014;34: 366-72.
139. Marchio C, Lambros MB, Gugliotta P *et al.* Does chromosome 17 centromere copy number predict polysomy in breast cancer? A fluorescence in situ hybridization and microarray-based CGH analysis. *J Pathol.* 2009;219: 16-24.
140. Starczynski J, Atkey N, Connelly Y *et al.* HER2 gene amplification in breast cancer: a rogues' gallery of challenging diagnostic cases: UKNEQAS interpretation guidelines and research recommendations. *Am J Clin Pathol.* 2012;137: 595-605.
141. Cardesa A, Zidar N, Alos L, Nadal A, Gale N, Kloppel G. The Kaiser's cancer revisited: was Virchow totally wrong? *Virchows Arch.* 2011;458: 649-57.
142. Jara-Lazaro AR, Thamboo TP, Teh M, Tan PH. Digital pathology: exploring its applications in diagnostic surgical pathology practice. *Pathology.* 2010;42: 512-8.

143. Weinstein RS, Graham AR, Richter LC *et al.* Overview of telepathology, virtual microscopy, and whole slide imaging: prospects for the future. *Hum Pathol.* 2009;40: 1057-69.
144. Al-Janabi S, Huisman A, Van Diest PJ. Digital pathology: current status and future perspectives. *Histopathology.* 2012;61: 1-9.
145. Beckwith BA. Standards for Digital Pathology and Whole Slide Imaging. In: Kaplan KJ, Rao LKF, editors. *Digital Pathology - Historical Perspectives, Current Concepts & Future Applications.* Switzerland: Springer; 2016.
146. Webster JD, Dunstan RW. Whole-slide imaging and automated image analysis: considerations and opportunities in the practice of pathology. *Vet Pathol.* 2014;51: 211-23.
147. Stalhammar G, Fuentes Martinez N, Lippert M *et al.* Digital image analysis outperforms manual biomarker assessment in breast cancer. *Mod Pathol.* 2016;29: 318-29.
148. Ayad E, Mansy M, Elwi D, Salem M, Salama M, Kayser K. Comparative study between quantitative digital image analysis and fluorescence in situ hybridization of breast cancer equivocal human epidermal growth factor receptors 2 score 2(+) cases. *J Pathol Inform.* 2015;6: 31.
149. van der Logt EM, Kuperus DA, van Setten JW *et al.* Fully automated fluorescent in situ hybridization (FISH) staining and digital analysis of HER2 in breast cancer: a validation study. *PLoS One.* 2015;10: e0123201.
150. Houle D, Govindaraju DR, Omholt S. Phenomics: the next challenge. *Nat Rev Genet.* 2010;11: 855-66.
151. Jacquemier J, Spyrtos F, Esterni B *et al.* SISH/CISH or qPCR as alternative techniques to FISH for determination of HER2 amplification status on breast tumors core needle biopsies: a multicenter experience based on 840 cases. *BMC Cancer.* 2013;13: 351.
152. Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics.* 1977;33: 159-74.
153. Long TH, Lawce H, Durum C *et al.* The New Equivocal: Changes to HER2 FISH Results When Applying the 2013 ASCO/CAP Guidelines. *Am J Clin Pathol.* 2015;144: 253-62.
154. Laurent C, Guerin M, Frenois FX *et al.* Whole-slide imaging is a robust alternative to traditional fluorescent microscopy for fluorescence in situ hybridization imaging using break-apart DNA probes. *Hum Pathol.* 2013;44: 1544-55.

155. Arnould L, Arveux P, Couturier J *et al.* Pathologic complete response to trastuzumab-based neoadjuvant therapy is related to the level of HER-2 amplification. *Clin Cancer Res.* 2007;13: 6404-9.
156. Press MF, Sauter G, Buyse M *et al.* HER2 Gene Amplification Testing by Fluorescent In Situ Hybridization (FISH): Comparison of the ASCO-College of American Pathologists Guidelines With FISH Scores Used for Enrollment in Breast Cancer International Research Group Clinical Trials. *J Clin Oncol.* 2016.
157. Jamal-Hanjani M, A'Hern R, Birkbak NJ *et al.* Extreme chromosomal instability forecasts improved outcome in ER-negative breast cancer: a prospective validation cohort study from the TACT trial. *Ann Oncol.* 2015;26: 1340-6.
158. Roylance R, Endesfelder D, Gorman P *et al.* Relationship of extreme chromosomal instability with long-term survival in a retrospective analysis of primary breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2011;20: 2183-94.

ANALYSE D'IMAGE AUTOMATISEE DE L'HYBRIDATION IN SITU EN FLUORESCENCE POUR L'EVALUATION DU STATUT *HER2* DANS LES CANCERS DU SEIN

RESUME :

Objectifs : L'évaluation du statut HER2 par le pathologiste dans les cancers du sein requiert fréquemment un recours à l'hybridation in situ en fluorescence (FISH). L'avènement des scanners de lames en fluorescence a permis de numériser les lames de FISH et d'envisager le développement d'analyses d'image automatisées. Notre objectif était d'évaluer la concordance de l'évaluation du statut *HER2* en FISH entre l'analyse automatisée et l'analyse manuelle de lames numérisées.

Matériels et méthodes : Trois algorithmes de classification des noyaux ont été comparés sur une cohorte technique avec différents paramètres de segmentation nucléaire. Les ajustements post-analyse les plus pertinents ont été évalués. Le meilleur algorithme et les paramètres optimaux ont été utilisés pour analyser une cohorte de validation de 30 cancers du sein. Les résultats obtenus en analyse d'image ont été comparés avec les diagnostics initiaux et les résultats de la lecture manuelle des lames numérisées.

Résultats : Une concordance globale forte a été retrouvée entre les résultats d'analyse d'image automatisée, la lecture manuelle des lames numérisées et les diagnostics initiaux (90 et 79% respectivement) en utilisant l'algorithme, les paramètres et les ajustements post-analyse optimaux définis dans l'étape technique.

Conclusion : L'analyse d'image automatisée constitue une aide fiable et reproductible pour l'évaluation du statut *HER2* en FISH.

TITRE EN ANGLAIS : Digital image analysis of fluorescent in situ hybridization for *HER2* status assessment in breast cancer

DISCIPLINE ADMINISTRATIVE : Médecine spécialisée clinique

MOTS-CLÉS : cancer, sein, HER2, hybridation in situ en fluorescence, FISH, analyse d'image, pathologie digitale

INTITULÉ ET ADRESSE DE L'UFR OU DU LABORATOIRE :

Université Toulouse III-Paul Sabatier
Faculté de médecine Toulouse-Purpan,
37 Allées Jules Guesde 31000 Toulouse

Directrice de thèse : Dr Magali LACROIX-TRIKI