

ÉTUDE COMPARATIVE DES TECHNIQUES D'IMMUNOHISTOCHIMIE ET MÉTHODES D'ANALYSE DES MARQUEURS DU CANCER DU SEIN AU QUÉBEC.

J Hinsinger¹, L Gaboury¹

¹Institut de Recherche en Immunologie et Cancérologie, Université de Montréal, Canada



Introduction

La détection d'un panel du sein impliquant les récepteurs hormonaux d'œstrogène (ER), progestérone (PR) et le protooncogène c-erbB-2 (HER2/neu) est devenue une analyse de routine au sein des hôpitaux. Afin de standardiser les procédures techniques et d'obtenir des résultats optimaux pour l'analyse de ces marqueurs, la plateforme (PF) d'Histologie de l'Institut de Recherche en Immunologie et Cancérologie a souhaité s'engager dans un projet pilote d'assurance qualité. En effet, le rapport de Pierre Dagenais préparé pour l'Agence d'Évaluation des Technologies et des Modes d'Intervention en Santé (AETMIS) en novembre 2008 souligne que les tests immunohistochimiques (IHC) sont peu centralisés au Québec. Par ailleurs, il n'y a aucun laboratoire de référence désigné pour soutenir l'ensemble des centres, ni de programme d'assurance qualité externe sur place. Soutenue par l'appui financier de Hoffmann-La Roche Ltd, cette démarche vise donc à créer une vaste banque de données pouvant aider les technologues médicaux à consolider la robustesse de leurs protocoles de colorations immunohistochimiques.

Méthode

Des lames de micromatrices tissulaires ont été préparées à partir de 15 patientes sur le Tissue arrayer (ATA27, Beecher Instruments, USA). Chaque patiente était représentée en triplicata de sorte que la micromatrice finale compte 45 carottes de carcinomes mammaires, d'1 mm de diamètre (Figure 1).

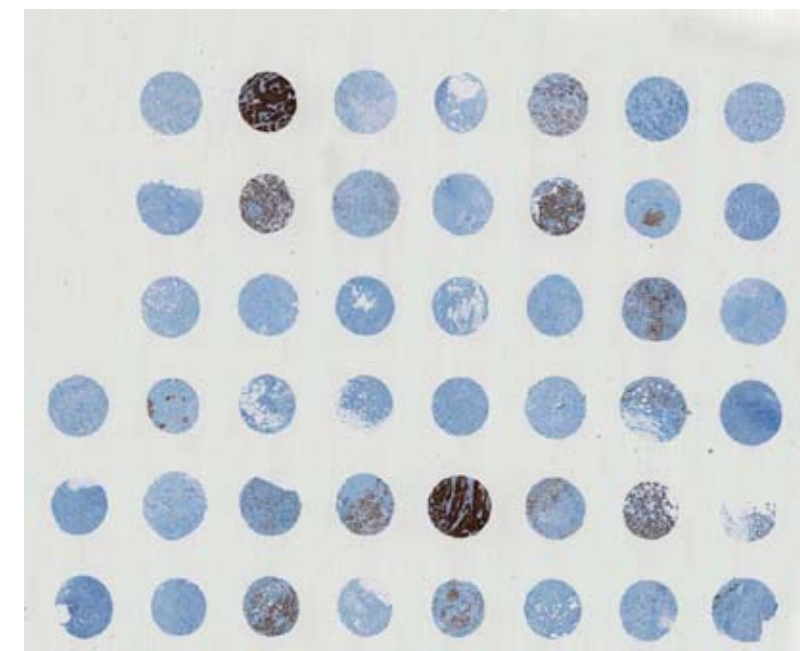


Figure 1. Disposition des cas sur la micromatrice tissulaire. Exemple de lame colorée pour le marquage de PR

Des lames ont été préparées à partir des sections des micromatrices générées. Celles-ci ont été envoyées à 34 centres hospitaliers à travers le Québec aux fins de marquage immunohistochimique et analyse par le pathologiste. Ces centres se sont donc vus remettre une trousse de 3 lames blanches dans le cadre d'une invitation à participer à un projet pilote de contrôle qualité sur le panel des marqueurs du cancer du sein. Parmi ces 34 centres, 6 centres ont reçu une 4e lame blanche pour l'analyse Fluorescent In Situ Hybridization (FISH) Her-2/Neu. Seuls 3 d'entre eux ont effectué l'analyse; 2 ont retourné uniquement les lames ER, PR et Her-2 colorées par IHC, n'effectuant pas le FISH comme supposé, et le dernier centre n'a pas répondu. Sur les 28 centres ayant reçu 3 lames blanches, 20 centres nous ont retourné les lames colorées comme demandé; 2 centres nous ont retourné les lames blanches, ne faisant pas directement les analyses IHC pour ces marqueurs et 6 centres n'ont pas répondu dans les délais impartis.

Les lames, une fois colorées par les centres participants, nous ont été réacheminées et ont été numérisées à la PF d'Histologie de l'IRIC sur le NanoZoomer Digital Pathology System (Hamamatsu, distribution Olympus, Canada) avant d'être mises en ligne sur un serveur de l'IRIC utilisant l'interface de visualisation mScope (Aurora, Canada). Les protocoles de coloration réceptionnés ont été récoltés dans un fichier Excel sous forme de tableau récapitulatif, listant l'instrument utilisé dans le cas d'une coloration automatisée, les réactifs et références d'anticorps avec température et durée d'incubation. Chaque centre s'est vu remettre un code numérique de 3 chiffres pour que tous leurs résultats restent anonymes dans le cadre de cette étude. Par ailleurs, pour certains centres participants, plusieurs lectures d'interprétation ont été effectuées. Dans ce cas-là, une lettre a été rajoutée à la suite du code pour distinguer les lecteurs. Le centre 104 par exemple, faisant appel à plusieurs pathologistes, a transmis 4 lectures pour l'analyse de chaque marqueur, donnant donc 4 interprétations 104A, 104B, 104C et 104D. L'ensemble des scores des analyses IHC données par les pathologistes de chaque centre, ont été ren-

trés dans un tableau Excel sous forme d'un système de code couleur : rouge pour un score positif supérieur à 2% des cellules tumorales marquées ou pour le score 3+ dans le cas de l'analyse Her-2; blanc pour négatif et 1% de cellules marquées; gris pour tout échantillon insuffisant ou non représentatif; orange pour le score 2+ (douteux) et vert pour le score 1+ dans le cas de l'analyse Her-2. L'analyse FISH a été effectuée par 3 centres pour lesquels le même code couleur a été appliqué de sorte que pour une amplification soit attribué le code couleur rouge et pour un résultat négatif soit attribué le code couleur blanc.

Pour l'analyse des marqueurs ER et PR, un pourcentage de concordance a été établi à partir d'une valeur référence déterminée par le résultat retrouvé par le plus grand nombre de lecteurs ou centres hospitaliers. La concordance correspond à la formule suivante :

$$C = \frac{\text{Nb d'échantillons semblables à la référence} \times 100}{\text{Nb d'échantillons totaux interprétés par le centre hospitalier ou lecteur du centre (x)}}$$

Concernant l'analyse du marqueur Her-2 par IHC, la référence considérée correspond à celle obtenue ultimement grâce à l'analyse FISH. La concordance a donc été établie à partir des résultats retrouvés majoritairement par les centres ayant effectué l'analyse FISH. Tous les cas douteux ont été exclus de l'analyse des données. Les résultats seront présentés prochainement sur le site web de l'IRIC à l'URL suivante : www.histo.irc.ca Les protocoles, scores d'évaluation et les lames numérisées y seront accessibles. Les centres participants pourront ainsi recueillir toute l'information nécessaire via un compte sécurisé et savoir de manière anonyme quelles autres techniques (manuelles, automatisées) et références d'anticorps sont utilisées par les centres voisins au Québec.

Résultats

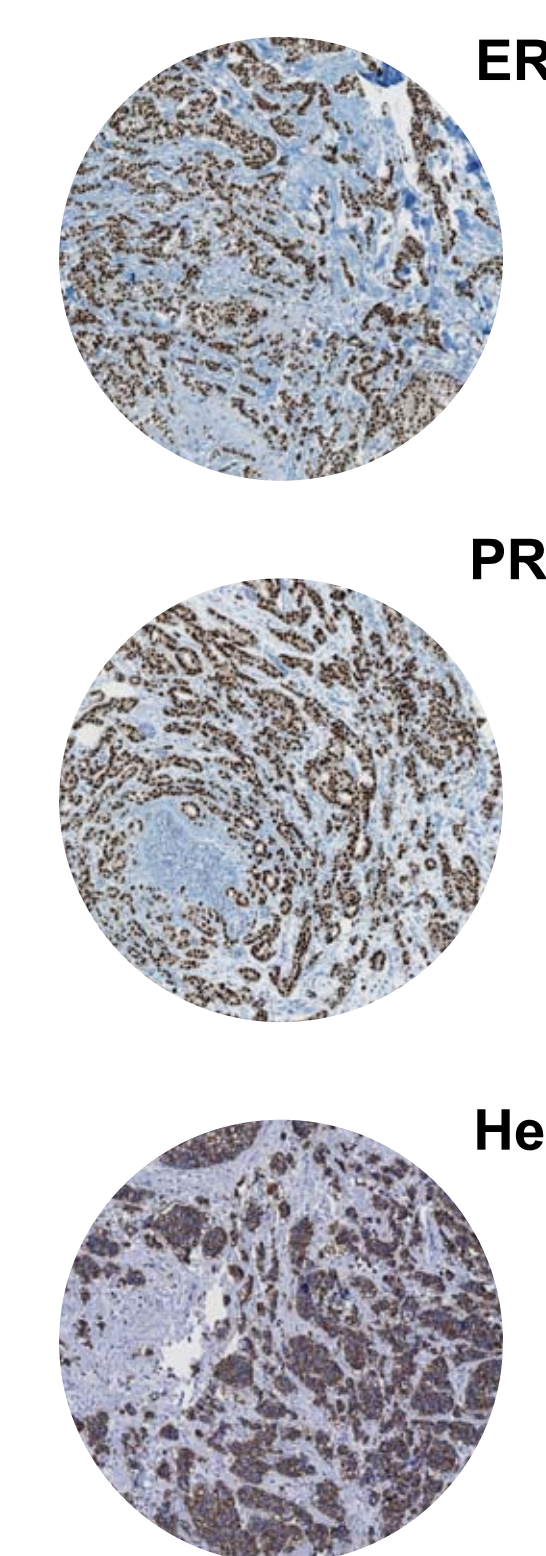
24 centres nous ont retourné des lames colorées. 24 protocoles ont été transmis pour la détection IHC du marqueur ER; 24 protocoles ont été transmis pour celle du marqueur PR; 22 protocoles ont été transmis pour celle du marqueur Her-2. Enfin, 3 protocoles ont été transmis pour l'analyse FISH Her-2/Neu. Les références d'anticorps ainsi que les instruments utilisés sont listés dans le tableau 1. Concernant les références utilisées pour le FISH, tous les centres ont utilisé la trousse Her-2/Neu – CEP 17 de Vysis.

Le taux de concordance des lecteurs ou centres hospitaliers par rapport à la référence varie de 71% à 100% pour le marqueur ER, de 67% à 100% pour PR, et de 48% à 100% pour Her-2 (graphique 1). Le taux de concordance varie de 93% à 97% pour la technique FISH. 15 lectures sur 29 montrent une concordance supérieure à 90% pour l'analyse du marqueur ER; 24 lectures sur 29 montrent une concordance supérieure à 90% pour l'analyse du marqueur PR; 13 lectures sur 25 montrent une concordance supérieure à 90% pour l'analyse de Her-2; enfin, les 4 lectures issues des analyses FISH montrent toutes une concordance supérieure à 90% par rapport à la référence.

La répartition du taux de concordance des lectures rendues par rapport à la référence est très homogène pour l'analyse des marqueurs ER et PR. La répartition est plus hétérogène concernant l'interprétation du marqueur Her-2 en IHC. Toutefois, l'analyse FISH permet de lever tout doute relatif à de faux négatifs. Une analyse des données se poursuit actuellement avec l'aide de la plateforme de Bioinformatique de l'IRIC pour tenter de dégager un modèle des réponses des lecteurs par rapport au score de référence pour chacun des marqueurs analysés. Il ne s'agit pas d'évaluer les lecteurs, mais de voir comment

sont distribuées les décisions d'interprétation (scores) en fonction de la référence. Cela permettra de savoir dans quelle proportion les lecteurs diagnostiquent de faux positifs et faux négatifs. D'après ce modèle pour l'analyse de Her-2, il apparaît très rarement qu'un score décidé comme positif soit en fait négatif, alors que l'inverse se produit plus fréquemment.

Dans une prochaine étape, un collège de pathologistes se réunira bientôt pour analyser plus en détail la qualité des colorations et dégager un ensemble de recommandations.

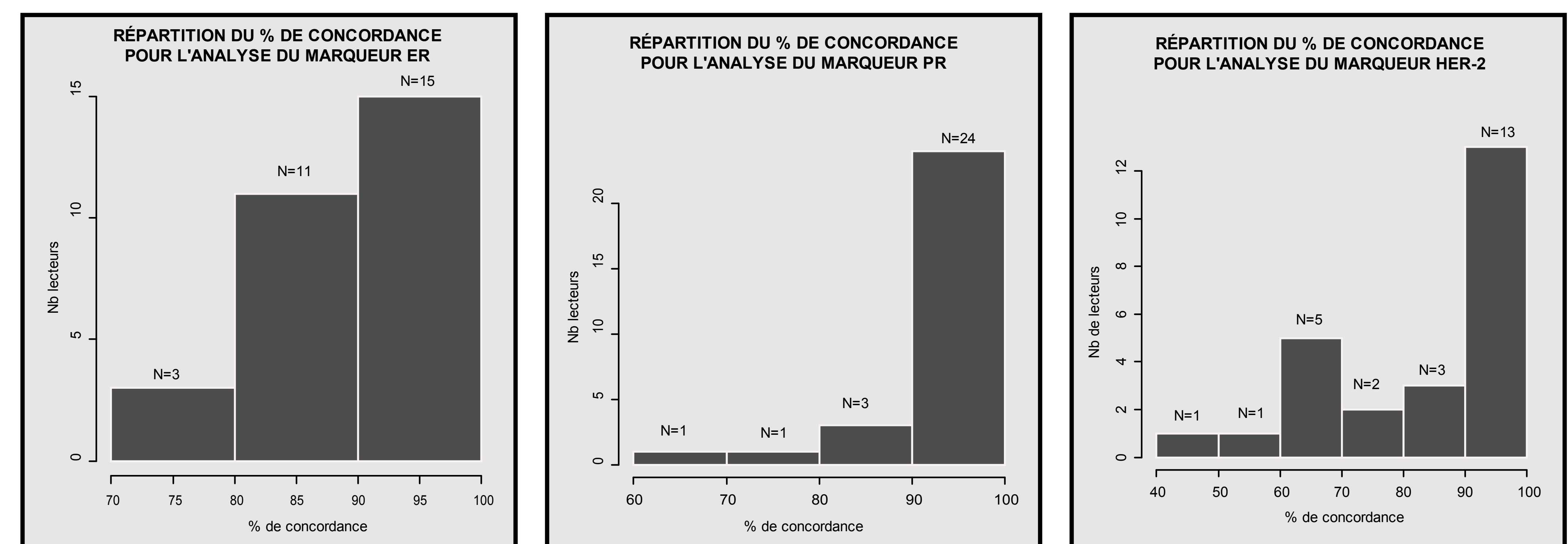


Anticorps primaire ER		N	Automatisation ER		N
Ventana SP1		12	Ventana Benchmark XT/LT		11
Dako 1D5		7	Ventana Benchmark		4
Neomarkers SP1		3	Discovery XT		1
Thermoscientific SP1		2	Dako Autostainer		1
Medicorp		1	Aucun		8

Anticorps primaire PR		N	Automatisation PR		N
Ventana 1 E2		10	Ventana Benchmark XT/LT		11
Ventana 16		1	Ventana Benchmark		4
Dako PgR636		10	Discovery XT		1
Neomarkers SP2		2	Dako Autostainer		1
Vector 16		1	Aucun		8
Zymed 2C5		1			

Anticorps primaire Her-2		N	Automatisation Her-2		N
Ventana Her2/Neu 4B5		8	Ventana Benchmark XT/LT		10
Dako A0485 C-erbB2		8	Ventana Benchmark		3
Thermoscientific SP3		2	Discovery XT		1
ID Labs CB11		1	Dako Autostainer		1
Zymed TAB 250		3	Aucun		6

Tableau 1. Anticorps et paramètres techniques pour l'ensemble des marqueurs IHC



Conclusion

Cette initiative de l'IRIC a permis de créer une banque de données de l'ensemble des protocoles utilisés par les centres hospitaliers au Québec, de répertorier les références d'anticorps et de réactifs utilisés en routine pour le diagnostic des patientes atteintes d'un cancer du sein. Un 2e événement de contrôle qualité prévu pour ces mêmes marqueurs permettra de suivre dans le temps les techniques de marquage et les références utilisées. Les commentaires complétés suite aux réponses des centres hospitaliers lors de ce premier événement devraient faciliter le 2e run. Parmi les suggestions émises figurent le besoin d'envoyer une lame supplémentaire pour effectuer un marquage H&E en parallèle des tests IHC et FISH et le besoin de réduire le nombre de carottes tissulaires à analyser : diminuer le nombre de cas et plus les espacer sur la matrice. Plusieurs centres ont souligné que trop de tissus étaient décollés à réception des lames blanches. Pour remédier à cela, un contrôle méticuleux des sections de micromatrice sera désormais effectué. Pour conclure, une majorité des participants sont ravis qu'un tel projet ait été réalisé au Québec et attendent avec impatience la publication des résultats sur le site web de l'IRIC.

Remerciements

Hoffmann-La Roche Limitée.

Sébastien Lemieux, Unité de recherche en bio-informatique fonctionnelle et structurale.

Patrick Gendron, Plateforme de Bio-Informatique.

Équipe technique, Plateforme d'Histologie.