

# Sommaire :

<b>I.</b>	<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>6</b>
<b>II.</b>	<b>ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE</b> .....	<b>7</b>
1.	<b>HYBRIDATION IN SITU EN FLUORESCENCE</b> .....	<b>7</b>
a.	<i>Hybridation</i> .....	<b>8</b>
b.	<i>Les différents types de sondes</i> .....	<b>9</b>
c.	<i>Le Marquage</i> .....	<b>11</b>
2.	<b>L'APPORT DE LA MICROSCOPIE A FLUORESCENCE</b> .....	<b>14</b>
3.	<b>HER2</b> .....	<b>16</b>
a.	<i>Définition et structure</i> .....	<b>16</b>
b.	<i>Intérêt de HER2 dans le diagnostic du cancers</i> .....	<b>17</b>
c.	<i>La voie de signalisation de HER2</i> .....	<b>18</b>
4.	<b>LA FISH DANS LE DIAGNOSTIC TUMORAL</b> .....	<b>19</b>
a.	<i>Le diagnostic du cancer gastrique avec HER2</i> .....	<b>19</b>
b.	<i>Le diagnostic du cancer du sein avec HER2</i> .....	<b>20</b>
<b>III.</b>	<b>MATERIELS ET METHODES</b> .....	<b>23</b>
1.	<b>L'EXAMEN HISTOLOGIQUE</b> .....	<b>23</b>
2.	<b>COLORATION</b> .....	<b>25</b>
3.	<b>PROTOCOLE EXPERIMENTAL DE LA FISH SUR COUPES TISSULAIRES</b> .....	<b>27</b>
a.	<i>Préparation des lames pour la FISH</i> .....	<b>27</b>
b.	<i>Déparaffinage :</i> .....	<b>27</b>
c.	<i>Prétraitement</i> .....	<b>27</b>
d.	<i>Traitement à la pepsine :</i> .....	<b>27</b>
e.	<i>Hybridation des échantillons</i> .....	<b>28</b>
f.	<i>Lavages Post- Hybridation</i> .....	<b>28</b>
g.	<i>Contre-Coloration des noyaux au DAPI :</i> .....	<b>29</b>
h.	<i>Lecture et interprétation:</i> .....	<b>29</b>
<b>IV.</b>	<b>RESULTATS ET DISCUSSION</b> .....	<b>29</b>
<b>V.</b>	<b>CONCLUSION</b> .....	<b>35</b>
<b>VI.</b>	<b>REFERENCES</b> .....	<b>36</b>

## Liste des abréviations :

- ADCC Cytotoxicité cellulaire anticorps dépendante
- ADN Acide Désoxyribonucléique
- ARN Acide Ribonucléique
- ASCO/CAP American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists
- ATP Adénosine triphosphate
- BAC chromosome bactérien artificiel
- CEP17 chromosome 17 Centromère
- DAPI 4',6-diamidino-2-phenylindole
- dUTP 2'-Désoxyuridine, 5'-Triphosphate
- EGFR Epidermal Growth Factor Receptor
- FISH Fluorescent in situ hybridization
- HER2 Human Epidermal Growth Factor Receptor-2
- HES Hématoxyline éosine safran
- IHC Immunohistochimie
- KDa Kilo-Dalton
- OMS Organisation mondiale de la Santé
- SSC saline-sodium citrate
- YAC Yeast Artificial Chromosomes

# I. Introduction

Le terme de tumeur (synonyme : « néoplasme » ou « néoplasie ») désigne actuellement une prolifération cellulaire excessive aboutissant à une masse tissulaire ressemblant plus ou moins au tissu normal homologue (adulte ou embryonnaire), ayant tendance à persister et à croître, témoignant de son autonomie biologique.

Les différentes composantes de chaque tumeur peuvent présenter des aspects morphologiques particuliers qui peuvent être regroupés par types histologiques. Les tumeurs sont ainsi classées en fonction de critères histologiques communs, définis par les classifications internationales, éditées par l'Organisation mondiale de la santé (OMS). La reconnaissance de ces critères et le classement de la tumeur dans le type adéquat sont la base du diagnostic anatomopathologique de toute tumeur.

En pratique, les tumeurs sont classées en fonction de l'organe dont elles dérivent (ex : sein, estomac), puis en fonction de leur type histologique. Le type histologique correspond à la cellule normale dont la tumeur semble dériver. Au sein d'un même organe, les différents types histologiques de tumeur peuvent avoir une évolutivité particulière, un mode d'extension préférentiel et une réponse variable suivant les traitements. Les traitements sont donc adaptés en fonction du type histologique de chaque tumeur.

Il est actuellement bien établi que les mutations de certains gènes peuvent aboutir au développement des tumeurs. L'un de ces gènes est celui qui code pour la protéine HER2 qui est le récepteur 2 du facteur de croissance épidermique humain ; c'est un récepteur transmembranaire de type tyrosine kinase de 185 kDa (1) qui contrôle une protéine située à la surface des cellules qui les aide à croître. Si le gène HER2 mute, cela risque de favoriser le développement d'une tumeur. , L'hybridation in situ en fluorescence (FISH) évalue le nombre de copies du gène HER2 présentes dans les cellules cancéreuses. Ainsi, cette technique permet le diagnostic du phénomène de cancérisation cellulaire.

L'objectif de notre travail consiste à déterminer le statut du gène HER2 comme facteur prédictif permettant d'améliorer le pronostic des patients atteints du cancer du sein ou de l'estomac (2).

## II. Etude bibliographique

### 1. Hybridation in situ en fluorescence

- **Définition**

FISH est une technique de biologie moléculaire, de cytogénétique, d'hybridation in situ utilisant des sondes marquées à l'aide d'un marqueur fluorescent. Elle permet de mettre en évidence des éléments situés à l'intérieur même de la cellule. Elle permet également de localiser une séquence de nucléotides connue mono-brin sur une coupe histologique (3)

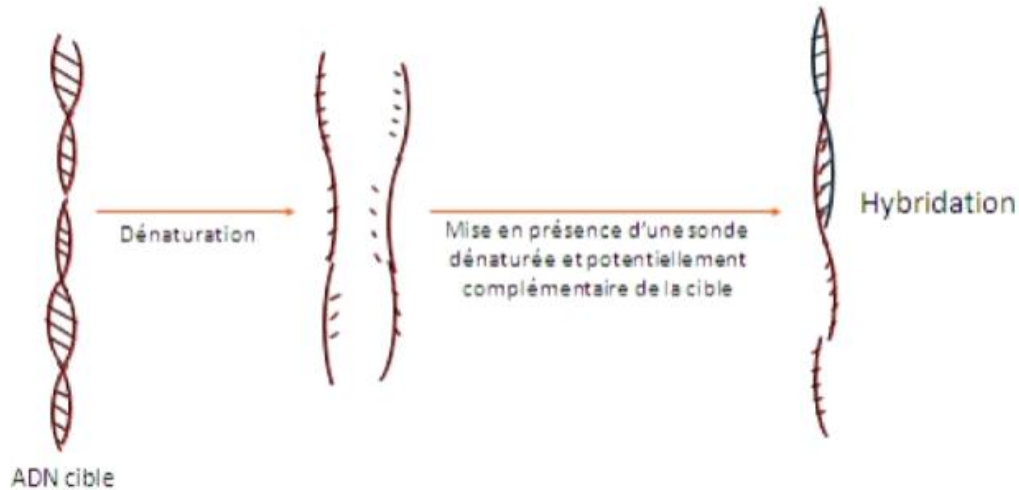
L'hybridation in situ fait appel à deux propriétés de la molécule d'ADN: d'une part la possibilité de la dénaturer et d'autre part, la complémentarité des bases des deux brins et leur tendance à se réassocier lorsqu'ils sont séparés.

La dénaturation permet d'obtenir des molécules monocaténares ou simples brins qui auront tendance à se réassocier une fois replacées dans des conditions physiologiques. Si des molécules d'ADN dénaturées sont placées dans un milieu contenant des molécules simple brin d'ADN ou d'ARN de séquence connue, celles-ci auront tendance à s'associer avec les portions des ADN dénaturés qui leur sont complémentaires

- **Principe de la technique**

Le principe repose sur l'utilisation d'une sonde moléculaire, c'est-à-dire une petite séquence d'ADN (ou d'ARN) dont l'emplacement normal est connu dans le génome et qui est marquée chimiquement de façon à pouvoir être repérée par la suite. Cette sonde est mise en contact avec les chromosomes d'une mitose et va s'hybrider (se fixer) spécifiquement au niveau de sa séquence complémentaire. On peut alors visualiser la sonde au microscope dont l'emplacement identifie précisément la région chromosomique dont elle est complémentaire.

La sonde hybridée avec la cible est révélée par un signal fluorescent (4) (figure 1)



*Figure 1* : Principe de la FISH (5)

#### a. Hybridation

C'est l'opération qui consiste à mettre en présence la sonde dénaturée généralement par la chaleur et l'ADN des chromosomes et des noyaux également dénaturés. Elle permet aussi de trouver des séquences identiques à différents éléments génétiques ou pour identifier la localisation d'un gène spécifique et également de détecter la présence de séquences d'ADN spécifiques d'un organisme donné (6)

L'hybridation est menée à une température permettant la formation d'un complexe stable entre les séquences homologues de l'ADN cible et de l'ADN de la sonde. Son efficacité dépend du temps d'hybridation et de la concentration de la sonde, un lavage élimine les sondes non hybridées.

Il existe plusieurs techniques basées sur l'hybridation de sonde, la plus couramment utilisée est la technique du Southern blot.

C'est une méthode permettant de détecter et de visualiser des fragments d'ADN de toute portion précise du génome.

- Principe de Southern blot :
- Extraction de l'ADN à analyser
- Digestion de l'ADN par une enzyme de restriction

- Séparation des fragments par électrophorèse
- Traitement du gel d'agarose par la soude (dénaturation des fragments de restriction)
- Transfert des fragments dénaturés sur membrane de nitrocellulose (transfert se fait par capillarité)
- Hybridation
- Lavages pour éliminer de sonde non hybridée
- Détection de l'hybridation selon le marqueur utilisé.

### **b. Les différents types de sondes**

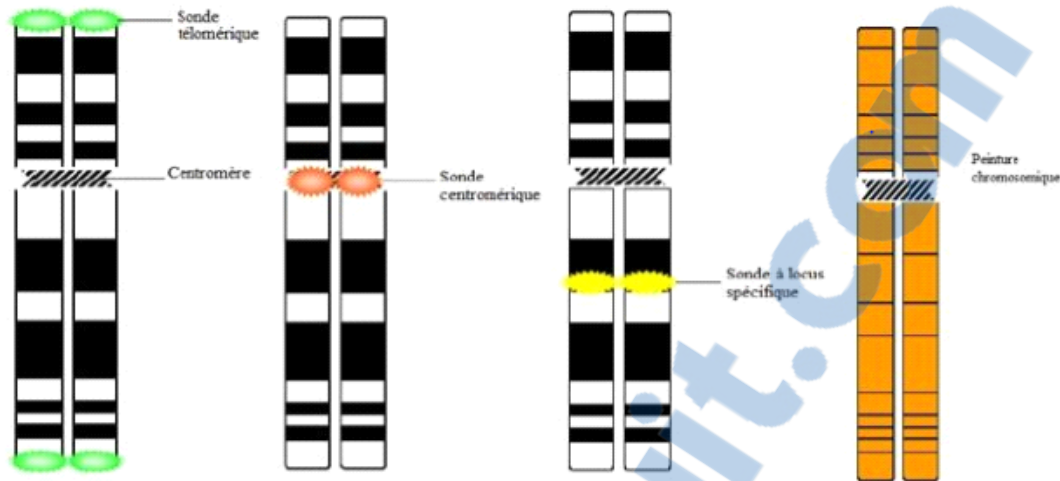
Une sonde est un brin d'acide nucléique qui peut être marqué et employé pour s'hybrider avec un acide nucléique complémentaire situé dans un mélange.

Les sondes peuvent être générales ou spécifiques.

Les sondes d'acides nucléiques correspondent généralement à l'ADN simple brin complémentaire d'une séquence unique d'un gène d'intérêt(7)

Les sondes d'acides nucléiques présentent différents avantages, sont plus stables que les protéines et sont plus résistantes aux solvants organiques et autres produits chimiques. Plusieurs types de sondes sont disponibles pour la détection des remaniements chromosomiques. Elles peuvent être classées en quatre catégories (figure 2) :

- les sondes spécifiques d'un locus donné,
- les sondes de peinture chromosomique spécifiques d'un chromosome entier ou d'un bras chromosomique
- les sondes de séquences répétées centromériques
- les sondes télomériques



**Figure 2 : Différents types de sondes utilisées en FISH (8)**

- Les sondes de séquences uniques ont une taille de 0,5 kb à 1-2 Mb (9)

Comme leur nom l'indique, ces sondes de petite taille permettent d'identifier une région très précise du génome. Elles sont obtenues par marquage de l'ADN cloné dans différents vecteurs (plasmides, cosmides, YACs, BACs...). Leur intérêt principal réside dans la mise en évidence rapide de remaniements impliquant une région chromosomique précise (amplifications, microdélétions, translocations, inversions ...)

- Les sondes de peinture chromosomique

Elles sont constituées d'un ensemble de sondes de petite taille qui couvrent l'ensemble du chromosome. Après hybridation, on observe un marquage de tout le chromosome (10). Il existe également des peintures spécifiques d'un bras ou même de quelques bandes chromosomiques. Ces sondes sont très utiles pour interpréter certaines translocations complexes, mettre en évidence des échanges de petite taille, ou identifier précisément l'origine d'un fragment non identifié.

- Les sondes de séquences répétées centromériques

Elles s'hybrident au niveau des centromères des chromosomes. Les séquences dont elles sont complémentaires sont naturellement présentes en un grand nombre d'exemplaires au niveau des centromères. Le signal obtenu est donc en général intense car la sonde s'hybride sur chacune des séquences complémentaires présentes. Ces sondes sont surtout

utiles pour dénombrer les chromosomes, aussi bien en métaphase qu'en interphase et pour identifier l'origine des chromosomes marqueurs. (11)

- Sondes télomériques

Elles sont spécifiques des extrémités terminales des bras courts et longs des chromosomes. Elles permettent de mettre en évidence des anomalies chromosomiques impliquant les régions télomériques des chromosomes, difficiles à visualiser avec d'autres techniques

### c. Le Marquage

Le marquage est l'étape qui permet d'introduire des fluorochromes dans un fragment d'ADN.

Au début des années 80, on utilisait des nucléotides, le plus souvent le dUTP, couplé aux haptènes que sont la digoxigénine et la biotine. Les sondes étaient alors révélées grâce à des anticorps antidigoxigénine ou de la streptavidine (substance se fixant spécifiquement sur la biotine) couplés à des fluorochromes. Elles peuvent aussi être marquées directement par incorporation de nucléotides couplés à une molécule fluorescente lors de leur synthèse, leur détection étant alors directe.

On distingue le marquage dit chaud utilisant des isotopes radioactifs et le marquage froid utilisant des molécules fluorescentes ou luminescentes. Ces dernières sont de plus en plus utilisées car elles sont plus pratiques

Aujourd'hui, les fluorochromes sont directement fixés sur les nucléotides.

On distingue plusieurs méthodes selon la localisation du marquage (extrémités ou interne à la molécule) et selon la nature de la séquence marquée (simple ou double brin).

Le phosphate 32 est le radio-isotope le plus utilisé incorporé dans la sonde enzymatiquement au moyen d'un ou de plusieurs nucléotides triP radiomarqués. Il existe des sondes radiomarquées par le soufre 35, le tritium (H3) utilisées pour la FISH.

On peut aussi réaliser un marquage en 5' avec la T4 polynucléotide kinase.

- **Marquage en 3'**

Il s'agit d'une polymérase de 58 KDa, qui catalyse la polymérisation des nucléotides à l'extrémité 3' OH des amorces oligonucléotidiques sans l'aide d'une matrice.



Dans ce cas il va falloir ajouter un ou plusieurs nucléotides à l'extrémité 3' de la sonde (figure3).

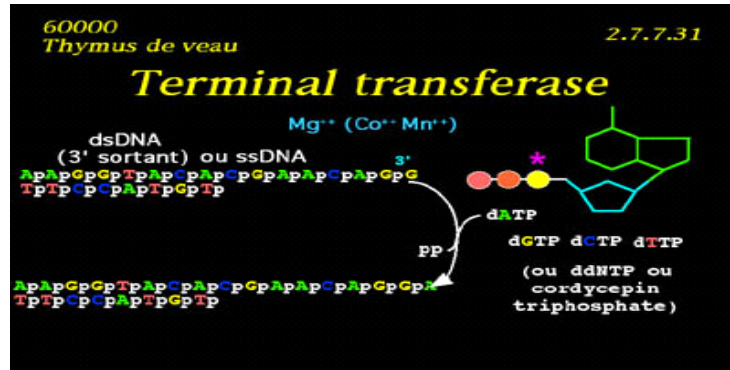


Figure 3 : Marquage en 3' (12).

- **Marquage en 5'**

La polynucléotide kinase du bactériophage T4 catalyse le transfert du phosphate radioactif de l'ATP  $\gamma^{32}$  sur l'extrémité 5' d'un fragment d'ADN. (Figure 4).

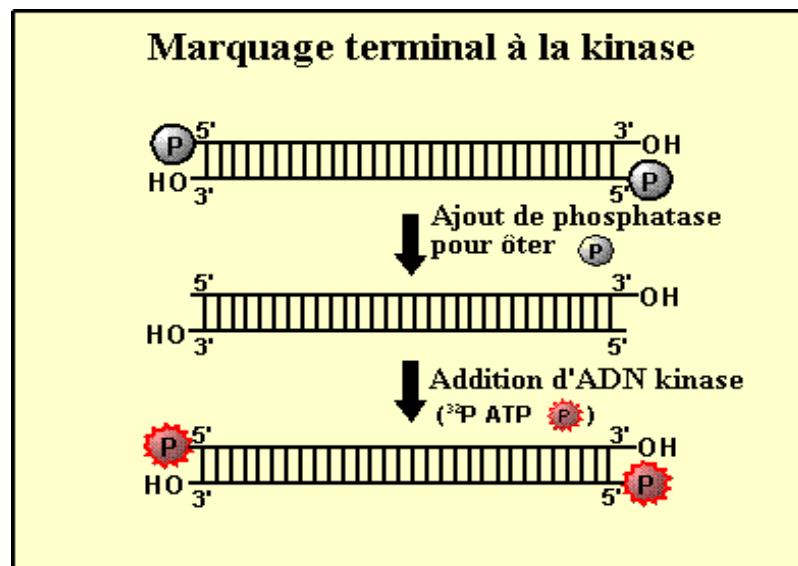
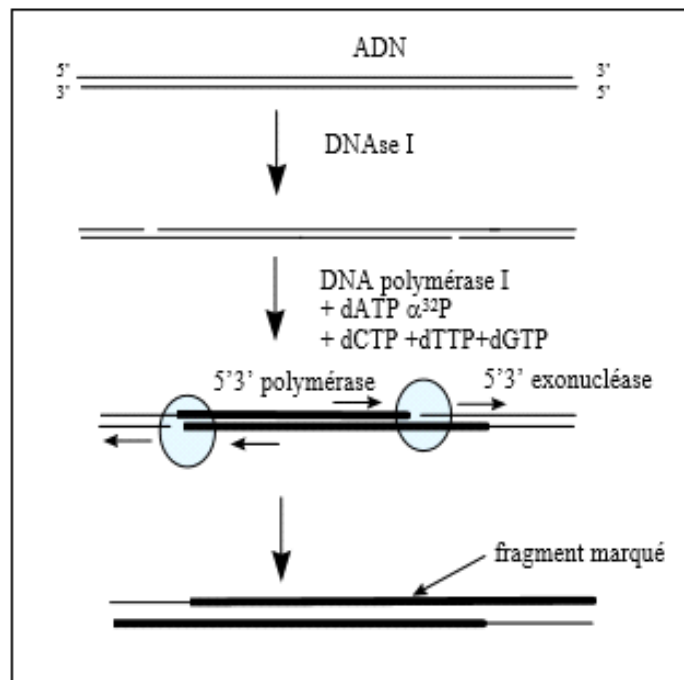


Figure 4 : Marquage en 5' (13).

Le marquage des sondes peut se faire par deux méthodes différentes : Nick translation et random-priming, Le choix de la méthode dépend du type et de la longueur de la sonde (14).

- **La Nick translation** ou déplacement de coupure vise à marquer un ADN double brin. On digère le fragment d'ADN par la DNase I de E. coli qui coupe après les pyrimidines, mais d'une façon ménagée de façon à ne faire que quelques coupures au hasard

sur le fragment. Ces coupures sur un seul des brins sont appelées des nicks, elles libèrent des extrémités 5' OH à l'intérieur du fragment. On utilise ensuite l'ADN polymérase I de E. coli qui présente plusieurs activités dont une activité 5'-3' exonucléase et une activité 5'-3' polymérase. (Il y a en plus une activité 3'-5' exonucléase moins rapide que l'activité polymérase en présence de nucléotides). Les deux brins sont ainsi marqués sur toute leur longueur à l'exception de leur extrémité 5' (figure 5), La difficulté de cette méthode est de réaliser la digestion ménagée pour initier la polymérisation. Si la digestion est trop forte, il y a trop de nick, certains se trouvent à proximité l'un de l'autre sur les deux brins et on obtient uniquement des petits morceaux d'ADN, si elle est trop faible, un grand nombre de molécules ne sont pas marquées. De plus l'activité 5'-3' exonucléase de l'ADN polymérase I attaque le fragment d'ADN par l'extrémité et on obtient un raccourcissement du fragment. (15).



**Figure 5 :** Marquage interne par Nick-translation.

Cette méthode « historique » n'est plus utilisée et a été remplacée par le « Random priming »

- **Random priming** : Marquage par amorçage au hasard

Très employé dans les laboratoires, il permet d'obtenir des activités spécifiques plus élevées ce qui permet de détecter un gène sur quelques mg d'ADN génomique.

On commence par dénaturer le fragment d'ADN, les oligonucléotides sont hybridés au hasard (16).

Dans cette technique de marquage, les deux brins de la sonde sont préalablement séparés par chauffage suivi d'un refroidissement brutal, puis on ajoute un mélange d'oligonucléotides de synthèse, ces derniers vont s'hybrider avec la sonde, et vont servir d'amorces pour le fragment de Klenow de l'ADN pol I qui va reconstituer l'intégrité des deux fragments en présence des désoxyribonucléosides triP radioactifs (32P) (figure 6).

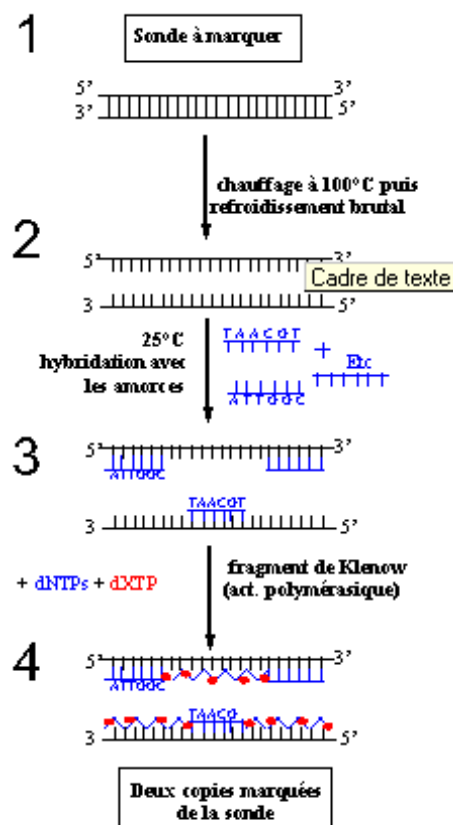
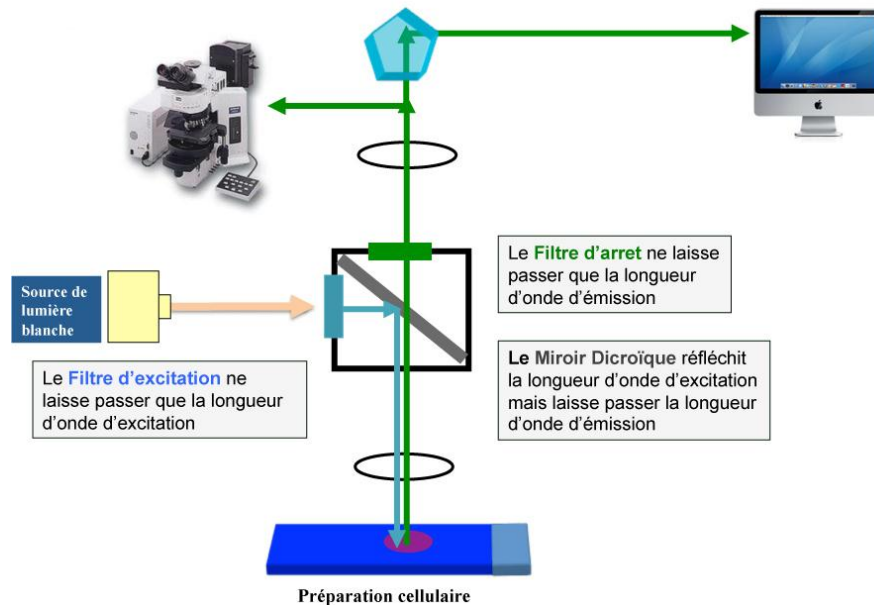


Figure 6 : le Marquage par Random priming(17).

## 2. L'apport de la Microscopie à Fluorescence

- *L'Observation*

L'observation des séquences hybridées s'effectue à l'aide d'un microscope à épifluorescence, qui éclaire l'échantillon avec une lumière de longueur d'onde assez spécifique, et récupère la lumière émise par les sites fluorescents, en général de longueur d'onde supérieure, ce qui permet de n'observer que les sites hybridés ( figure 7 )



**Figure 7 : La microscopie en épifluorescence (18)**

La figure 7 illustre la microscopie en épifluorescence. Un rayon lumineux de lumière blanche (contenant l'ensemble des longueurs d'onde de l'ultra violet aux infrarouges) est généré par des lampes à mercure (donnant des pics d'intensité dans les longueurs d'onde du visible) ou à Xénon (pics d'intensité homogène pour toutes les longueurs d'onde).

Cette lumière est transmise au niveau d'un dispositif contenant deux filtres et un miroir dichroïque. Le premier filtre sélectionne une longueur d'onde d'excitation (correspondant au fluorochrome intégré dans la sonde d'intérêt) qui est ensuite réfléchi par le miroir dichroïque sur la lame hybridée. Une fois le fluorochrome excité, il émet une longueur d'onde d'émission, d'intensité plus faible, qui peut alors passer à travers le miroir dichroïque pour arriver ensuite au filtre d'émission de façon à éliminer des longueurs d'onde parasites. Cette longueur d'onde d'émission est par la suite transmise aux oculaires du microscope pour être observée par l'œil de l'observateur ou au niveau d'une caméra qui numérise ce signal. (19)

Les résultats sont étudiés avec un microscope à épifluorescence équipé de filtres spécifiques des différents fluorochromes et éventuellement d'un analyseur d'images. Il est ainsi possible, en analysant les signaux fluorescents, de déterminer la présence, la localisation et le nombre de copies d'une séquence cible et de détecter les remaniements de nombre ou de structure (20).

### 3. HER2

#### a. Définition et structure

La protéine HER2 ou Human Epidermal Growth Factor Receptor-2 est le récepteur 2 du facteur de croissance épidermique humain est un récepteur transmembranaire tyrosine kinase appartenant à la famille des récepteurs du facteur de croissance épidermique (EGFR) (21)

HER2 est aussi une glycoprotéine membranaire constituée de 1255 acides aminés et ayant un poids moléculaire de 185 kDa, elle est codée par un proto-oncogène appelé HER2, localisé au niveau du chromosome 17q21 (22) (figure 8)

La protéine de surface Her2 qui est un récepteur membranaire à activité tyrosine kinase transmet les signaux de croissance de l'extérieur vers l'intérieur de la cellule et intervient dans la régulation de la croissance, de la division et de la différenciation cellulaire.

Il est composé d'un domaine tyrosine kinase intracellulaire qui présente une homologie avec les autres membres de la famille des récepteurs à tyrosine kinase, un domaine transmembranaire composé d'un segment lipophile qui permet l'ancrage du récepteur dans la membrane cellulaire et un domaine extracellulaire composé de quatre sous unités (I-IV) liant le ligand. Les sous unités I et III du domaine extracellulaire sont des sites de fixation du ligand. Les sous unités II et IV sont des domaines riches en cystéine permettant l'interaction entre les monomères. Le domaine C-terminal est riche en résidus tyrosine qui correspondent aux sites de phosphorylation (23) (figure 9).

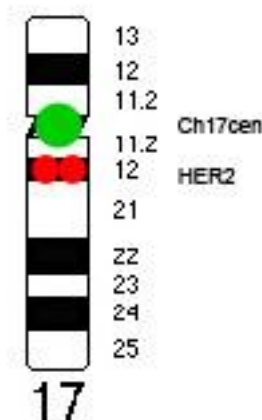
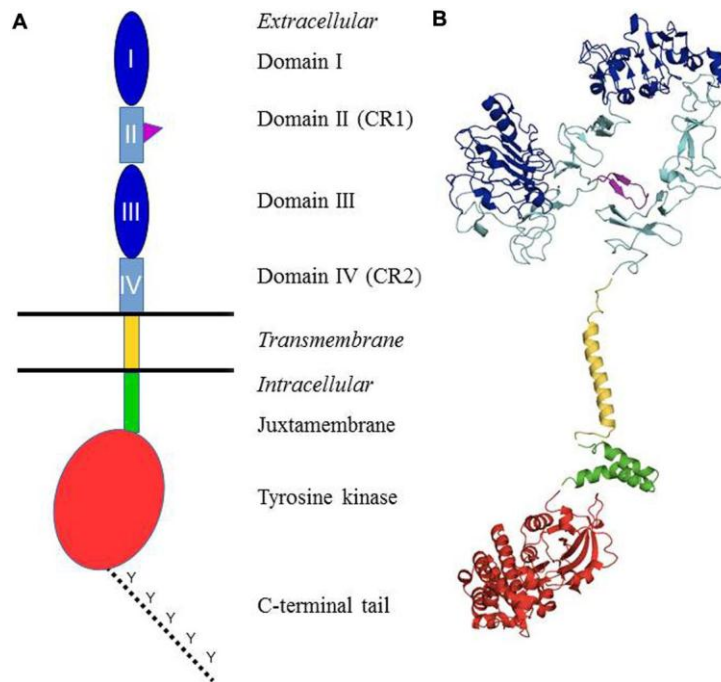


Figure 8 : localisation du gène HER2 sur le chromosome 17 (24).



**Figure 9** : la structure du HER2 (25).

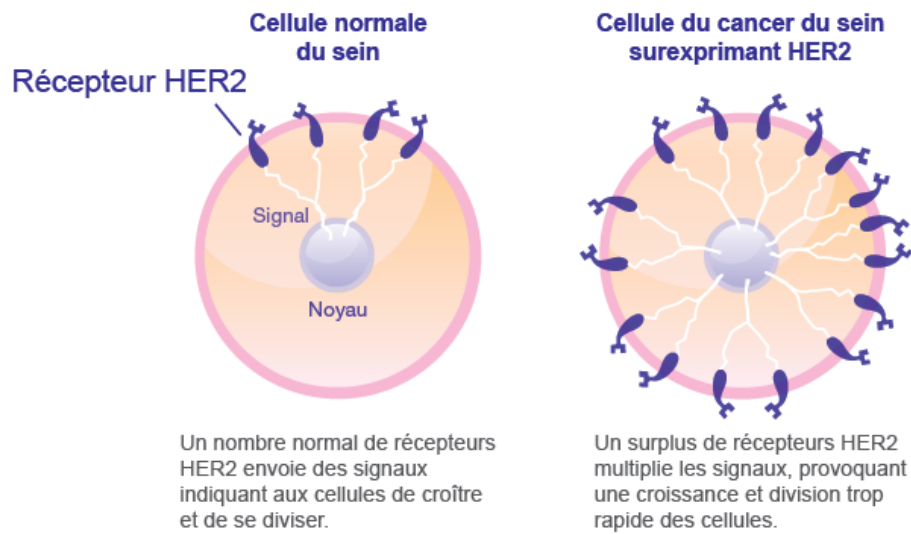
### **b. Intérêt de HER2 dans le diagnostic du cancers**

Le récepteur HER2 a été le premier récepteur membranaire clairement impliqué dans la genèse de beaucoup de cancers notamment les tumeurs solides par différents mécanismes.

La surexpression d'HER2 est rencontrée dans les cancers de l'estomac et les cancers du sein (26)

La surexpression semble être le mécanisme principal par lequel HER2 promeut l'oncogenèse (27)

HER2 est activé par un phénomène d'amplification génique suivi d'une surexpression qui aboutit à une activation continue des récepteurs HER2, et ce qui assure le maintien de son activation en stimulant la croissance cellulaire. Ces tumeurs sont dites HER2

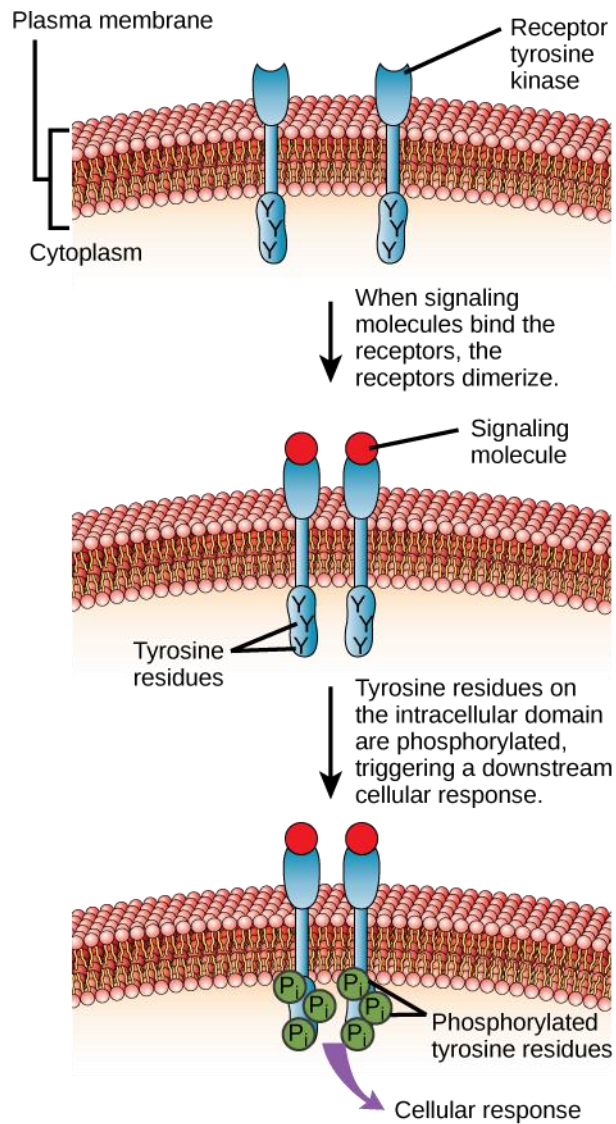


**Figure 10 :** Récepteur HER2 dans une cellule saine et dans une cellule cancéreuse (28).

### c. La voie de signalisation de HER2

HER2 s'active par s'hétérodimérisation avec les autres récepteurs de sa famille. Le récepteur HER2 est en configuration ouverte avec un domaine extracellulaire fixe et ressemble à celle de l'état activé par le ligand (29-30) alors que les autres récepteurs en absence de ligand sont en configuration fermée. La configuration fermée est caractérisée par des contacts étroits entre les domaines II et IV et la configuration ouverte par des contacts étroits entre les domaines I et III. La configuration ouverte est plus favorable à la dimérisation via les boucles des domaines II et IV. Ce qui peut expliquer L'absence d'affinité de HER2 pour un ligand par sa structure ouverte car il ne requiert pas la fixation de ligand pour relâcher la conformation fermée. D'autre part, Graus-Porta et collaborateurs ont montré que HER2 était le partenaire privilégié pour la formation des hétérodimères (31). Son activation peut être alors expliquée par le fait qu'il soit le partenaire de choix dans les hétérodimères, il est donc transactivé par le ligand reconnu par l'autre récepteur de l'hétérodimère.

Le dimère phosphorylé représente le récepteur activé. Cette activation entraîne des actions variées sur le processus de cancérisation : augmentation de la division cellulaire, de l'angiogenèse, de la diffusion métastatique, inhibition de l'apoptose (32) (figure 11)



**Figure 11 :** la voie de signalisation du HER2.

#### 4. La FISH dans le diagnostic tumoral

##### a. Le diagnostic du cancer gastrique avec HER2

Le cancer gastrique est très fréquent ; il est la seconde cause de décès par cancer dans le monde. Environ 65 % des patients atteints d'un cancer gastrique présentent une maladie localement avancée ou métastatique au moment du diagnostic. (33). Au Maroc, le cancer de l'estomac représente le deuxième cancer du tube digestif le plus fréquent dans la région de Fès-Boulemane (34), tout cancer gastrique métastatique doit être testé pour HER2 sur bloc en paraffine de pièce opératoire de la tumeur primitive ou de métastases

La FISH présente une grande spécificité puisqu'elle permet une visualisation directe du signal recherché au niveau des cellules carcinomateuses, elle permet aussi un bon



contrôle morphologique du tissu(35), La détection du marqueur HER2 est acceptable sur des spécimens chirurgicaux et biopsiques (36,37), la détermination du statut HER2 pour les patients atteints de cancers gastriques, se fait par technique immunohistochimique. Le test est réalisé sur la tumeur primitive (pièce opératoire ou biopsies) (38).

Un immunomarquage est considéré comme positif ou HER2 3+ quand le marquage membranaire est complet et intense dans plus de 10% des cellules tumorales invasives.

Un immunomarquage est considéré comme négatif, HER2 1+ quand le marquage membranaire est très peu intense dans au moins 10% des cellules tumorales invasives

Un immunomarquage est considéré comme négatif, HER2 0 en l'absence de marquage ou quand le marquage est retrouvé dans moins de 10% des cellules tumorales invasives.

Un immunomarquage est considéré ambigu ou HER2 2+ quand le marquage membranaire est complet d'intensité moyenne ou faible dans plus de 10 % des cellules tumorales invasives (39).

Si le cas 2+ est confirmé, On teste par la technique D'hybridation in Situ en fluorescence.

Les résultats de FISH sont exprimés par un ratio entre le nombre de copies des HER2 et le nombre de copies du chromosome 17,

Pour l'analyse FISH, une tumeur était considérée comme amplifiée si le ratio HER2 / CEP17 était supérieur ou égal à 2 (CEP17 : Centromère du chromosome 17).

#### **b. Le diagnostic du cancer du sein avec HER2**

Dans les cancers du sein, une amplification du gène HER2 conduit quasi toujours à une surexpression de la protéine à la surface de la cellule.

L'existence d'une amplification récurrente de l'oncogène HER2 dans les cancers du sein a été découverte par Dennis Slamon et al. en 1987, quinze ans après cette découverte, une thérapie ciblée anti-HER2 était mise à la disposition des oncologues : le trastuzumab (40)

Cette possibilité thérapeutique nécessitait donc une détermination précise du statut HER2 des carcinomes mammaires au diagnostic , un statut HER2 positif se définit donc soit

par immunohistochimie (IHC) , soit par l’amplification du gène mise en évidence par hybridation in situ en fluorescence (FISH) (41) , la technique de première ligne est l’immunohistochimie (IHC).

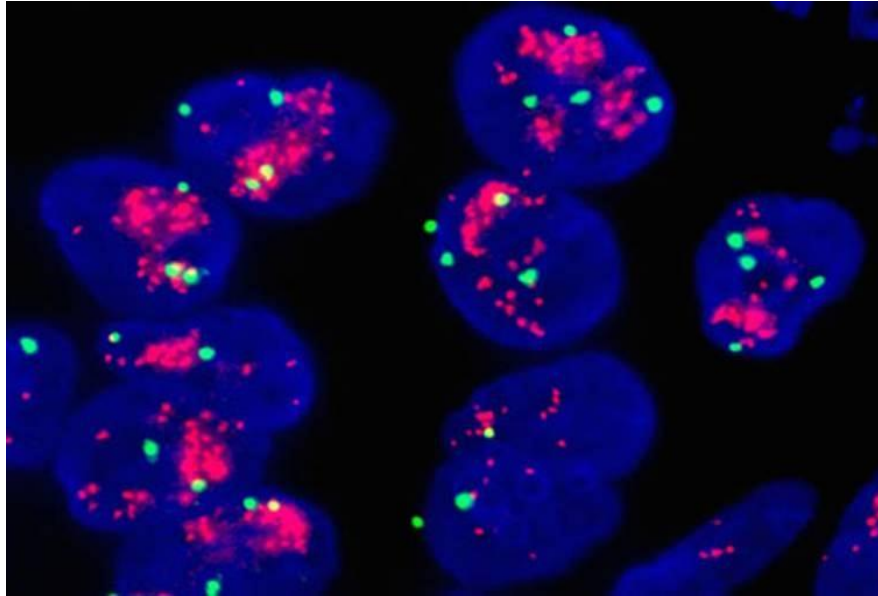
Les résultats de l’IHC identifient 3 scores de HER2 ( tableau 1) : scores 0 et 1+ avec 10 % de cellules ayant un marquage d’intensité faible et incomplet ; score 3+ avec plus de 30 % de cellules marquées comportant un marquage d’intensité forte et complet ; score 2+ avec au moins 10 % de cellules marquées ( $\geq 10\%$ ) avec un marquage d’intensité faible ou modérée mais complet ( Tableau 1)

<b>Score</b>	<b>Marquage</b>	<b>Indication pour le trastuzumab</b>
0	Absence de marquage ou <10% de cellules	Non
+	Marquage faible et incomplet de > 10% de cellules	Non
++	Marquage faible ou modéré et complet de > 10% de cellules	Oui, Seulement si amplification prouvée par FISH
+++	Marquage fort et complet de > 30 % de cellules	Oui

**Tableau 1** : Interprétation et scores de la surexpression par immunohistochimie de la protéine HER2

Les scores 2+ sont appelés “cas équivoques” et comprennent également les cas avec une surexpression hétérogène de HER2. Les carcinomes avec un score 2+ doivent avoir une détermination du statut du gène HER2 par hybridation in situ en fluorescence ou en révélation analysable en lumière optique (grains d’argent pour la sonde HER2 et chromogène rouge pour le centromère du chromosome 17), afin que les cas amplifiés peuvent bénéficier d’un traitement anti-HER2 soient déterminés. Une tumeur est considérée

comme amplifiée pour HER2 si le ratio HER2/centromère du chromosome 17 est supérieur à 2 ou le nombre de signaux de HER2 seul supérieur à 6. (42). Ces seuils de positivité pour l'amplification sont également définis par le Collège des pathologistes américains (43)



*Figure 12* : l'amplification du HER2 dans le cancer du sein (44).

## III. Matériels et Méthodes

### 1. L'Examen Histologique

Les prélèvements destinés au laboratoire pour un examen histologique, passent par une série d'étapes avant qu'ils ne soient lus et interprétés par le pathologiste responsable.

La technique est réalisée en cinq étapes qui sont :

- La fixation.
- L'inclusion.
- La microtomie.
- La coloration.
- Le montage.

#### ✓ **Fixation :**

C'est une étape essentielle dans la préparation tissulaire. Son but est de s'opposer à l'autolyse tissulaire et à la putréfaction, de garantir la conservation des structures et le durcissement des pièces, afin de garder le prélèvement dans un état aussi proche que possible de l'état vivant.

Les échantillons sont fixés dans du formol à 10%. La durée de fixation est variable et la quantité de fixateur utilisée doit être au moins dix fois plus importante que le volume de tissu à fixer : quelques heures suffisent donc pour fixer la biopsie.

Un examen macroscopique est d'abord effectué, au cours duquel un descriptif détaillé de la biopsie ou de la pièce est établi (taille mesurée dans les 3 dimensions, couleur, forme, aspect de la coupe.)

Après cet examen macroscopique, le pathologiste incube les fragments dans des cassettes susceptibles de subir une inclusion dans la paraffine.

#### ✓ **Inclusion :**

Elle a pour but d'enfermer le prélèvement dans une substance qui le pénètre et l'infiltré. Les tissus acquièrent ainsi une consistance permettant d'obtenir des coupes minces au microtome

La substance d'inclusion, généralement la paraffine, est une substance liquide à chaud, solide à température ambiante et insoluble dans l'eau et dans l'alcool.

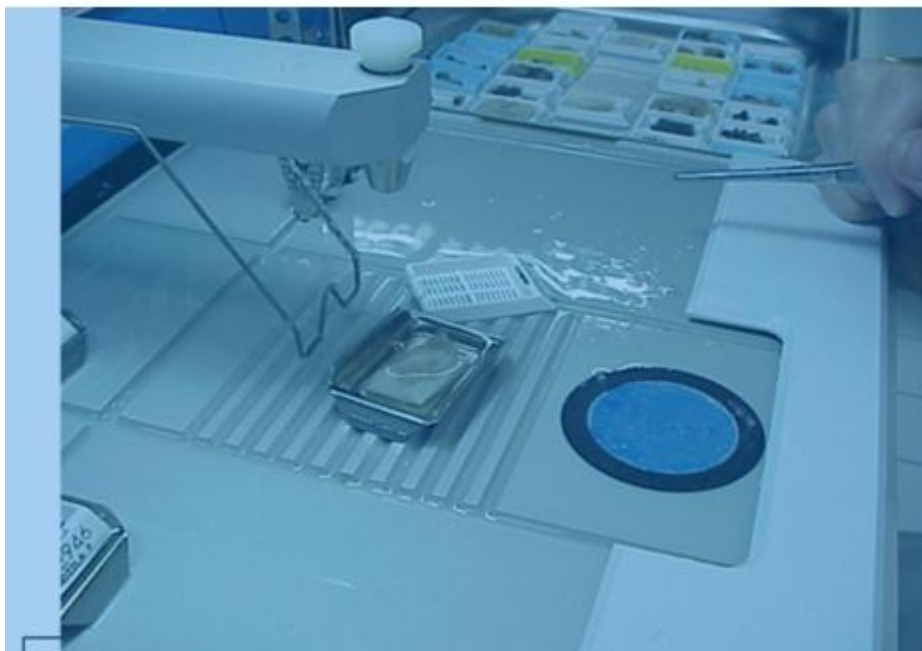
Comme cette substance est hydrophobe (non miscible à l'eau), la pièce anatomique doit être entièrement déshydratée avant son inclusion dans la paraffine. Vu qu'elle est aussi non soluble dans l'alcool utilisé pour la déshydratation ; une double substitution doit être

réalisée. L'eau est remplacée par l'alcool (déshydratation) et l'alcool par le toluène (substitution).

Pour réaliser cette étape, un automate d'inclusion appelé histokinette est utilisé (figure 13).

Cet automate peut se charger de toutes les phases conduisant à la mise à disposition d'un bloc de paraffine prêt à être coupé au microtome.

L'inclusion ne se fera de façon satisfaisante que si la pièce à couper ne contient ni eau ni solvant intermédiaire (alcool).



**Figure 13** : Histokinette : Appareil d'inclusion dans la paraffine

L'étape de circulation consiste à faire introduire les pièces dans une série de liquides intermédiaires.

- Fixation dans 2 bains de Formol 10% (30 min x 2).
- Déshydratation par l'alcool: consiste à débarrasser le tissu de l'eau qu'il contient, tenant compte que l'agent déshydratant doit être miscible en même temps à l'eau et à la paraffine. La déshydratation se fait dans 5 bains d'Alcool de degré croissant 75%, 80%, 90%, 95%, et absolu (1h x 3, 1h30 et 2h).
- Eclaircissement par le toluène : cette étape est destinée à remplacer l'alcool par un solvant de la paraffine et à chasser l'alcool par trois bains successifs de toluène. En

remplaçant l'agent déshydratant, le toluène rend le tissu transparent d'où le nom d'éclaircissement. Cette opération se déroule dans 3 bains de Toluène (1h, 1h30 et 2h).

✓ Enrobage dans la paraffine : c'est l'étape terminale de la circulation, réalisée par passage du tissu dans la paraffine liquide. Deux bains de Paraffine (2h et 3h) sont utilisés.

### ✓ **Réalisation des coupes ou microtomie**

Après montage du bloc dans le porte-bloc du microtome destiné à produire de fines tranches (3-5 µm), la réalisation des rubans est effectuée à l'aide du microtome (Figure 14).



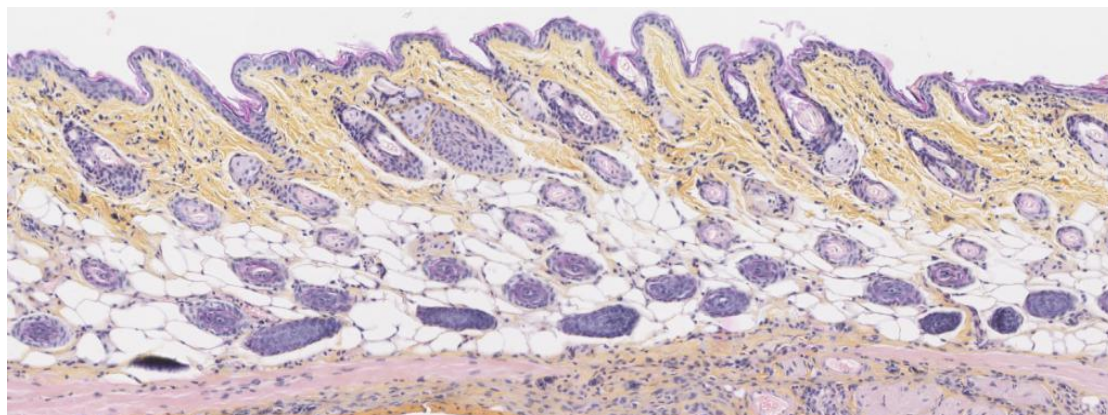
*Figure 14* : Coupe par microtome

Ces coupes sont immergées dans des bains d'alcool, puis étalées en les dépliant sur la lame par flottation à la surface d'un bain chaud.

## 2. Coloration

✓ La coloration HES : (Hématoxyline-Eosine Safran).

Cette coloration permet de visualiser la morphologie des cellules (noyau et cytoplasme) afin de déterminer leur répartition, architecture et structure. C'est la plus simple des colorations qui s'effectue avec 2 colorants : un colorant nucléaire basique hémateïne bleu et un colorant cytoplasmique acide type éosine, (rose orangé), elle a pour but aussi de permettre la mise en évidence des noyaux et du cytoplasme des cellules ainsi que des fibres de collagène. L'hématoxyline colore le noyau en violet, l'éosine colore le cytoplasme en rose, et le safran colore les fibres de collagène en jaune (figure 15). Les lames doivent être préparées, afin de pouvoir recevoir les colorants. La coloration est précédée de déparaffinage et d'hydratation.



**Figure 15:** Tissu coloré par HES (45)

✓ Déparaffinage :

Cette étape consiste à enlever la paraffine de la coupe tissulaire pour que les colorants (préparés en phase aqueuse), puissent pénétrer le tissu et le colorer.

Ce déparaffinage consiste à mettre des lames dans l'étuve à 60°C pendant une heure, et ensuite de les faire plonger dans le toluène.

✓ Hydratation :

Elle a pour objet de retirer le toluène du tissu et le remplacer par de l'eau. Le toluène et l'eau n'étant pas miscibles, le toluène est d'abord remplacé par l'alcool, puis les lames sont passées dans un bain d'eau courante, permettant de remplacer l'alcool par l'eau.

✓ Le montage

Cette opération consiste, une fois la coloration terminée, à fixer à l'aide d'un milieu de montage, une lamelle de verre sur la coupe tissulaire.

Le montage permet une protection mécanique des coupes, ainsi qu'une protection chimique des colorants.

La lame colorée est ensuite transmise au médecin anatomopathologiste de la plateforme pour identifier une zone contenant plus de 50% de cellules tumorales. La zone d'intérêt est cerclée avec un marqueur et séparée du reste de l'échantillon par macrodissection, afin de s'assurer d'une proportion de cellules tumorales supérieure à 50 % et de réduire ainsi la contamination par les cellules normales. S'il y a plus de 50% de cellules tumorales, le test est considéré comme fiable. Dans le cas contraire, les cellules saines peuvent interférer et il y a un risque de conclure à un résultat faux négatif.

### **Identification de la zone Tumorale par le pathologiste qualifié**

Les lames préparées sont ensuite étudiées par la FISH

### 3. Protocole expérimental de la FISH sur coupes tissulaires

#### a. Préparation des lames pour la FISH

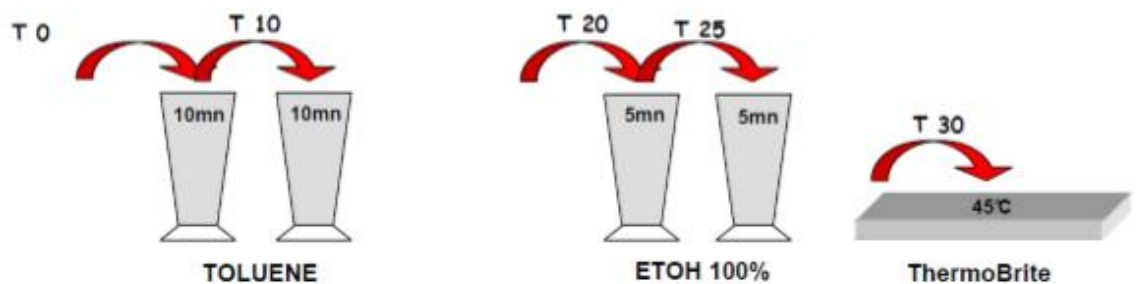
La veille de la technique, les lames à hybrider sont placées dans un incubateur à 56°C.

Avant de démarrer la technique, il faut penser à mettre au bain marie les solutions utilisées à chaud. Il ne faut pas démarrer les étapes tant que les solutions n'ont pas atteint la température requise.

#### b. Déparaffinage :

Les lames sont immergées dans du toluène absolu 10 min, et ensuite dans l'éthanol absolu pendant 5 min. Chacune des opérations est répétée 2 fois.

Les lames sont ensuite séchées sur le THERMOBRITE réglé à 45°C (3 à 5 mn) ou à température ambiante puis on délimite la zone tumorale (Figure 16).



**Figure 16 :** les différentes étapes de déparaffinage (46).

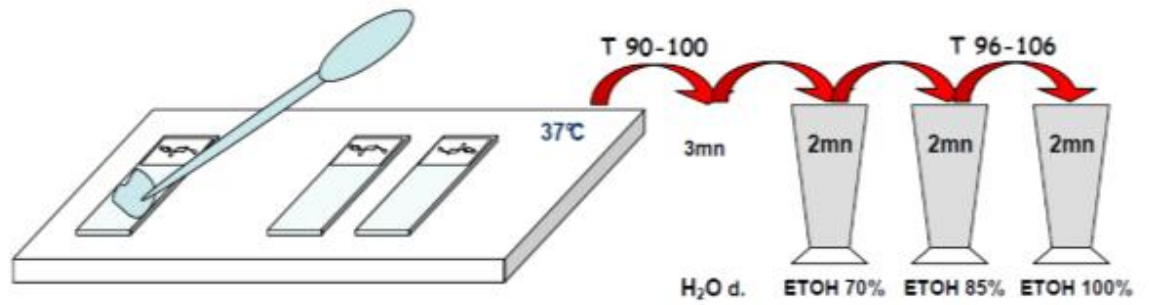
#### c. Prétraitement

Les lames sont immergées dans la solution 1xSSC à 90°C pendant 15 min et ensuite dans H<sub>2</sub>O distillée pendant 3 min.

#### d. Traitement à la pepsine :

Les lames sont placées sur le ThermoBrite à 37°C et la section est recouverte avec la pepsine diluée. L'incubation dure 30 mn. Les lames sont ensuite immergées dans H<sub>2</sub>O distillée pendant 3 min et ensuite déshydratées dans un gradient d'éthanol 70%, 85%, 100% 1min chacun. Les lames sont séchées avant de procéder à l'étape d'hybridation (Figure 17).





**Figure 17 :** Traitement à la Pepsine (47).

### e. Hybridation des échantillons

La sonde est portée du congélateur à la température ambiante. Elle est ensuite centrifugée, vortexée et centrifugée à nouveau. 10 µL de sonde sont déposées sur une lamelle. La lame échantillon est retournée sur la lamelle et ensuite scellée à l'aide de rubber cement (Figure 18).



**Figure 18** Montage des lames

Les lames sont placées dans le ThermoBrite, incubées à 37°C pendant environ 5mn avant de lancer le programme de dénaturation/hybridation.

Température de dénaturation 73°C / temps de dénaturation 5mn.

Température d'hybridation 37°C / temps d'hybridation 20 h.

### f. Lavages Post- Hybridation

**Remarque:** A partir de cette étape il faut travailler en lumière réduite de manière à préserver les fluorochromes des sondes présentes sur les lames

A la fin de l'hybridation, après avoir sorti les lames du ThermoBrite, le rubber cement est retiré SANS RETIRER LA LAMELLE. Les lames sont placées dans la solution de lavage 2XSSC/0,3% NP40 à température ambiante. Il faut compter 30s à 1min le temps

de traiter la totalité des lames. (Pour plus de facilité on peut placer deux lames dos à dos). Les lamelles sont ensuite délicatement retirées et les lames sont transférées dans la solution 2XSSC/0,3% NP40 à 72°C. Il faut agiter rapidement et lancer le chronomètre réglé à 2mn. Les lames sont retirées de la solution à 72°C et un rinçage rapide est effectué dans la solution à température ambiante. Les lames sont séchées à l'obscurité.

**g. Contre-Coloration des noyaux au DAPI :**

10 à 20 µL de DAPI sont déposés sur une lamelle couvre-objet (le volume dépend de la taille de la lamelle). La lame échantillon est ensuite retournée sur la lamelle (même technique que pour la sonde d'hybridation). Les lames doivent être placées à 4°C pendant au moins 5mn avant de procéder à la lecture sous microscope.

**h. Lecture et interprétation:**

La lecture se fait au microscope à fluorescence muni de filtres adaptés aux fluorochromes de sondes utilisées.

## IV. Résultats et Discussion

Les résultats de FISH sont exprimés par un ratio entre le nombre de signaux HER2 (rouges) par rapport au nombre de signaux centromériques (verts). Le comptage est réalisé sur 20 noyaux. La définition de la positivité de la FISH est un rapport HER2/CEP17 supérieur ou égal à 2,2. Lorsque ce rapport est compris entre 1,8 et 2,2 (tableau 1) il est suggéré de compter plus de noyaux (au moins 20 de plus) dans d'autres zones tumorales (48).

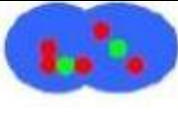
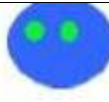
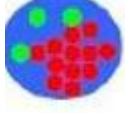
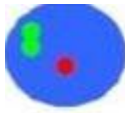
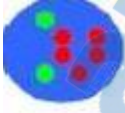
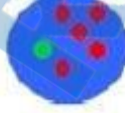
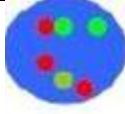
**Tableau 1** : Modalités de comptage des signaux pour l'évaluation du statut du gène HER2, selon les recommandations ASCO/CAP

Signaux HER2 / CEP 17	Statut HER2
< 1,8	Non amplifié
1,8 – 2,2	Ambigu
>2,2	Amplifié

Pour l'interprétation, il est important de repérer les zones invasives et de réaliser les comptes de signaux à ce niveau. Comme les tumeurs gastriques peuvent être très hétérogènes, il convient de balayer toute la coupe à la recherche des zones amplifiées.

Avant de procéder au comptage des signaux, il est fortement recommandé de suivre ce guide de comptage afin d'assurer la fiabilité des résultats obtenus

**Tableau 2:** Guide de comptage des signaux.

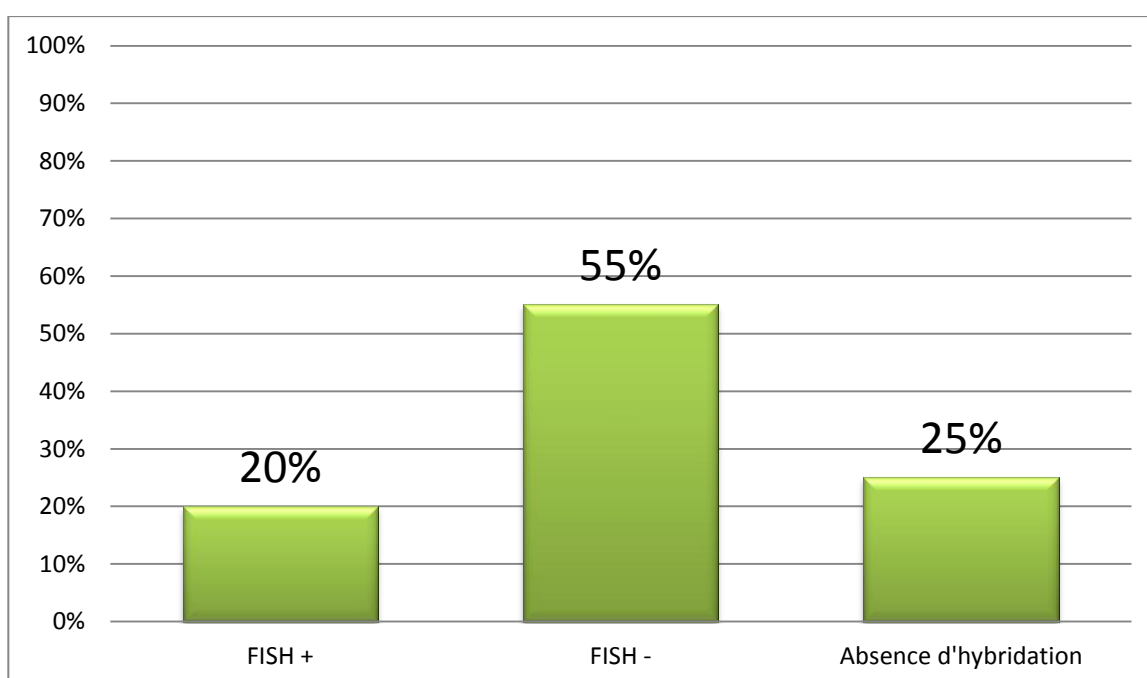
Différents cas	Interprétation
	Ne pas compter. Les noyaux se chevauchent, toutes les zones des noyaux ne sont pas visibles
	Deux signaux verts, ne pas évaluer les noyaux avec des signaux d'une seule couleur
	Compter comme 3 signaux verts et 12 signaux rouges
	Compter comme 1 signal vert et 1 signal rouge. Deux signaux de la même dimension et séparés d'une distance égale ou inférieure à leur diamètre comptent pour un seul signal.
	Compter comme 2 signaux verts et 3 signaux rouges. Deux signaux de la même dimension et séparés d'une distance égale ou inférieure à leur diamètre comptent pour un seul signal.
	Compter comme 1 signal vert et 5 signaux rouges
	Compter comme 3 signaux verts (1 vert flou) et 3 signaux rouges

✓ **Cancer gastrique**

○ **Résultats :**

L'étude a porté sur 20 patients présentant un cancer gastrique.

Selon les critères du système de score proposé par Hofmann, 4 cas (20%) sont classés comme FISH+ (présence d'une amplification) ; 11 cas (55%) sont classés comme FISH- (absence d'amplification) et 5 cas (25%) présentent des problèmes de fixation (absence d'hybridation).



**Figure 20 :** Résultats (cancer gastrique)

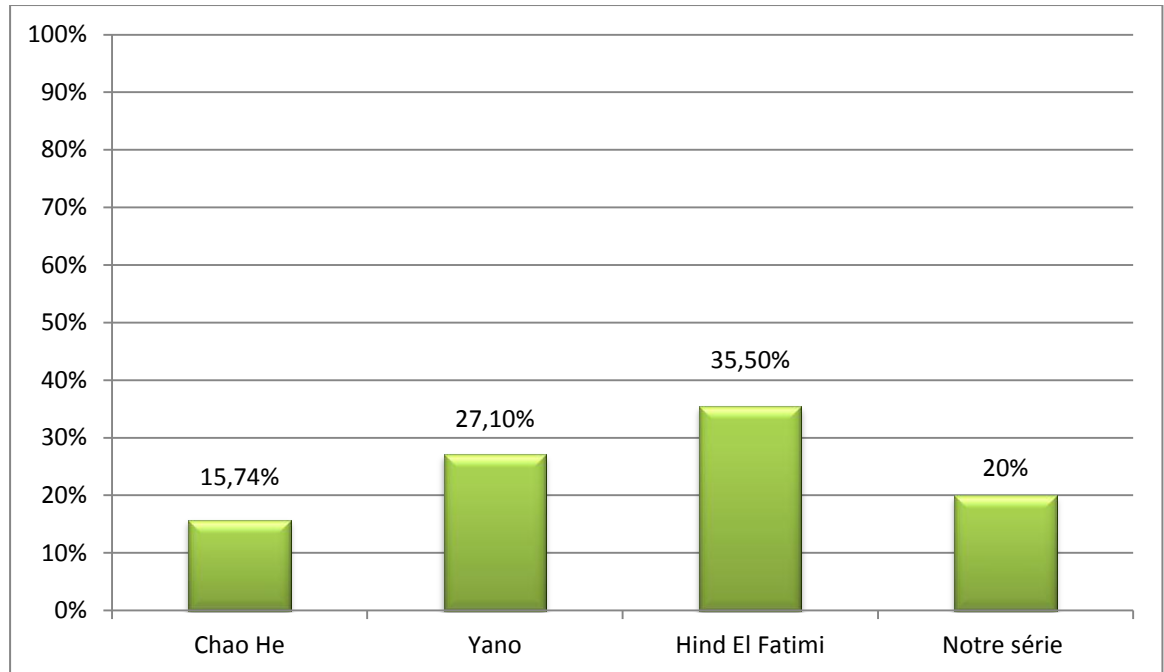
○ **Discussion :**

Le taux d'amplification du gène HER2 dans notre étude (20%) est supérieur de celui noté par Chao He et ses collaborateurs (15.74%) (49); mais il est inférieur à celui décrit par Hind El Fatemi (35.5%) (50) et Yano et ses collaborateurs (27.1%) (51).

**Tableau 3:** Comparaison du taux d'amplification du gène HER2 (cancer gastrique).

Auteurs	Nombres de cas	Taux d'amplification du gène HER2
Chao He	197	15.74%

Yano	1254	27.1%
Hind El Fatemi	31	35.5%
Notre série	20	20%



**Figure 21** : Comparaison du taux d'amplification du gène HER2 (cancer gastrique).

La variabilité de ces résultats peut être liée à des variations techniques dépendant de la manipulation et du traitement de tissu (fixation, épaisseur des coupes, prétraitements,...) et à des difficultés d'interprétation (difficulté de repérage de zones invasives, superpositions nucléaires fréquentes dans les adénocarcinomes bien différenciés, difficultés d'interprétation des polysomies).

Cinq lames (25%) n'ont pas donné une hybridation. Ce résultat peut être dû à une altération des gènes suite à une mauvaise fixation. Ce pourcentage non négligeable montre que la nécessité de conditions expérimentales optimales est un pré-requis indispensable à l'obtention des résultats fiables.

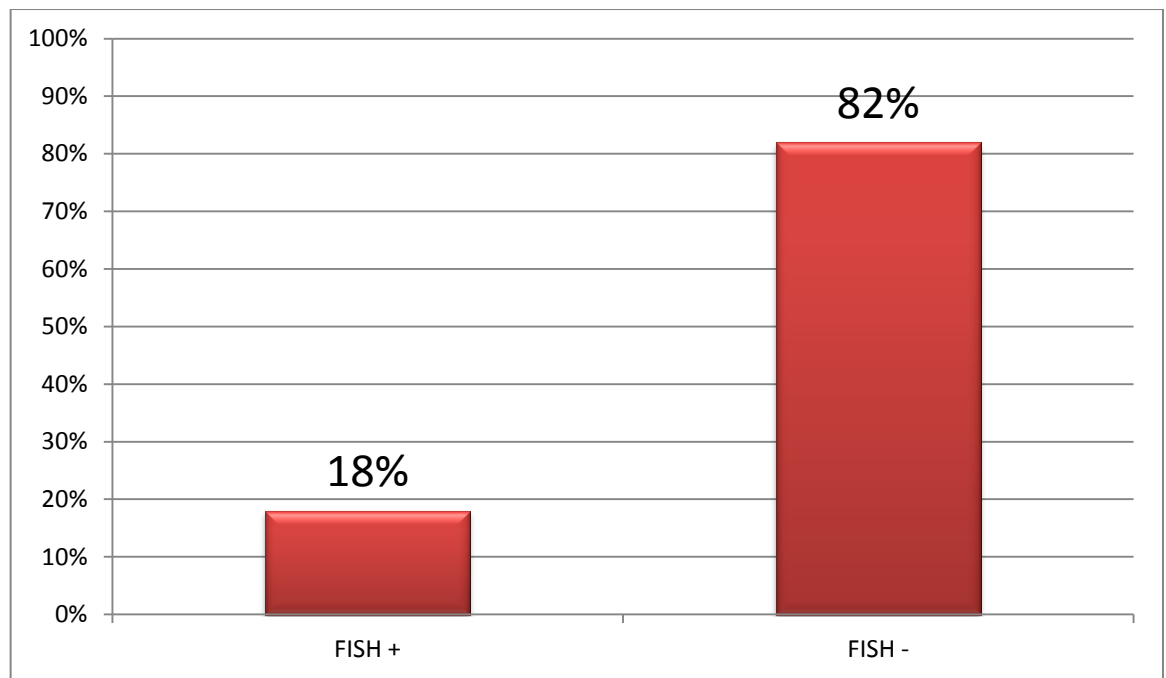
D'après les résultats de cette étude, on peut dire que la technique FISH est réservée à des centres spécialisés, car l'analyse des signaux nucléaires d'une hybridation est longue et minutieuse et demande une expertise. Concernant les manipulations, il est recommandé de suivre les procédés de détection du marqueur HER2.

✓ Cancer du sein :

○ Résultats :

L'étude a porté sur 200 patientes présentant un cancer du sein.

Dans notre série, et avec les nouvelles recommandations 36 cas (18%) sont classés comme FISH+ (présence d'une amplification) et 164 cas (82%) sont classés comme FISH- (absence d'amplification).



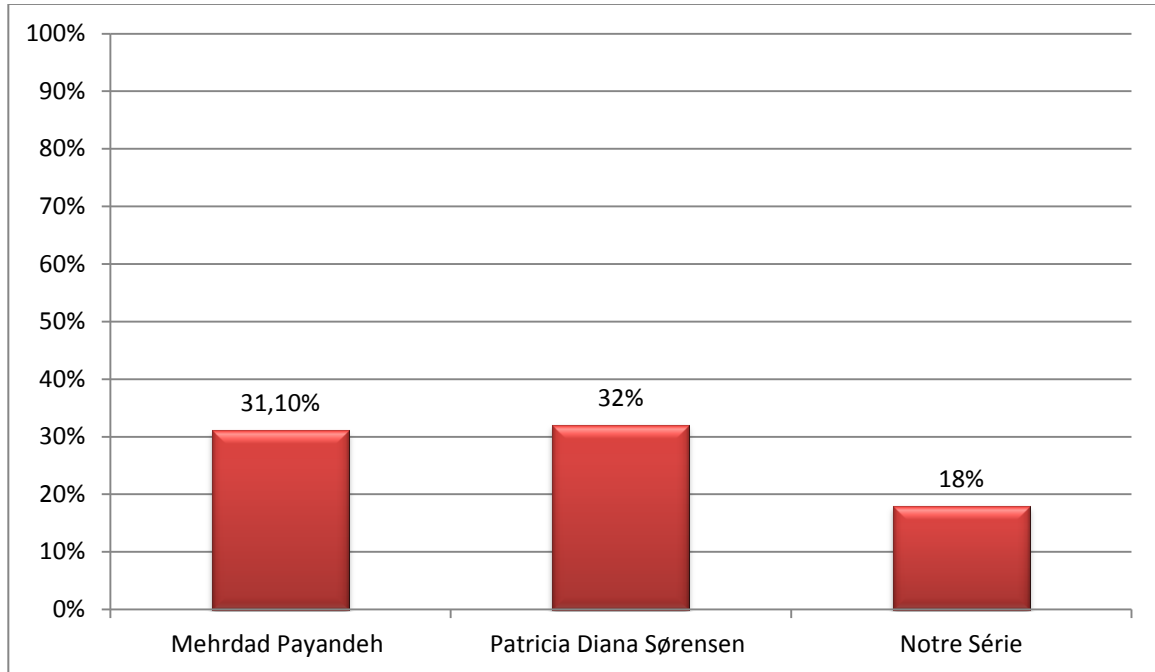
**Figure 22** : Résultats (cancer du sein)

○ Discussion :

Le taux d'amplification du gène HER2 dans notre étude (18%) est fortement inférieure à ceux de la littérature : Mehrdad Payandeh (31.1%) (52), Patricia Diana Sørensen (32%) (53).

**Tableau 4**: Comparaison du taux d'amplification du gène HER2 (cancer du sein).

Auteurs	Nombres de cas	Taux d'amplification du gène HER2
Mehrdad Payandeh	133	31.1%
Patricia Diana Sørensen	643	32%
Notre série	200	18%



**Figure 23:** Comparaison du taux d'amplification du gène HER2 (cancer du sein).

✓ Intérêt :

La tumeur surexprimant le récepteur HER2 est éligible au traitement par le trastuzumab.

Le trastuzumab se lie avec une grande affinité et spécificité au sous-domaine IV, une région juxtamembranaire du domaine extracellulaire de HER2. La liaison du trastuzumab à HER2 inhibe l'activation des voies de signalisation HER2 indépendamment d'un ligand.

Cette liaison empêche le clivage protéolytique de son domaine extracellulaire, un mécanisme d'activation de HER2. De plus, le trastuzumab est un puissant médiateur de la cytotoxicité cellulaire anticorps-dépendante (ADCC).

Le trastuzumab peut aussi agir par réduction du nombre de récepteurs disponibles par activation de l'endocytose ou la diminution des facteurs angiogéniques.

## V. Conclusion

La cytogénétique moléculaire sous ses différents aspects techniques est actuellement un outil puissant en diagnostic chromosomique en étant toujours complémentaire à la cytogénétique conventionnelle. Avec l'avènement des avancées techniques, elle devrait permettre de découvrir de nombreuses nouvelles anomalies chromosomiques récurrentes et par conséquent d'ouvrir la voie à la découverte de nouveaux gènes aussi bien en cytogénétique tumorale qu'en cytogénétique constitutionnelle (54). La FISH est une technique qui s'est rapidement imposée car elle permet de s'affranchir de la culture cellulaire. En effet, les signaux d'hybridation générés par les sondes sont visibles sur les noyaux. Un plus grand nombre de cellules peuvent être ainsi étudiées. Ses applications concernent la détection d'anomalies chromosomiques associées à des pathologies constitutionnelles ou acquises. Parmi les principales applications, on peut citer le diagnostic des anomalies chromosomiques associées aux cancers. (55).

Cette étude a permis d'aboutir les résultats suivants : Concernant le cancer gastrique, 4 cas (20%) sont classés comme FISH+ ; 11 cas (55%) sont classés comme FISH- et 5 cas (25%) présentent des problèmes de fixation. Alors que pour le cancer du sein, 36 cas (18%) sont classés comme FISH+ et 164 cas (82%) sont classés comme FISH-.

Ces résultats montrent que la technique de la FISH permet de réaliser avec une grande fiabilité le diagnostic des cancers gastrique et du sein, ce qui permet de proposer des traitements ciblés. En effet, les cellules qui expriment le récepteur HER2 peuvent être traitées par le trastuzumab.



## VI. Références

(1) Muleris M, Richard F, Apiou F, Dutrillaux B. Hybridation in situ en cytogénétique moléculaire : principes et techniques. Collection Génie génétique G2. Paris: Tec et Doc Lavoisier et Cachan Éditions médicales, 1996

(2) Tai W., Mahato R., Cheng K., 2010. The role of HER2 in cancer therapy and targeted drug delivery. J control Release 146:264-275 [PMID:20385184 DOI: 10.1016/j.jconrel.2010.04.009

(3) Michael madigan et john martinko : 11<sup>ém</sup> édition , publié par pearson education France 17 bis , rue des vinaigriers 75 010 Paris. Mise en page : compo mica s.a.rl , 1047pages 2007 pearson Education France

(4) Muleris M, Richard F, Apiou F, Dutrillaux B. Hybridation in situ en cytogénétique moléculaire : principes et techniques. Collection Génie génétique G2. Paris: Tec et Doc Lavoisier et Cachan Éditions médicales, 1996.

(5) jean paul evaluation de deux gènes : HER2 et KRAS dans le cancer de l'estomac (mémoire de fin d'étude)

(6) Serge Romana, Valérie Malan , Service d'Histo-Embryo-Cytogénétique, Hôpital Necker Enfants Malades, Paris 2010-2011

(7) Michael madigan et john martinko : 11<sup>ém</sup> édition , publié par pearson education France 17 bis , rue des vinaigriers 75 010 Paris. Mise en page : compo mica s.a.rl , 1047 pages 2007 pearson Education France

(8) jean paul evaluation de deux gènes : HER2 et KRAS dans le cancer de l'estomac (mémoire de fin d'étude)

(9) Lemieux N, Dutrillaux B, Viegas-Pequignot E. A simple method for simultaneous R or G-banding and fluorescence in situ hybridization of small single-copy genes. Cytogenet Cell Genet 1992

(10) Romana SP, Le Coniat M, Berger R. : t(12;21): a new recurrent translocation in acute lymphoblastic leukemia. Genes Chromosomes Cancer. 1994 Mar;9(3):186-91.

(11) Nouha Bouayed Abdelmoula, Marie-France Portnoï, François Vialard, Ahlem Amouri, Jacqueline Van den Akker, Jean-Louis Taillemite

- (12) : <http://www.chups.jussieu.fr/polys/biochimie/BGbioch/POLY.Chp.9.13.html>
- (13) : [http://www.edu.upmc.fr/sdv/masselot\\_05001/genes\\_et\\_genomes/clones.html](http://www.edu.upmc.fr/sdv/masselot_05001/genes_et_genomes/clones.html)
- (14) Richard F, Vogt N, Muleris M, et al. Increased FISH efficiency using APC probes generated by direct incorporation of labeled nucleotides by PCR. *Cytogenet Cell Genet* 1994 ; 65 : 169-71.
- (15) Vincent Ecochard Didier Fournier Laurence Nieto Laurent Paquereau 24-10- 2011 - m2p-egpr.ups-tlse.f
- (16) Vincent Ecochard Didier Fournier Laurence Nieto Laurent Paquereau 24-10- 2011 - m2p-egpr.ups-tlse.f
- (17) : <http://acces.ens-lyon.fr/biotic/biomol/techgen/html/marq4.htm>
- (18) : S. Romana, V. Malan « Cytogénétique moléculaire » ; Collège National des Enseignants et Praticiens de Génétique Médicale
- (19) Serge Romana, Valérie Malan Service d'Histo-Embryo-Cytogénétique, Hôpital Necker Enfants Malades, Paris 2010-2011
- (20) Nouha Bouayed Abdelmoula, Marie-France Portnoï, François Vialard, Ahlem Amouri, Jacqueline Van den Akker, Jean-Louis Taillemite 2000
- (21) couturier J vincent salomon , A Mathieu , Valent, bermheim A. Diagnosis of HER-2 gene amplification in breast carcinoma .*Pathol Biol ( paris )* 2008
- (22) Nancy E., Hynes N., Heidi A., Lane, 2005. ERBB Receptors and Cancer: The Complexity of targeted Inhibitors. *Nat Rev Cancer*. 5(5):341-354.
- (23) Sergina NV, Moasser MM. The HER family and cancer: emerging molecular mechanisms and therapeutic targets. *Trends Mol Med*. 2007 Dec;13(12):527-34
- (24) :<http://www.genemed.com/products/Fluorescent-In-Situ-Hybridization-Probes/HER2-Red-and-Chromosome-17-Centromere-Green-FISH-Probe-Cocktail>
- (25) : Appert-Collin A, Hubert P, Crémel G, Bennisroune A. Role of ErbB Receptors in Cancer Cell Migration and Invasion. *Front Pharmacol*. 2015 Nov 24;6:283. doi: 10.3389/fphar.2015.00283. eCollection 2015. Review. PubMed PMID: 26635612; PubMed Central PMCID: PMC4657385.

(26) Sergina NV, Moasser MM. The HER family and cancer: emerging molecular mechanisms and therapeutic targets. *Trends Mol Med.* 2007 Dec;13(12):527-34

(27) Sergina NV, Moasser MM. The HER family and cancer: emerging molecular mechanisms and therapeutic targets. *Trends Mol Med.* 2007 Dec;13(12):527-34

(28) Dr Verbeke Natacha, Oncologue médical Mlle Bilge Burçin, ICO : « Les Effets Secondaires des Thérapies Ciblées. »

(29) Garrett T. P., McKern N.M., Lou M., Elleman T.C., Adams T.E., Lovrecz G.O., Kofler M., Jorissen R.N., Nice E.C., Burgess A.W. et al., 2003. The crystal structure of a truncated ErbB2 ectodomain reveals an active conformation, poised to interact with other ErbB receptors. *Mol. Cell.*, 11, 495-505.

(30) Bulgess A.W., Cho H.S., Elginbrot C., Ferguson K.M., Carett J., Leahy D.J. An open and shut case. Recent insights into the activation on of EGF/ERBB receptors. *Mol Cell.*, 12: 541-52. ., 2003

(31) Graus-Porta D., Beerli RR. Et Hynes NE., Single-chain antibody-mediated intracellular retention of ErbB-2 impairs Neu differentiation factor and epidermal growth factor signaling. *Molecular and Cellular Biology*, 15 1182–1191. 1995 .

(32) Pines G., Kostler WJ. et Yarden Y . Oncogenic mutant forms of EGFR: lessons in signal transduction and targets for cancer therapy. *FEBS Lett.*, 584: 2699-2706 ., 2010.

(33) Marc Giovannini Chef du département d'explorations médico-chirurgicales oncologiques. Institut Paoli-Calmettes, 232 Bd St-Marguerite, F-13273 Marseille cedex 9 [giovanninim@ipc.unicancer.fr](mailto:giovanninim@ipc.unicancer.fr) N° 4 - 2012 -2013

(34) Chbani L., Hafid I., Berraho M., Mesbahi O., Nejari C. et Amarti A., Aspects épidémiologiques et anatomopathologiques des cancers dans la région de Fès-Boulemane (Maroc). *Eastern Mediterranean Health Journal* , EMHJ., Vol. 19 No. ., 2013

(35) Penault-Llorca F., Bilous M., Dowsett M., Hanna W., Osamura RY., Ruschoff J., et al., Emerging technologies for assessing HER2 amplification. *Am J Clin Pathol.*, 132:539-48 2009.

(36) Moelans et al., HER2/neu testing and therapy in gastroesophageal adenocarcinoma. *Path Res Int* vol., p10 2011

(37) Albarello L., Pecciarini L., Doglioni C., 2011. HER2 testing in gastric cancer. *Adv Anat Pathol.*, 18:53-59

(38) Thésaurus national de cancérologie digestive. <http://www.tncd.org/>

(39) Frédérique Penault –Llorca , Marie-Pierre Chenard Olivier Bouché , Jean François emile , Frédéric Bibeau , Jean –Philippe Metges , Thierry André , Geneviève Monges  
Recommandations for clinical practice in 2011

(40) Slamon D, Clarck G, Wong S. Human breast cancer: Correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. Science 1987;235:177-81

(41) Ross Js , Slodkowska EA , Symmans WF et al . The HER2 receptor and breast cancer : ten years of targeted anti-HER2 therapy and personalized medicine. Oncologist 2009

(42) Anne Vincent-Salomon Correspondances en Onco-Théranostic - Vol. I - n° 2 - avril-mai-juin 2012

(43) Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. J Clin Oncol ;25:118-45 2007

(44) : Kathryn R. Perkinson, BS, HTL(ASCP) : « HER2 Testing in Breast Cancer »

(45):<http://www.histalim.com/wp-content/uploads/2015/09/Mouse-Skin-HES-staining-1024x341.png>

(46) : sara louati : « Etude sur les gliomes » mémoire de fin d'étude.

(47) : sara louati : « Etude sur les gliomes » mémoire de fin d'étude

(48) Hofmann M., Stoss O., Shi D., Buttner R., et al. Assessment of a HER2 scoring system for gastric cancer: results from a validation study. Histopathology, 52:797-805. ., 2008

(49) Chao H., Xue-Yi B., et al. Correlation of human epidermal growth factor receptor 2 expression with clinicopathological characteristics and prognosis in gastric cancer. World journal of gastroenterology,19(14):2171-2178 .; 2013

(50) El Fatemi H, Hammas N, Idrissi K, Mellas N, Bennani A, Amarti A, Cayre A, Penault-llorca F, Mesbahi O. [The search for protein overexpression and HER2 gene amplification in gastric cancer by immunohistochemistry and in situ hybridization: experience of the CHU Hassan II of Fez]. Pan Afr Med J. 2012;13:79. Epub 2012 Dec 17. French. PubMed PMID: 23397021; PubMed Central PMCID: PMC3567406.

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

(52) Payandeh M, Sadeghi M, Sadeghi E, Janbakhsh A. Is There any Concordance between of IHC with FISH in HER2-Positive Breast Cancer Patients? *Int J Hematol Oncol Stem Cell Res.* 2017 Jan 1;11(1):43-48. PubMed PMID: 28286614; PubMed Central PMCID: PMC5338281.

(53) Patricia Diana Sørensen<sup>1,\*</sup>, Erik Hugger Jakobsen<sup>2</sup>, Sven Tyge Langkjer<sup>2</sup>, Susanne Bokmand<sup>3</sup>, Birthe Østergaard<sup>4</sup>, Dorte Aalund Olsen<sup>1</sup>, Jonna Skov Madsen<sup>1</sup> and Ivan Brandslund<sup>1</sup> *Clin Chem Lab Med*;471117–1123 2009 by Walter de Gruyter • Berlin • New York. DOI 10.1515/CCLM 107 Article in press - uncorrected proof .2009.241 2009

(54) Nouha Bouayed Abdelmoula, Marie-France Portnoï, François Vialard, Ahlem Amouri, Jacqueline Van den Akker, Jean-Louis Taillemite 2000 .

(55) Serge Romana, Valérie Malan Service d'Histo-Embryo-Cytogénétique, Hôpital Necker Enfants Malades, Paris 2010 – 2011 .

