

**INFORM HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail**
**REF**

800-4422

05899826001

**Table des matières**

<b>APPLICATION .....</b>	<b>2</b>
<b>RÉSUMÉ ET EXPLICATION .....</b>	<b>2</b>
<b>PRINCIPE DE LA PROCÉDURE.....</b>	<b>2</b>
<b>MATÉRIEL .....</b>	<b>3</b>
Réactifs fournis.....	3
Reconstitution, mélange, dilution, titrage .....	3
Matériel et réactifs nécessaires mais non fournis .....	3
Conservation et manipulation .....	3
Collecte et préparation des échantillons pour l'analyse .....	3
<b>AVERTISSEMENTS ET PRÉCAUTIONS.....</b>	<b>4</b>
<b>INSTRUCTIONS D'UTILISATION .....</b>	<b>4</b>
Procédure étape par étape.....	4
Lancement d'un cycle sur les automates de coloration BenchMark Series .....	4
Procédure de déshydratation .....	4
Procédures de contrôle qualité.....	5
Échantillons de contrôle.....	5
Réactif de contrôle positif.....	5
Différences inexplicables.....	5
Test de vérification .....	5
Interprétation des résultats.....	5
Définitions .....	5
Observations supplémentaires concernant HER2 et le chromosome 17 .....	5
Visualisation des signaux et adéquation des lames .....	5
Comptage des signaux SISH et Red ISH pour déterminer le statut du gène HER2 .....	6
Critères de sélection des cellules .....	6
Statut du gène HER2 : algorithme d'évaluation pour le cocktail de sondes HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail .....	8
Contrôles .....	9
<b>LIMITATIONS.....</b>	<b>9</b>
Limitations générales.....	9
Limitations spécifiques .....	9
<b>CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCE .....</b>	<b>9</b>
<b>RÉSOLUTION DES PROBLÈMES.....</b>	<b>10</b>
<b>RÉFÉRENCES .....</b>	<b>12</b>
<b>PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE .....</b>	<b>12</b>
<b>CONTACTS.....</b>	<b>12</b>
<b>Annexe A : feuille d'évaluation de l'interprétation des résultats .....</b>	<b>13</b>

## INFORM HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail

**REF** 800-4422

05899826001

### APPLICATION

Le cocktail de sondes INFORM HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail est conçu pour détecter de manière quantitative, par microscopie optique, l'amplification du gène HER2 via une technique d'hybridation *in situ* (ISH) chromogénique double couleur dans des échantillons de tissus fixés au formol et inclus en paraffine, issus de cancers humains du sein et de l'estomac, y compris de la jonction gastro-œsophagienne, après coloration sur les automates de coloration Ventana.

L'utilisation du cocktail de sondes INFORM HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail est indiquée pour aider à évaluer les patients pour lesquels un traitement par Herceptin (trastuzumab) est envisagé. Ce produit doit être interprété par un lecteur qualifié, en conjonction avec un examen histologique, les informations cliniques pertinentes et des contrôles appropriés.

Ce réactif est conçu pour être utilisé en diagnostic *in vitro* (DIV).

### RÉSUMÉ ET EXPLICATION

HER2/neu (HER2) fait partie d'une famille de quatre récepteurs transmembranaires à activité tyrosine kinase servant de médiateurs de la croissance, de la différenciation et de la survie des cellules.<sup>1,2</sup> Le gène HER2 code pour la protéine HER2<sup>2,3</sup>; une surexpression de la protéine HER2, une amplification du gène HER2, ou bien les deux, se retrouvent dans environ 15 à 25 pour cent des cancers du sein et sont associées au comportement agressif de la tumeur.<sup>4,5</sup> Le cocktail de sondes INFORM HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail contient une sonde spécifique au gène HER2 (marquée avec l'haptène dinitrophényl ou DNP) et une sonde spécifique au chromosome 17 (marquée avec l'haptène digoxigénine ou DIG), et est formulé avec de l'ADN placentaire humain bloquant dans un tampon à base de formamide. Les sondes sont conçues pour détecter l'amplification du gène HER2 dans les carcinomes du sein et de l'estomac. La sonde ADN spécifique à HER2 couvre environ 200 000 paires de bases sur la région génomique contenant le gène HER2 (également connu sous les noms de ERBB2 et NEU), situé sur le chromosome 17 humain (17q11.2-q2) (1). La sonde spécifique au chromosome 17 couvre les séquences alpha-satellites se trouvant dans la région centromérique et sert de référence pour l'aneusomie. Le nombre de copies de chacune des deux sondes est compté dans les noyaux des cellules tumorales et les résultats sont rapportés sous la forme d'un rapport HER2/Chromosome 17 afin de déterminer le statut de l'amplification de HER2 (le rapport HER2/Chr17  $\geq 2,0$  est amplifié, alors qu'un rapport  $< 2,0$  est non amplifié).

De nombreuses études cliniques ont mis en évidence qu'une amplification et/ou une surexpression de HER2 étaient associées à un mauvais résultat clinique chez les femmes atteintes d'un cancer du sein invasif, et étaient en corrélation avec plusieurs variables de pronostic négatives, notamment un statut négatif des récepteurs des œstrogènes (RE), une fraction de cellules en phase S élevée, un statut ganglionnaire positif, une mutation de p53 et un grade nucléaire élevé.<sup>6,7</sup> Dans plusieurs études, des patientes atteintes d'un cancer du sein invasif (à la fois à ganglions positifs et à ganglions négatifs), avec un statut du gène HER2 amplifié, présentaient une diminution de la survie globale et une augmentation de la fréquence de récurrence.<sup>1,8,9,10,11</sup> Les résultats d'études cliniques mesurant la surexpression de la protéine HER2 par immunohistochimie étaient similaires à ceux obtenus par amplification du gène HER2.<sup>9,11,12,13</sup> La connaissance du statut du gène et/ou de la protéine HER2 chez les patientes atteintes d'un cancer du sein invasif permet aux cliniciens de prendre des décisions plus éclairées afin d'améliorer l'ensemble de la prise en charge thérapeutique de ces patientes.

Le trastuzumab (Herceptin) est un anticorps monoclonal humanisé dirigé contre le domaine extracellulaire de HER2 et on a montré qu'il a un effet bénéfique chez les patientes atteintes d'un cancer du sein HER2 positif.<sup>14-19</sup> La mise en évidence d'une amplification du gène et/ou d'une surexpression de la protéine HER2 est essentielle à la sélection des patientes pouvant recevoir un traitement par trastuzumab. Des études cliniques ont montré que les patientes atteintes d'un cancer du sein présentant une surexpression élevée de la protéine et/ou une amplification du gène HER2 tiraient un bénéfice supérieur du traitement par trastuzumab.<sup>20</sup> La mise en évidence d'une amplification du gène et/ou d'une surexpression de la protéine HER2 est nécessaire chez les patientes atteintes d'un cancer du sein invasif pour lesquelles un traitement par trastuzumab est envisagé et indiqué d'un point de vue clinique. Un certain pourcentage de patients atteints d'un cancer de l'estomac présentent une amplification du gène HER2 et

pourraient bénéficier d'un traitement par Herceptin.<sup>27</sup> Le protocole de coloration, les directives de résolution des problèmes et l'algorithme d'évaluation du test INFORM HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail recommandés s'appliquent à la fois aux échantillons de carcinomes mammaires et gastriques.

### PRINCIPE DE LA PROCÉDURE

Le cocktail de sondes INFORM HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail a été formulé de manière optimale pour être utilisé avec les kits de détection *ultraView* SISH DNP Detection Kit et *ultraView* Red ISH DIG Detection Kit de Ventana et les réactifs accessoires sur les automates de coloration Ventana. Au cours de la procédure de coloration par hybridation *in situ* double couleur (Dual ISH), les sondes marquées au dinitrophényl (DNP) et à la digoxigénine (DIG) sont co-hybridées sur leurs séquences ADN cibles spécifiques respectives, à l'intérieur des noyaux cellulaires. La détection de la sonde spécifique à HER2 marquée au DNP a lieu en premier à l'aide du kit de détection *ultraView* SISH DNP Detection Kit, qui contient les distributeurs suivants : un anticorps monoclonal de lapin anti-DNP, une solution multimérique contenant un anticorps secondaire de chèvre anti-lapin conjugué à de la peroxydase de raifort (HRP), un chromogène A argentique ISH DNP (Silver A), un chromogène B argentique ISH DNP (Silver B) et un chromogène C argentique ISH DNP (Silver C). La réaction SISH a lieu après l'incubation avec l'anticorps primaire de lapin anti-DNP, puis avec l'anticorps secondaire de chèvre anti-lapin conjugué à la HRP. Brevement, cette réaction repose sur l'ajout séquentiel du réactif Silver A (acétate d'argent), du réactif Silver B (hydroquinone) et du réactif Silver C (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Ici, les ions argent (Ag<sup>+</sup>) sont réduits par l'hydroquinone en atomes d'argent métallique (Ag<sup>0</sup>). Cette réaction est alimentée par le substrat de l'HRP, le peroxyde d'hydrogène (Silver C). Le précipité d'argent se dépose dans les noyaux et une copie unique du gène HER2 est visualisée sous la forme d'un signal noir. La figure 1 illustre la réaction SISH.

Après la détection de HER2 par SISH, la sonde spécifique au chromosome 17 marquée à la digoxigénine (DIG) est détectée à l'aide du kit de détection *ultraView* Red ISH DIG Detection Kit. Ce kit comprend les distributeurs suivants : un anticorps monoclonal de souris anti-DIG, une solution multimérique Red ISH contenant un anticorps de chèvre anti-IgG de souris conjugué à de la phosphatase alcaline (PAL), un amplificateur de pH, du naphтол et le réactif Fast Red. Après le développement du signal SISH, la lame est incubée avec l'anticorps de souris anti-DIG, qui se lie à l'haptène DIG sur la sonde spécifique au chromosome 17. L'anticorps primaire anti-haptène est détecté à l'aide de la solution multimérique (anticorps de chèvre anti-IgG de souris conjugué à l'enzyme PAL). La lame est incubée avec la solution d'amplificateur de pH qui fournit les composants/concentrations en sels appropriés ainsi que le pH tamponné approprié pour une performance optimale de l'enzyme PAL. Ensuite, le phosphate de naphтол est appliqué, servant de substrat à l'enzyme PAL (la PAL déphosphoryle le naphтол). Le réactif Fast Red, ajouté à la lame, se combine ensuite avec le naphтол déphosphorylé pour former un précipité rouge, aisément visualisé par microscopie optique. La figure 2 illustre la réaction Red ISH. L'échantillon subit ensuite une contre-coloration avec le réactif Hematoxylin II avant l'interprétation par microscopie optique.

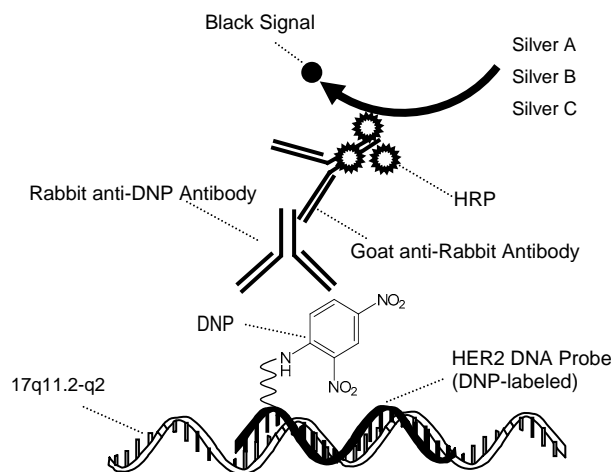


Figure 1. Réaction SISH pour la détection de HER2

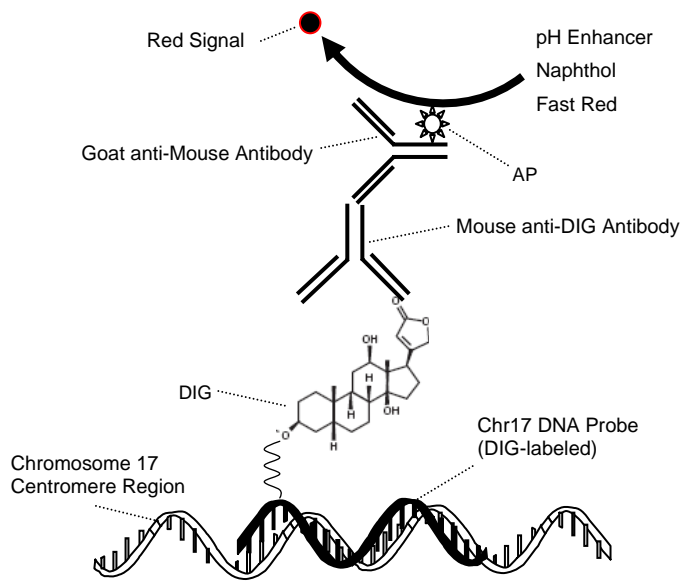


Figure 2. Réaction Red ISH pour la détection du chromosome 17

Chaque étape du protocole de coloration automatisé comprend une incubation de la lame avec le réactif spécifique requis, d'une durée précise, à une température spécifique. À la fin de chaque étape d'incubation, les coupes sont rincées par l'automate de coloration Ventana afin d'arrêter la réaction et d'éliminer le matériau non lié. Afin de limiter au maximum l'évaporation des réactifs aqueux de la lame, une solution de protection est appliquée à chaque étape par l'automate de coloration. Pour de plus amples informations sur le fonctionnement de l'appareil, consulter le manuel de l'opérateur de l'automate de coloration Ventana approprié.

## MATÉRIEL

### Réactifs fournis

Le distributeur du cocktail de sondes INFORM HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail contient suffisamment de réactif pour 50 tests.

1 distributeur de 10 mL de cocktail de sondes INFORM HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail contient environ 12 µg/mL de sonde spécifique à HER2 marquée au dinitrophényl (DNP) et 1 µg/mL de sonde spécifique au chromosome 17 marquée à la digoxigénine (DIG), avec de l'ADN placentaire humain bloquant, dans un tampon d'hybridation à base de formamide. Les deux sondes sont utilisées afin de déterminer le statut du gène HER2 (c.-à-d. le rapport HER2/Chromosome 17).

### Reconstitution, mélange, dilution, titrage

Aucun mélange, reconstitution, dilution ou titrage ne sont nécessaires. Une dilution supplémentaire peut entraîner une perte de sensibilité de la coloration. Toute modification de ce type doit être validée par l'utilisateur.

### Matériel et réactifs nécessaires mais non fournis

Les réactifs et le matériel suivants nécessaires pour la coloration ne sont pas fournis :

1. Ventana *ultraView* SISH DNP Detection Kit [REF 800-098]
2. Ventana *ultraView* Red ISH DIG Detection Kit [REF 800-505]
3. Ventana HybReady Solution [REF 780-4409]
4. Ventana *ultraView* Silver Wash II [REF 780-003 ou équivalent]
5. Ventana ISH Protease 2 [REF 780-4148]\*
6. Ventana ISH Protease 3 [REF 780-4149]\*
7. Ventana Hematoxylin II Counterstain [REF 790-2208]\*
8. Ventana Bluing Reagent [REF 760-2037]\*
9. Ventana Reaction Buffer (10X) [REF 950-300]
10. Ventana SSC (10X) [REF 950-110]
11. Ventana EZ Prep Reagent (10X) [REF 950-102]

12. Ventana Cell Conditioning 2 (Pre-dilute) [REF 950-123]
13. Ventana ULTRA CC2 (Pre-dilute) [REF 950-223]
14. Ventana Liquid Coverslip (High Temperature) Reagent [REF 650-010]
15. Ventana ULTRA LCS (Pre-dilute) [REF 650-210]
16. Automate de coloration BenchMark Series de Ventana
17. Étiquettes à code-barres
18. Lames de microscope Superfrost Plus (VWR REF 48311-703 ou équivalent)
19. Xylène (pour histologie)
20. Eau déionisée ou distillée
21. Milieu de montage permanent (Permount, Fisher REF SP15-500 ou équivalent)\*\*
22. Lamelles de montage (de taille suffisante pour recouvrir le tissu, par ex. VWR REF 48393-60 ou équivalent)
23. Colleuse de lamelles automatique (par ex. Tissue-Tek SCA)
24. Cuves ou bains de coloration
25. Minuteur
26. Microscope optique
27. Les lames HER2 Dual ISH 3-in-1 Xenograft Slides [REF 783-4422] de Ventana peuvent être utilisées pour les activités de résolution de problèmes, le cas échéant.

\* En fonction des besoins pour les applications spécifiques.

\*\* Voir le tableau 9 pour les milieux de montage compatibles avec ce test.

## Conservation et manipulation

Conservé entre 2 et 8 °C. Ne pas congeler.

Pour assurer une distribution correcte du réactif et la stabilité de celui-ci, remettre les capuchons sur tous les distributeurs après chaque utilisation et ranger immédiatement ceux-ci en position verticale dans le réfrigérateur.

Chaque distributeur comporte une date de péremption. Lorsqu'il est correctement conservé, le réactif reste stable jusqu'à la date indiquée sur l'étiquette. Ne pas utiliser le réactif au-delà de la date de péremption pour la méthode de conservation prescrite.

## Collecte et préparation des échantillons pour l'analyse

Les tissus fixés au formol, inclus en paraffine et traités en routine peuvent être utilisés avec ce réactif. Chaque coupe doit avoir une épaisseur appropriée (environ 4 µm) et être placée sur une lame de verre Superfrost Plus. Il est recommandé de fixer les tissus au formol neutre tamponné à 10 %.<sup>21</sup> Ventana a déterminé qu'il est possible d'utiliser des échantillons fixés au formol zinc ou au formol à base d'alcool. Les échantillons fixés avec le fixateur Prefer présentent également une détection de copies uniques avec ce test, bien que la morphologie du tissu puisse être affectée. Il n'est pas recommandé d'utiliser des tissus fixés au fixateur AFA ou au liquide de Bouin avec ce test. Les échantillons fixés au fixateur AFA ou au liquide de Bouin pendant plus de 6 heures présentent peu ou pas de coloration.<sup>22</sup> En plus des tests de Ventana, des études récentes ont montré que la plupart des résultats non concluants pour le gène HER2 par FISH sont liés à des facteurs pré-analytiques notamment une fixation insuffisante et une fixation excessive,<sup>23</sup> ainsi que des fixations tardives.<sup>24</sup> La mise en place stricte de procédures de fixation (par ex. dispositif de traitement garantissant un minimum de 6 heures de fixation) a conduit à une réduction de 64 % des cas non concluants, les échecs passant de 10,8 à 3,4 %. Les échantillons fixés au formol pendant moins de 6 heures peuvent présenter une perte de signal et une digestion nucléaire excessive, mise en évidence par la coloration pâle/faible de l'hématoxyline.

Les coupes d'épaisseur supérieure à 4 µm peuvent exiger un traitement à la protéase plus fort que celui recommandé, et peuvent contenir davantage d'artefacts nucléaires que dans les coupes plus fines, en raison d'un excès de paraffine dans le tissu. Les artefacts nucléaires apparaissent sous forme de bulles, grandes ou petites, ou de cloisons dans les noyaux. Souvent, en présence d'artefacts nucléaires, il existe une gamme d'effets sur les signaux SISH et Red ISH caractérisés par 1) des noyaux avec des bulles dans lesquels les signaux SISH et Red ISH sont généralement toujours centrés à l'intérieur du noyau et 2) des noyaux avec des bulles qui repoussent les signaux SISH et Red ISH à la périphérie. Souvent, dans les deux cas, si les signaux SISH et Red ISH sont clairement discernables, qu'ils ne sont pas déformés et qu'il est toujours possible de les compter, le cas peut être évalué. Cependant, d'importants artefacts nucléaires peuvent parfois déformer les signaux SISH et Red ISH ou bien les rendre indiscernables de telle sorte qu'il devient impossible de les compter avec précision. Cela se produit plus souvent lorsque les signaux SISH et Red ISH sont repoussés à la périphérie des noyaux. Il est malgré tout souvent possible de trouver des noyaux pouvant être comptés dans d'autres zones de l'échantillon et le cas peut alors être évalué. Si les artefacts nucléaires sont importants, au point qu'il est impossible de trouver suffisamment de noyaux dont les

signaux SISH et Red ISH peuvent être comptés en toute confiance, le cas ne doit pas être évalué. Il peut être nécessaire de déparaffiner ces échantillons dans des bains d'alcool et de xylène avant de répéter la coloration sur l'appareil, ou l'utilisateur peut sélectionner l'option de déparaffinage prolongé dans la procédure de coloration (voir la section Résolution des problèmes). En cas de fixation insuffisante (1 à 3 heures dans du formol), des artéfacts nucléaires, beaucoup moins distincts, peuvent également apparaître. On peut y remédier, dans le cas d'une fixation de 3 heures, en modifiant le prétraitement/le traitement à la protéase, mais une fixation d'une (1) heure seulement sera probablement sans remède.

Le test INFORM HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail a été développé avec des options de prétraitement supplémentaires qui peuvent faciliter l'optimisation du test dans les différents laboratoires et faciliter la résolution ultérieure de problèmes rencontrés avec des lames ou tissus particuliers présentant une coloration insuffisante. Ventana recommande à chaque laboratoire d'effectuer ses premiers cycles sur des échantillons de contrôle de biopsie représentatifs, préparés dans des conditions identiques à celles des échantillons cliniques à tester. Cela permettra d'optimiser les conditions de coloration spécifiques pour chaque laboratoire, dont les procédures exactes de préparation d'échantillons peuvent varier. Il se peut que des résultats variables soient obtenus avec des facteurs pré-analytiques différents de ceux recommandés. Des échantillons, pré-analytiquement préparés dans des conditions qui ne sont pas celles recommandées par Ventana, peuvent ne jamais se colorer correctement avec le test.

## AVERTISSEMENTS ET PRÉCAUTIONS

1. Pour utilisation en diagnostic *in vitro* (DIV).
2. Vider le conteneur de déchets avant de lancer un cycle sur l'appareil. Si cette précaution n'est pas respectée, le conteneur de déchets peut déborder et l'utilisateur risque de glisser et de tomber. Sur l'appareil BenchMark XT, un cycle ne commence pas tant que le conteneur de déchets n'est pas vidé avant le lancement d'un cycle.
3. **Attention, ce produit contient du formamide.** Le formamide est toxique par inhalation et est modérément toxique par ingestion. Il irrite la peau, les yeux, les muqueuses et est absorbé par la peau. Il peut avoir des effets néfastes sur le fœtus pendant la grossesse. Manipuler les réactifs avec précaution. Utiliser des gants jetables et porter un vêtement de protection approprié lors de la manipulation de substances suspectées être cancérogènes ou toxiques.
4. Si des réactifs entrent en contact avec des zones sensibles, laver abondamment à l'eau. Éviter toute inhalation des réactifs.
5. Les produits d'origine humaine ou animale doivent être manipulés comme s'ils étaient capables de transmettre une infection et être éliminés en prenant les précautions appropriées.
6. Éviter toute contamination microbienne des réactifs sous peine d'entraîner des résultats erronés.
7. Consulter les autorités locales ou nationales pour connaître la méthode d'élimination des déchets recommandée.

## INSTRUCTIONS D'UTILISATION

### Procédure étape par étape

Ce réactif a été développé pour être utilisé sur un automate de coloration Ventana en association avec les kits de détection et les réactifs accessoires de Ventana. Les paramètres des procédures automatisées peuvent être affichés, imprimés et modifiés selon la procédure décrite dans le manuel de l'opérateur. Les autres paramètres d'utilisation de l'automate de coloration ont été pré-réglés en usine. Le protocole de coloration recommandé pour chaque automate figure au tableau 1.

**Tableau 1. Protocole de coloration recommandé pour le cocktail de sondes INFORM HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail sur les automates de coloration BenchMark Series de Ventana.**

Étape de la procédure sélectionnable	Protocole de coloration recommandé pour les automates BenchMark et BenchMark XT	Protocole de coloration recommandé pour l'automate BenchMark ULTRA
Température de chauffage		Sélectionner 63 °C
Durée de chauffage		20 min
Déparaffinage	Sélectionné	Sélectionner 72 °C
Dépar. prolongé*	Non sélectionné	Non sélectionné
Prétraitement	Sélectionné Prétraitement CC2 CC2 Moyen - 8 min CC2 Standard - 12 min CC2 Prolongé - 8 min	Sélectionné Prétraitement CC2 86 °C CC2 Moyen - 8 min CC2 Standard - 12 min CC2 Prolongé - 8 min
ISH-Protéase 3	16 min (tissu) 8 min (xénogreffes)	16 min (tissu) 8 min (xénogreffes)
Dénaturation	20 min	20 min
Hybridation	6 heures	6 heures
Lavage stringent	72 °C (tissu humain) 76 °C (xénogreffes)	72 °C (tissu humain) 76 °C (xénogreffes)
Multimère SISH	16 min	32 min
Chromogène argentique	4 min	4 min
Multimère Red ISH	24 min	24 min
Chromogène rouge	8 min	8 min
Contre-coloration	Hematoxylin II - 8 min	Hematoxylin II - 8 min
Après contre-coloration	Bluing Reagent - 4 min	Bluing Reagent - 4 min

\* L'option de déparaffinage prolongé « Extended Depar » est destinée à atténuer les artéfacts nucléaires importants dus à l'excès de paraffine.

### Lancement d'un cycle sur les automates de coloration BenchMark Series

1. Appliquer sur la lame l'étiquette à code-barres qui correspond au protocole de la sonde à effectuer.
2. Charger le cocktail de sondes INFORM HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail, les réactifs des kits de détection *ultraView* Red ISH DIG Detection Kit et *ultraView* SISH DNP Detection Kit, ainsi que les réactifs accessoires nécessaires dans le ou les plateaux de réactifs. Placer ce ou ces plateaux sur l'automate de coloration. Vérifier le niveau des liquides et des déchets.
3. Les flacons de tampon de réaction doivent être pleins.
4. Le conteneur de déchets doit être vidé avant de lancer le cycle.
5. Placer les lames sur l'automate de coloration.
6. Démarrer le cycle de coloration.
7. Au terme du cycle, retirer les lames de l'automate de coloration.
8. Passer à la procédure de déshydratation.

### Procédure de déshydratation

Remarque : le chromogène Fast Red est soluble dans l'alcool et dans l'acétone. Ne pas utiliser de bains d'alcool et d'acétone pour déshydrater les lames car cela affecte le signal rouge.

1. Pour retirer la solution de protection liquide, laver les lames dans 2 solutions successives d'un détergent à vaisselle doux (ne pas utiliser de détergent pour lave-vaisselle).
2. Bien rincer les lames à l'eau distillée pendant environ 1 minute. Secouer pour éliminer l'excès d'eau.

- Sécher les lames dans une étuve (45 à 60 °C) ou les laisser sécher à l'air libre à température ambiante. Les temps de séchage en étuve varient de 10 minutes à une heure. S'assurer que les lames sont parfaitement sèches avant de les recouvrir d'une lamelle.
- Plonger les lames dans un bain de xylène pendant environ 30 secondes.
- Placer une lamelle sur la lame. Certains milieux de montage ne sont pas compatibles avec le test (voir les sections Limitations et Résolution des problèmes).

### Procédures de contrôle qualité

#### Échantillons de contrôle

Les séquences de HER2 et du chromosome 17 sont présentes dans chaque cellule du corps humain. Ces séquences servent par conséquent de contrôles positifs internes dans chaque échantillon tissulaire et elles doivent être visibles (1 à 2 signaux par cellule) dans les cellules normales (non néoplasiques) dans et autour de la zone cible du carcinome. Cependant, toutes les cellules ne présenteront pas de copie unique du gène à cause de l'hétérogénéité biologique et de la déformation dues à la coupe du tissu. La coloration nucléaire spécifique peut être localisée dans toutes sortes de cellules, notamment : les fibroblastes du stroma, les cellules endothéliales, les lymphocytes et autres cellules non néoplasiques. Si les cellules du contrôle positif n'affichent pas une coloration positive, la lame est considérée comme non appropriée pour l'évaluation et elle doit être répétée (voir la section Résolution des problèmes). Dans la mesure où toutes les cellules normales contiennent deux copies du gène HER2, il n'existe pas de véritable échantillon de contrôle négatif.

Un échantillon de contrôle positif spécifique au laboratoire peut être inclus à chaque procédure de coloration, si on le souhaite. Les échantillons de contrôle peuvent être des échantillons préparés de la même manière que les échantillons de patients. De tels contrôles sont utiles pour contrôler toutes les étapes de la procédure, de la préparation des échantillons à leur coloration.

Les lames HER2 Dual ISH 3-in-1 Xenograft Slides sont utilisées pour la validation préliminaire et pour les activités de résolution des problèmes associées au cocktail de sondes INFORM HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail. Ces lames contiennent trois coupes de xénogreffes distinctes fixées au formol et incluses dans un seul bloc de paraffine. Ces coupes de xénogreffes ont été sélectionnées parce qu'elles sont bien caractérisées dans la littérature scientifique quant à leurs niveaux de protéine HER2 et à leur nombre de copies du gène.

#### Réactif de contrôle positif

Un réactif de contrôle positif doit être utilisé durant le test de vérification et les activités de résolution des problèmes, car l'accessibilité de l'ADN peut varier en fonction des conditions de traitement pré-analytiques. Le cocktail de sondes INFORM HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail peut être utilisé comme contrôle positif pour ce test car chaque cellule normale du corps humain contient une à deux copies de HER2 et du chromosome 17.

Un réactif de contrôle négatif n'est pas nécessaire car les contrôles positifs internes sont suffisants.

#### Différences inexplicables

Les différences inexplicables dans les contrôles doivent être immédiatement transmises au représentant local.

#### Test de vérification

Avant la première utilisation d'un réactif dans une procédure de diagnostic, il faut vérifier sa performance en le testant sur une série d'échantillons ayant des caractéristiques de performance ISH connues comme les lames HER2 Dual ISH 3-in-1 Xenograft Slides de Ventana (se reporter aux Procédures de contrôle qualité décrites dans cette section de la notice du produit). Ces procédures de contrôle qualité doivent être répétées pour chaque nouveau lot de réactifs, ou chaque fois qu'un paramètre du test est modifié.

#### Interprétation des résultats

Un lecteur qualifié, expérimenté dans l'interprétation microscopique d'échantillons de carcinomes mammaire ou gastrique, dans les procédures ISH et la reconnaissance de copies uniques et amplifiées de HER2 (qui peut nécessiter un examen microscopique à grossissement x40 à x60), doit évaluer les noyaux des contrôles avant d'interpréter les résultats.

Le statut du gène HER2 ne doit être évalué que dans les carcinomes invasifs. Les carcinomes in situ (canalaires et lobulaires) d'échantillons mammaires ne doivent pas être évalués. Le lecteur doit se reporter à la lame H&E correspondante pour déterminer les zones cibles appropriées à l'évaluation de la lame colorée par Dual ISH, le cas échéant.

### Définitions

- Statut du gène HER2. Le statut du gène HER2 est une fonction du rapport du nombre moyen de copies du gène HER2 par rapport au nombre moyen de copies du chromosome 17 (Chr17), par cellule, dans un carcinome du sein invasif ou un carcinome de l'estomac. Le statut du gène HER2 est classé selon les directives suivantes :
  - Un rapport HER2/Chromosome 17  $\geq 2,0$  est amplifié ;
  - Un rapport HER2/Chromosome 17  $< 2,0$  est non amplifié.
- Adéquation des lames. Chaque lame colorée avec le cocktail de sondes INFORM HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail doit remplir deux critères pour être considérée appropriée pour l'évaluation. Si la lame ne remplit pas ces critères, elle n'est alors pas appropriée pour l'évaluation.
  - Contrôle positif interne. Les signaux HER2 (SISH) et Chr17 (Red ISH) normaux (1 à 2 copies par cellule) servent de contrôles positifs internes et doivent être visibles dans l'échantillon. Cette coloration nucléaire peut être localisée dans toutes sortes de cellules non néoplasiques, notamment : les fibroblastes du stroma, les cellules endothéliales, les lymphocytes et autres cellules non néoplasiques. Les cellules sur la lame ne présentent pas toutes une coloration avec les deux sondes, mais les cellules normales dans et/ou autour de la zone cible doivent présenter une coloration appropriée.
  - Cellules carcinomateuses. À grossissement x20, x40 ou x60, la zone cible du carcinome doit présenter un champ de signaux SISH et Red ISH pouvant être compté.
- Zones cibles pour le comptage des signaux. Une zone cible acceptable à l'intérieur du carcinome présente un champ de signaux SISH et Red ISH pouvant être compté. Le comptage des signaux ne doit pas être réalisé dans des zones contenant des signaux SISH et/ou Red ISH faibles, contenant des noyaux comprimés ou qui se chevauchent, ou présentant une nécrose. Les noyaux présentant une coloration de fond SISH ou Red ISH excessive qui interfère avec la capacité à évaluer les signaux spécifiques ne doivent pas être comptés.

### Observations supplémentaires concernant HER2 et le chromosome 17

D'autres observations concernant la coloration SISH de HER2 et/ou Red ISH du chromosome 17 peuvent être notées sous la forme de commentaires dans le rapport du pathologiste.

- Hétérogénéité : dans certains cas, le tissu peut contenir des zones de carcinome génétiquement hétérogènes quant au nombre de copies de HER2 (c.-à-d. qu'il peut y avoir un mélange de noyaux amplifiés et non amplifiés ; ou bien un mélange de noyaux contenant diverses copies de HER2). Cela peut s'observer parmi les cellules carcinomateuses dans la zone cible elle-même, ou entre deux zones cibles différentes.
- L'aneusomie représente toute condition dans laquelle un organisme possède un ou plusieurs chromosomes spécifiques en plus ou en moins par rapport à la normale, c.-à-d. que le nombre de chromosomes pour un chromosome particulier (dans le cas présent, le chromosome 17) n'est pas diploïde. Dans le cas d'une polysomie, il peut y avoir trois copies ou plus du chromosome au lieu des deux copies attendues. Dans le cas d'une monosomie, il est possible que les cellules tumorales ne présentent qu'une seule copie du chromosome 17. Une « amplification » apparente, des agrégats ou une polysomie du chromosome 17 (avec ou sans agrégats de signaux HER2 SISH) ont été signalés.<sup>25</sup> Dans les cas où l'on observe des agrégats de HER2 et du Chr17, des précautions doivent être prises afin de ne pas les considérer avec un rapport de  $\sim 1,0$ . Dans ces cas, le lecteur doit recourir à l'IHC pour analyser la surexpression de la protéine HER2, car la majorité des cas a tendance à être 3+.
- Délétion monoallélique : la délétion du gène HER2 sur le chromosome 17 dans les cellules tumorales se traduit par un rapport HER2/Chr17  $< 1,0$ .

### Visualisation des signaux et adéquation des lames

Les signaux SISH et Red ISH sont visualisés sous la forme de :

- Copie unique. Un signal distinct noir (SISH) ou rouge (Red ISH) est compté comme une copie unique du gène HER2 ou du chromosome 17, respectivement. Pour les signaux SISH (noirs), des signaux individuels distincts visualisés dans les noyaux (non néoplasiques) des contrôles positifs internes et physiologiques, sur la même lame, représentent la taille d'une copie du gène dans les cellules de carcinome invasif. Pour les signaux Red ISH, chaque signal distinct est compté comme une copie. Les signaux Red ISH de la sonde spécifique au chromosome 17 marquée à la digoxigénine (DIG) peuvent apparaître plus grands que les signaux SISH, avec parfois une forme plus allongée, et de taille variable à l'intérieur d'une même zone cible et entre échantillons. Les signaux SISH peuvent apparaître beaucoup plus

petits que les signaux Red ISH. Cependant, aucune taille minimum n'est requise et tous les signaux distincts doivent être comptés. Une traînée rose peut apparaître mais ne doit pas être confondue avec un signal. Les signaux rouges qui sont de couleur très pâle comparés au signal des noyaux des contrôles positifs internes et au profil de coloration général ne doivent pas être comptés car ils peuvent être non spécifiques.

2. Copies multiples. Des signaux SISH individuels et distincts visualisés dans les noyaux des contrôles positifs internes représentent la taille d'une copie unique de HER2 dans les cellules du carcinome invasif. La taille des signaux SISH individuels est utilisée comme référence pour déterminer le nombre relatif de copies amplifiées dans les noyaux des cellules cancéreuses. Pour les signaux Red ISH, chaque signal distinct est compté comme une copie.
3. Agrégats. Un agrégat est défini comme de nombreux signaux SISH se chevauchant dans les noyaux et ne pouvant pas être discernés individuellement. Seul le lecteur peut estimer les agrégats de HER2. Par exemple, un gros agrégat de plusieurs signaux SISH pourra être estimé à 12 copies, alors que des agrégats plus petits seront estimés à 6 copies. L'estimation est effectuée en utilisant les copies SISH individuelles présentes dans les cellules des contrôles positifs internes utilisées comme référence. La présence d'agrégats de HER2 est notée sur la feuille d'évaluation.
4. Les noyaux qui se chevauchent, ou ne présentant qu'une seule couleur et les échantillons présentant une coloration non spécifique ne doivent pas être évalués. Tout noyau contenant des signaux Red ISH et SISH qui se chevauchent et qui ne peuvent pas être distingués les uns des autres doivent être examinés à un plus fort grossissement afin de pouvoir distinguer les deux signaux ou ne doivent pas être comptés. Les noyaux contenant des bulles au point de compromettre l'interprétation des signaux ne doivent pas être comptés.

#### Comptage des signaux SISH et Red ISH pour déterminer le statut du gène HER2

Avant de compter les signaux HER2 et ceux du chromosome 17 en vue de déterminer le statut du gène HER2, il est essentiel de déterminer si la zone cible invasive (le tissu de la lésion) a été correctement colorée et si elle remplit les critères d'adéquation des lames décrits (voir la section Définitions ci-dessus, 2. Adéquation des lames).

Ventana a développé un algorithme d'évaluation pour le test qui maximise la précision et l'efficacité du comptage. Vingt noyaux, contenant chacun des signaux rouges (Red ISH) et noirs (SISH), doivent être comptés. Les résultats finaux du statut de HER2 sont indiqués en fonction du rapport obtenu en divisant la somme des signaux HER2 pour l'ensemble des 20 noyaux par la somme des signaux du chromosome 17 pour l'ensemble des 20 noyaux. Le statut de l'amplification est défini comme amplifié si le rapport HER2/Chr17 est  $\geq 2,0$  et comme non amplifié si le rapport HER2/Chr17 est  $< 2,0$ . Si le rapport HER2/Chr17 est compris entre 1,8 et 2,2 (inclus), 20 noyaux supplémentaires doivent être comptés. Un nouveau rapport doit alors être calculé en se basant sur l'ensemble des 40 noyaux, et le statut de l'amplification reporté comme décrit ci-dessus.






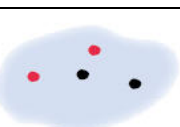
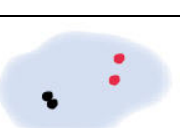
#### Critères de sélection des cellules



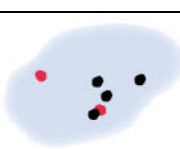
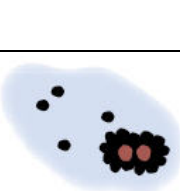
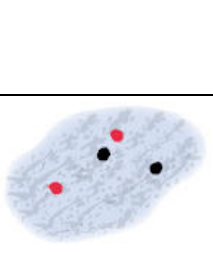

Compter uniquement les noyaux dont les diamètres sont représentatifs de la population moyenne des noyaux du carcinome invasif dans la zone cible. Ne pas compter les signaux des noyaux dont :

1. le diamètre est beaucoup plus grand que la taille moyenne des noyaux des cellules carcinomateuses ;
2. le diamètre est beaucoup plus petit que la taille moyenne des noyaux des cellules carcinomateuses.

Dans les zones cibles hétérogènes d'un point de vue génétique pour le nombre de copies de HER2, compter uniquement les noyaux qui sont représentatifs de la population de noyaux du carcinome invasif, avec le nombre moyen de signaux le plus élevé. Noter la présence d'hétérogénéité sur la feuille d'évaluation.



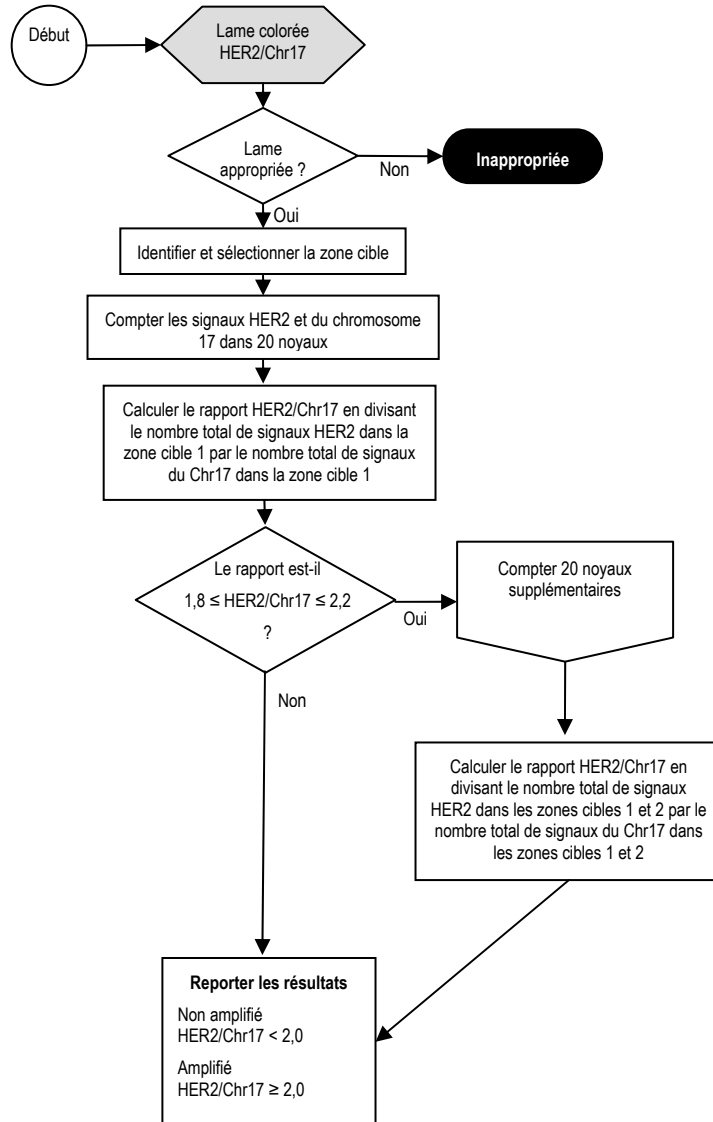
	Ne pas compter si les noyaux se chevauchent.
	Ne pas compter si aucun signal n'est présent.
	Ne pas compter s'il n'y a que des signaux d'une seule couleur.
	Ne pas compter si les signaux sont en dehors des noyaux.
	Compter 1 signal noir (HER2) et 1 rouge (Chr17).
	Compter 2 signaux noirs (HER2) et 2 rouges (Chr17).
	Compter 1 signal noir (HER2) et 2 rouges (Chr17). Le signal noir est un « doublet ». Compter deux signaux adjacents de la même couleur seulement si la distance entre les signaux est égale ou supérieure au diamètre d'un signal individuel.

	Les petits agrégats de signaux SISH ne peuvent être estimés qu'en utilisant la taille d'un point individuel comme référence ; utiliser les cellules du stroma pour estimer la taille des signaux (cellule plus petite à gauche). Par exemple, cet agrégat pourrait être estimé à 6 signaux SISH – ajouter les 2 autres signaux individuels conduit à un total de 8. Compter 2 signaux rouges. <b>Noter la présence d'agrégats pour HER2 sur la feuille d'évaluation.</b>
	Estimer le gros agrégat. Ici, l'agrégat peut être estimé à 12 signaux noirs – ajouter les 4 autres signaux individuels conduit à un total de 16. Compter les signaux rouges comme 2 copies du chromosome 17. <b>Noter la présence d'agrégats pour HER2 sur la feuille d'évaluation.</b>
	La présence d'un signal rouge près d'un signal noir doit être comptée comme un signal rouge et un signal noir. <b>Il peut être nécessaire de compter à l'aide d'un objectif x60 pour les distinguer.</b> Par conséquent, compter 4 signaux noirs et 2 signaux rouges. Si les signaux qui se chevauchent ne peuvent pas être distingués, ne pas compter ce noyau.
	Agrégat de signaux noirs cachant un ou plusieurs signaux rouges. On peut utiliser un grossissement plus fort (x60) pour essayer de confirmer la présence ou l'absence de signaux rouges ; sinon ne pas compter. Ne compter que les noyaux avec des signaux rouges nets. <b>Noter la présence d'agrégats SISH sur la feuille d'évaluation.</b> Les noyaux avec des signaux rouges visibles et en plus grand nombre doivent être comptés parmi les noyaux avec des agrégats SISH.
	Si de la « poussière » SISH est présente dans l'arrière-plan des noyaux, ne compter que si les signaux SISH spécifiques sont clairement discernables par rapport à l'arrière-plan.
	Une traînée rose peut être observée mais ne doit pas être confondue avec un signal. Le signal rouge peut varier en intensité mais est toujours distinct. L'image montre 2 signaux rouges distincts (Chr17) et 2 signaux noirs (HER2).

**Tableau 2.** Visualisation des signaux pour le cocktail de sondes INFORM HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail.

**Statut du gène HER2 : algorithme d'évaluation pour le cocktail de sondes HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail**

Vingt noyaux (chacun contenant des signaux rouges [Chr17] et noirs [HER2]) doivent être comptés. Les résultats finaux pour le statut de HER2 sont indiqués en fonction du rapport obtenu en divisant la somme des signaux HER2 pour l'ensemble des 20 noyaux par la somme des signaux du chromosome 17 pour l'ensemble des 20 noyaux. Le statut de l'amplification est défini comme amplifié si le rapport HER2/Chromosome 17 est  $\geq 2,0$  et comme non amplifié si le rapport HER2/Chromosome 17 est  $< 2,0$ . Si le rapport HER2/Chr17 est compris entre 1,8 et 2,2, 20 noyaux supplémentaires doivent être comptés. Un nouveau rapport doit alors être calculé en se basant sur l'ensemble des 40 noyaux, et le statut de l'amplification reporté comme décrit ci-dessus.





## Contrôles

La présence d'un dépôt de couleur argenté et rouge dans les noyaux des cellules normales indiquent une réactivité positive. Les noyaux des cellules normales doivent contenir en moyenne 1 à 2 signaux SISH et Red ISH distincts, indiquant que l'hybridation de la sonde ADN spécifique de HER2 et de la sonde centromérique du chromosome 17 a eu lieu sur le gène et son chromosome, respectivement. S'il n'est pas possible de détecter des copies individuelles du gène dans les cellules normales, cela indique que la lame n'est pas appropriée et les résultats doivent alors être considérés comme non valides.

Les résultats morphologiques et les données cliniques pertinentes du patient doivent être interprétés par un pathologiste qualifié.

## LIMITATIONS

### Limitations générales

- L'ISH est une méthode en plusieurs étapes nécessitant une formation spécialisée pour le choix des réactifs appropriés, la préparation et le traitement des échantillons, la préparation des lames ISH et l'interprétation des résultats.
- La coloration du tissu dépend de la manipulation et du traitement de ce tissu avant coloration. Les fixation, congélation, décongélation, lavage, séchage, chauffage ou coupe incorrects, ou une contamination par d'autres tissus ou liquides peuvent entraîner la présence d'artefacts. Des résultats incohérents peuvent être la conséquence de variations dans les méthodes de fixation et d'inclusion, ou d'irrégularités inhérentes au tissu.
- Une contre-coloration incomplète ou excessive peut compromettre l'interprétation correcte des résultats.
- L'interprétation clinique de toute coloration positive, ou de son absence, doit être évaluée dans le contexte de l'historique clinique, de la morphologie et d'autres critères histopathologiques. L'interprétation de la coloration est sous la responsabilité d'un pathologiste qualifié devant être familiarisé avec les réactifs et les méthodes de coloration utilisés. La coloration doit être réalisée dans un laboratoire autorisé et certifié, sous le contrôle d'un pathologiste, responsable de l'examen des lames colorées et de l'adéquation des contrôles.
- Ventana fournit des réactifs dont la dilution est optimale s'ils sont utilisés suivant les instructions fournies. Des dilutions supplémentaires peuvent entraîner une perte de la coloration appropriée ; toute modification de ce type doit être validée par l'utilisateur. Tout écart par rapport aux procédures de test recommandées peut invalider les résultats attendus. Les utilisateurs qui s'écartent des procédures de test recommandées doivent accepter la responsabilité de l'interprétation des résultats des patients.
- En raison des variations du traitement des échantillons, il peut être nécessaire d'augmenter ou de diminuer la durée d'incubation de la protéase, la durée du prétraitement ou les durées d'incubation des composants de détection pour obtenir une coloration optimale. Toute modification de ce type doit être validée par l'utilisateur. Les utilisateurs qui s'écartent des procédures de test recommandées doivent, dans ces conditions, accepter la responsabilité de l'interprétation des résultats des patients.
- Les réactifs peuvent présenter des réactions inattendues sur des tissus qui n'ont pas été testés auparavant. En raison de la variabilité biologique des tissus, la possibilité d'obtenir des réactions inattendues sur des groupes de tissus déjà testés ne peut cependant pas être totalement éliminée. Contacter le représentant local et lui communiquer la description des réactions inattendues.

### Limitations spécifiques

- Le cocktail de sondes INFORM HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail a été développé pour colorer des coupes de tissus fixées au formol neutre tamponné à 10 % et dont l'épaisseur est ~4 µm.<sup>26</sup> Le test permet également de colorer les échantillons fixés au formol à base d'alcool, au formol zinc et avec le fixateur Prefer. Il n'est pas recommandé de fixer avec le liquide de Bouin ou le fixateur AFA.
- Afin d'empêcher la dissolution du signal Red ISH, les lames colorées doivent être immergées dans des bains d'alcool ou d'acétone pendant la déshydratation. Un séchage à l'air libre ou dans une étuve est recommandé.
- Le signal SISH est connu pour s'atténuer après exposition à certains milieux de montage. Voir le tableau 9 à la section Résolution des problèmes pour une liste des milieux de montage incompatibles.

## CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCE

- La sensibilité analytique du cocktail de sondes INFORM HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail a été évaluée en utilisant les lames HER2 Dual ISH 3-in-1 Xenograft Slides précédemment caractérisées quant au nombre de copies du gène HER2 avec le kit PathVysion HER-2 DNA Probe Kit d'Abbott/Vysis pour hybridation in situ en

fluorescence (FISH) et dont il a été déterminé qu'elle présentait des rapports HER2/Chr17 similaires. De plus, environ 90 échantillons humains (un mélange de cas amplifiés et non amplifiés) ont été colorés avec le cocktail de sondes INFORM HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail et ont été évalués par deux lecteurs qualifiés. La même cohorte a été colorée à l'aide du kit PathVysion FISH et lue par un lecteur qualifié. Pour le test INFORM HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail, le taux de réussite de la coloration au premier passage était >93 %. Les résultats, détaillant les taux de concordance négative, positive et globale pour environ 60 échantillons cliniques de cette cohorte, évalués à la fois avec la méthode FISH et le cocktail de sondes INFORM HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail, sont présentés aux tableaux 3 et 4.

**Tableau 3.** Concordance entre le cocktail de sondes INFORM HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail et la méthode FISH dans une cohorte d'échantillons de carcinome mammaire humain lus par 2 lecteurs.

		Statut de l'amplification par FISH	
Lecteur du test HER2 Dual ISH	Statut de l'amplification avec le test HER2 Dual ISH	Amplifié	Non amplifié
	Lecteur A	Amplifié	21
Non amplifié		1	40
Lecteur B	Amplifié	17	1
	Non amplifié	2	41

**Tableau 4.** Récapitulatif des taux de concordance négative, positive et globale pour le cocktail de sondes INFORM HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail et la méthode FISH sur des échantillons de carcinome mammaire humain.

Lecteur du test HER2 Dual ISH	Taux de concordance négative		Taux de concordance positive		Taux de concordance globale	
	Données brutes /nbre de cas	Pourcentage (IC du score à 95 %)	Données brutes /nbre de cas	Pourcentage (IC du score à 95 %)	Données brutes /nbre de cas	Pourcentage (IC du score à 95 %)
Lecteur A	40/42	95,2 (84,2 – 98,7)	21/22	95,5 (78,2 – 99,2)	61/64	95,3 (87,1 – 98,4)
Lecteur B	41/42	97,6 (87,7 – 99,6)	17/19	89,5 (68,6 – 97,1)	58/61	95,1 (86,5 – 98,3)

- La spécificité analytique (efficacité d'hybridation) du cocktail de sondes INFORM HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail a été déterminée en colorant des étalements de chromosomes en métaphase humains, sains, avec le cocktail de sondes HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail sur un appareil BenchMark XT. Sur les 100 étalements de chromosomes en métaphase analysés, 100 % présentaient une colocalisation spécifique à la fois de la sonde spécifique à HER2 et de la sonde spécifique au chromosome 17.
- La reproductibilité du test INFORM HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail a été testée sur cinq cas différents de carcinome mammaire humain (représentant la gamme dynamique du statut du gène HER2) et sur les lames HER2 Dual ISH 3-in-1 Xenograft Slides sur cinq jours non consécutifs et sur six appareils (2 BenchMark, 2 BenchMark XT, 2 BenchMark ULTRA). Le nombre moyen de copies de HER2 et du chromosome 17 a été obtenu pour chaque appareil (sur l'ensemble des 3 plates-formes) sur chacun des cinq cycles. Plus de 98 % des lames colorées et évaluées lors de cette étude (360 lames au total) étaient appropriées et ont eu pour résultat des nombres de copies de HER2 et du chromosome 17 reproductibles avec des CV% <10 % sur l'ensemble des jours, des appareils et des plates-formes testés.
- La reproductibilité inter-lots du test INFORM HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail a été déterminée en testant chacun des 3 lots de cocktail de sondes INFORM HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail avec 3 lots de kits de détection *ultraView* SISH DNP Detection Kit et *ultraView* Red ISH DIG Detection Kit sur des lames en double de 3 cas de carcinome mammaire humain et sur des lames HER2 Dual ISH 3-in-1 Xenograft Slides. Toutes les lames (100 %) étaient appropriées et un lecteur qualifié en a évalué le nombre brut de copies de HER2 et du chromosome 17 dans 20

noyaux/échantillon. Les données ont été soumises à une analyse du composant de variance basée sur un modèle à effets aléatoires, et les résultats montrent que tous les critères d'acceptation ont été remplis lors de cette étude. Les CV% sur l'ensemble des lots de sondes et de kits de détection et au sein d'un même cycle étaient tous <11 %, indiquant une excellente précision du test.

5. La comparabilité du test sur des échantillons mammaires a été déterminée par une étude comparant le test INFORM HER2 DNA Probe, où le nombre de copies de HER2 et du chromosome 17 a été déterminé sur des lames individuelles en utilisant une détection simple par SISH, au test INFORM HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail, où le nombre de copies de HER2 et du chromosome 17 a été déterminé sur une seule lame en utilisant une détection SISH et Red ISH. Une cohorte de 213 cas de carcinome mammaire contenant un mélange moitié/moitié de statut du gène non amplifié et amplifié a été testée avec les deux tests sur les automates de coloration BenchMark XT (tableau 5). Le taux de concordance globale dans les échantillons cliniques du cocktail de sondes INFORM HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail avec le test INFORM HER2 DNA Probe est présenté au tableau 6.
6. La reproductibilité du test INFORM HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail a été testée sur quatre cas différents de carcinome gastrique humain (représentant la gamme dynamique du statut du gène HER2) sur cinq jours non consécutifs et sur six appareils (2 BenchMark, 2 BenchMark XT, 2 BenchMark ULTRA). Le nombre moyen de copies de HER2 et du chromosome 17 a été obtenu pour chaque appareil (sur l'ensemble des 3 plates-formes) sur chacun des cinq cycles. Plus de 98 % des lames colorées et évaluées lors de cette étude (240 lames au total) étaient appropriées et ont eu pour résultat des nombres de copies de HER2 et du chromosome 17 reproductibles avec des CV% <10 % sur l'ensemble des jours, des appareils et des plates-formes testés.
7. La comparabilité du test sur les échantillons gastriques a été déterminée en comparant les résultats de coloration d'un cycle du test INFORM HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail sur un appareil BenchMark XT avec le kit Dako HER2 FISH PharmDx Kit (tableau 7). Le taux de concordance globale dans les échantillons cliniques du cocktail de sondes INFORM HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail avec le kit Dako HER2 FISH PharmDx Kit est présenté au tableau 8.

**Tableau 5.** Concordance entre le cocktail de sondes INFORM HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail utilisant une détection Dual SISH et Red ISH et la sonde INFORM HER2 DNA Probe utilisant une détection SISH, sur une cohorte d'échantillons de carcinome du sein invasif.

Statut de l'amplification par HER2 Dual ISH	Statut de l'amplification par HER2 SISH		
	Amplifié	Non amplifié	Total
Amplifié	101	7	108
Non amplifié	13	92	105
Total	114	99	213

**Tableau 6.** Récapitulatif du taux de concordance globale pour le cocktail de sondes INFORM HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail utilisant une détection Dual SISH et Red ISH en comparaison avec la sonde INFORM HER2 DNA Probe utilisant une détection simple SISH sur des échantillons de carcinome du sein invasif. Les intervalles de confiance à 95 % sont également présentés.

Taux de concordance globale	
Données brutes /nbre de cas	Pourcentage (IC du score à 95 %)
193/213	90,6 (85,9 – 93,8)

**Tableau 7.** Concordance entre le test INFORM HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail et le test Dako PharmDx FISH dans des échantillons de carcinome gastrique.

Statut de l'amplification par HER2 Dual ISH	Statut de l'amplification par FISH de Dako		
	Amplifié	Non amplifié	Total
Amplifié	15	2	17
Non amplifié	6	123	129
Total	21	125	146

**Tableau 8.** Récapitulatif du taux de concordance globale entre le test INFORM HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail et le test FISH de Dako pour le statut du gène HER2 sur des échantillons de carcinome gastrique. Les intervalles de confiance à 95 % sont également présentés.

Taux de concordance globale	
Données brutes /nbre de cas	Pourcentage (IC du score à 95 %)
138/146	94,5 (89,6–97,2)

## RÉSOLUTION DES PROBLÈMES

1. Il est essentiel d'évaluer la présence d'un signal approprié dans les noyaux des contrôles positifs internes. Les signaux HER2 et Chr17 normaux (1 à 2 copies par cellule) servent de contrôles positifs internes et leur présence confirme la sensibilité du test sur chaque lame. Cette coloration nucléaire peut être localisée dans toutes sortes de cellules non néoplasiques, notamment : les fibroblastes du stroma, les cellules endothéliales, les lymphocytes et autres cellules non néoplasiques.
2. Une coloration faible ou bien absente des échantillons au cours d'un cycle peut indiquer un problème avec les réactifs ou l'appareil. Vérifier que les conditions pré-analytiques appropriées ont bien été suivies (voir la section Collecte et préparation des échantillons pour l'analyse). S'assurer que tous les distributeurs fonctionnent correctement. Les lames HER2 Dual ISH 3-in-1 Xenograft Slides peuvent être utilisées pour la résolution des problèmes si un problème avec les réactifs ou l'appareil est suspecté.
3. Si le signal SISH est approprié mais que le signal Red ISH est faible ou absent, s'assurer que les lames n'ont pas été déshydratées dans de l'alcool ou de l'acétone, et qu'elles n'ont pas été exposées de manière prolongée à des bains de xylène. Si le signal Red ISH est approprié mais que le signal SISH est faible ou absent (ou paraît s'atténuer ou devenir brun/orange), il peut s'agir d'une oxydation du signal. S'assurer qu'un milieu de montage approprié a été utilisé (voir tableau 9).
4. Les échantillons qui ont été mal prélevés, fixés ou conservés peuvent ne pas présenter une coloration appropriée (voir la section Collecte et préparation des échantillons pour l'analyse).
5. Si le signal d'une ou des deux sondes apparaît faible ou absent et si les noyaux des cellules tumorales sont intacts et/ou bleus, il est recommandé d'augmenter la durée du prétraitement. Spécifiquement, on peut utiliser le réactif ISH Protease 3 pendant plus de 16 minutes (c.-à-d. 24 minutes) ou bien le réactif ISH Protease 2 pendant 4 minutes ou plus. Augmenter la durée de prétraitement (16 minutes par cycle pendant 3 cycles) est également efficace. Ventana a démontré que manipuler les étapes de prétraitement est plus efficace pour « récupérer » des colorations faibles.
6. Si le signal dans les conditions recommandées est faible ou absent dans les cellules tumorales et que les cellules tumorales apparaissent surdigérées (c.-à-d. que la contre-coloration est pâle ou absente), cela peut être dû à une fixation insuffisante (voir la section Collecte et préparation des échantillons pour l'analyse). Il est recommandé de réduire la durée d'incubation du réactif ISH Protease 3 à 8 ou 12 minutes. De plus, augmenter les durées d'incubation des réactifs SISH HRP Multimer, Silver C, PAL Multimer et Fast Red Chromogen est également efficace pour « récupérer » des colorations faibles.
7. Si les lames présentent une coloration de fond SISH non spécifique (« poussière ») dans les noyaux, pouvant interférer avec l'évaluation des signaux SISH spécifiques,

il est possible de réduire la durée d'incubation du réactif Protease 3 de 16 minutes à 4, 8 ou 12 minutes.

8. Si une coloration Red ISH non spécifique du noyau interfère avec l'évaluation, colorer à nouveau la lame en utilisant des températures plus élevées pour le lavage stringent (c.-à-d. 76 °C).
9. Pour des actions correctives, se reporter à la section Procédure étape par étape contenue dans le manuel de l'opérateur de l'automate de coloration ou contacter le représentant local du service après-vente.
10. Les coupes d'une épaisseur supérieure à 4 µm peuvent exiger un traitement à la protéase plus fort pour démasquer l'ADN cible. Les coupes plus fines peuvent demander un traitement à la protéase plus doux. De plus, les coupes épaisses peuvent présenter davantage d'artéfacts nucléaires que les coupes plus fines, à cause de l'excès de paraffine dans le tissu (voir la section Collecte et préparation des échantillons pour l'analyse). Il peut être nécessaire de déparaffiner ces coupes dans des bains d'alcool et de xylène avant d'effectuer la coloration sur l'appareil, ou l'utilisateur peut sélectionner l'option « déparaffinage prolongé » de la procédure de coloration afin d'atténuer les artéfacts nucléaires dus à l'excès de paraffine.
11. Si un cas présente une coloration ne pouvant pas être interprétée, avec une coloration de fond brune, noire ou rouge foncé sur l'ensemble du tissu, la lame doit être colorée à nouveau. Si la coloration est toujours inacceptable, vérifier que les lames sont des lames SuperFrost Plus. Si un excès de réactif d'argent ou de rouge est déposé sur la lame, rendant l'évaluation des signaux nucléaires difficile à cause de la présence de mouchetures sur l'ensemble du tissu, la lame doit également être colorée à nouveau. Généralement, pas plus de 5 à 6 % des cas doivent être répétés en raison de ces artéfacts de séchage/mouchetures.

**Tableau 9.** Milieux de montage testés pour leur compatibilité avec les tests basés sur la méthode SISH.

Milieux de montage	Fabricant	Type (xylène, alcool, aqueux)	Résultat (coloration normale = N ; atténuation = A)
Eukitt	EMS	Xylène	A
Entellan New	Merck	Xylène	A
Entellan	Merck	Xylène	A
HSR	Sysmex	Xylène	A
Malinol	Muto Chemical	Xylène	A
Cytoseal XYL	Richard Allan Scientific	Xylène	N
Softmount	WAKO	Lemasol A	N
Paramount	Protaqs Quartett: Dako	Xylène	N
DPX	BDH : Raymond Lamb	Xylène	N
Cytoseal 60	Richard Allan Scientific	Xylène	N
Permout	Fisher	Xylène	N
Histomount	Raymond Lamb	Xylène	N
Ultramout	Dako	Xylène	N
Thermo EZ Mount	Thermo Scientific	Xylène	N
SureMount	Triangle Biomedical Sciences	Xylène	N
Flo-Text	Lerner Labs	Xylène	N
Mountex	Histolab	Xylène	N
Shandon Consul mount	Thermo Scientific	Xylène	N
MM24	SurgiPath	Xylène	N
Pertex	Cell Path	Xylène	N
MicroMount	SurgiPath	Xylène	N
Diamount	Diapath	Xylène	N
Alcolmount	Diapath	Alcool	N
BioMount 2	BBInternational	Xylène	N
Acrytol	SurgiPath	Xylène	N
Gel Mount	Biomeda	Aqueux	N
Mount-Quick	Daido Sangyo Co.	Aqueux	N

## RÉFÉRENCES

1. Gschwind A, Fischer OM, Ullrich A. The discovery of receptor tyrosine kinases: target for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2004;4:361-370.
2. Muleris M, et al. Assignment of v-erb-b2 avian erythroblastic leukemic viral oncogene homolog 2 (ERBB2) to human chromosome band 17121.1 by in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 1997;76:34-5.
3. Coussens L, Yang-Feng TL, Liao YC, Chen E, Gray A, McGrath J, et al. Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with neu oncogene. *Science* 1985;230:1132-1139.
4. Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, et al. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* 1989;244:707-712.
5. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, et al. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 1987;235:177-182.
6. Narita M, Nakao K, Ogino N, et al. Independent prognostic factors in breast cancer patients. *Am J Surg* 1998;175:73-75.
7. O'Reilly SM, Barnes DM, Camplejohn RS, et al. The relationship between c-erbB-2 expression, S-phase fraction, and prognosis in breast cancer. *Br J Cancer* 1991;63:444-446.
8. Pegram MD, Finn RS, Arzoo K, et al. The effect of HER-2/neu overexpression on chemotherapeutic drug sensitivity in human breast and ovarian cancer cells. *Oncogene* 1997;15:537-547.
9. Press MF, Pike MC, Chazin VR, et al. HER-2/neu expression in node-negative breast cancer: Direct tissue quantitation by computerized image analysis and association of overexpression with increased risk of recurrent disease. *Cancer Res* 1993;53:4960-4970.
10. Press MF, Bernstein L, Thomas PA, Meisner LF, et al. HER-2/neu gene amplification characterized by fluorescence in situ hybridization: Poor prognosis in node-negative breast carcinomas. *J Clin Oncol* 1997;15:2894-2904.
11. Gusterson BA, Gelber RD, Goldhirsch A, et al. Prognostic importance of c-erbB-2 expression in breast cancer. *J Clin Oncol* 1992;10:1049-1056.
12. Bianchi S, Paglierani M, Zampi G, et al. Prognostic significance of c-erbB-2 expression in node negative breast cancer. *Br J Cancer* 1993;67:625-629.
13. Kallioniemi O-P, Holli K, Visakorpi T, et al. Association of c-erbB-2 protein expression with high rate of cell proliferation, increased risk of visceral metastasis and poor long-term survival in breast cancer. *Int J Cancer* 1991;49:650-655.
14. Vogel CL, Cobleigh MA, Tripathy D, et al. Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 2002;20:719-726.
15. Baselga J, Carbonell X, Castaneda-Soto NJ, et al. Phase II study of efficacy, safety, and pharmacokinetics of trastuzumab monotherapy administered on a 3-weekly schedule. *J Clin Oncol* 2005;23:2162-2171.
16. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, et al. Concurrent administration of anti-HER2 monoclonal antibody and first-line chemotherapy for HER2-overexpressing metastatic breast cancer. A phase III, multinational, randomized controlled trial. *N Engl J Med* 2001;344:783-792.
17. Marty M, Cognetti F, Maraninchi D, et al. Randomized phase II trial of the efficacy and safety of trastuzumab combined with docetaxel in patients with human epidermal growth factor receptor 2-positive metastatic breast cancer administered as first-line treatments: The M77001 Study Group. *J Clin Oncol* 2005;23:4265-4274.
18. Piccart-Gebhart MJ, Procter M, Leyland-Jones B, et al. Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med* 2005;353:1659-1672.
19. Romond EH, Perez EA, Bryant J, et al. Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med* 2005;353:1673-1684.
20. Bilous M et al. Current perspectives on HER2 Testing: A review of national testing guidelines. *Mod Pathol* 2003;173-182.
21. Wolff, AC, Hammond, MEH, Schwartz, JN, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Guideline Recommendations for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer. *Arch Pathol Lab Med* 2007;131:18-43.
22. Baloglu G, Haholu A, Kucukodaci Z, Yilmaz I, Yildirim S, Baloglu H. The effects of tissue fixation alternatives on DNA content: a study on normal colon tissue. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2008;16:485-492.
23. Middleton LP, et al. Implementation of American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists HER2 Guideline Recommendations in a tertiary care facility increases HER2 immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization concordance and decreases the number of inconclusive cases. *Arch Pathol Lab Med*. 2009;133:775-780.
24. Khoury T, Sait S, Hwang H, Chandrasekhar R, Wilding G, Tan D, Kulkarni S. Delay to formalin fixation effect on breast biomarkers. *Mod Pathol*. 2009;22:1457-1467.
25. Reinholz MM, et al. Breast cancer and aneusomy 17: Implications for carcinogenesis and therapeutic response. *Lancet Oncol*. 2009 Mar;10:267-277.
26. Sheehan DC, Hrapchak BB. *Theory and Practice of Histotechnology*, 2nd Edition. The C.V. Mosby Company, St. Louis, 1980.
27. Hofmann M, Stoss O, Shi D, et al. Assessment of a HER2 scoring system for gastric cancer: results from a validation study. *Histopathology*. 2008;52:797-805.

## PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE

INFORM, *ultraView*, BenchMark, VENTANA et le logo Ventana sont des marques commerciales de Roche.

Toutes les autres marques commerciales appartiennent à leurs propriétaires respectifs.

Ventana accorde à l'acquéreur une licence d'utilisation unique dans le cadre des brevets américains numéros 6045759, 6192945, 6416713, 6945128 et 7378058 et leurs contreparties étrangères éventuelles.

## CONTACTS



Roche Diagnostics GmbH  
Sandhofer Strasse 116  
D-68305 Mannheim  
Germany



[www.ventanamed.com](http://www.ventanamed.com)

### Annexe A : feuille d'évaluation de l'interprétation des résultats

20 noyaux doivent être comptés. Si le rapport HER2/Chr17 est compris entre 1,8 - 2,2 : 20 noyaux supplémentaires doivent être comptés.							
<b>Zone cible 1</b>				<b>Zone cible 2 pour un rapport 1.8 ≤ HER2/Chr 17 ≤ 2.2</b>			
<input type="checkbox"/> Présence d'hétérogénéité ? (cocher si c'est le cas)				<input type="checkbox"/> Présence d'hétérogénéité ? (cocher si c'est le cas)			
Cellule	Nombre de signaux HER2	Cellule	Nombre de signaux Chr17	Cellule	Nombre de signaux HER2	Cellule	Nombre de signaux Chr17
1		1		1		1	
2		2		2		2	
3		3		3		3	
4		4		4		4	
5		5		5		5	
6		6		6		6	
7		7		7		7	
8		8		8		8	
9		9		9		9	
10		10		10		10	
11		11		11		11	
12		12		12		12	
13		13		13		13	
14		14		14		14	
15		15		15		15	
16		16		16		16	
17		17		17		17	
18		18		18		18	
19		19		19		19	
20		20		20		20	
<input type="checkbox"/> Présence d'agrégats ? (cocher si c'est le cas)		<input type="checkbox"/> Présence d'agrégats ? (cocher si c'est le cas)		<input type="checkbox"/> Présence d'agrégats ? (cocher si c'est le cas)		<input type="checkbox"/> Présence d'agrégats ? (cocher si c'est le cas)	
Nombre total de signaux HER2 dans la zone cible 1		Nombre total de signaux Chr17 dans la zone cible 1		Nombre total de signaux HER2 dans la zone cible 2		Nombre total de signaux Chr17 dans la zone cible 2	
a		b		d		e	
Rapport HER2/Chr17 de la zone cible 1				Rapport HER2/Chr17 des zones cibles 1 et 2			
$c = a/b$				$f = (a+d)/(b+e)$			
<input type="checkbox"/> Non amplifié : HER2/Chr17 < 2,0				<input type="checkbox"/> Non amplifié : HER2/Chr17 < 2,0			
<input type="checkbox"/> Amplifié : HER2/Chr17 ≥ 2,0				<input type="checkbox"/> Amplifié : HER2/Chr17 ≥ 2,0			