Centre Jean PERRIN
unicancer Clermont Auvergne Métropole

Les techniques d'Hybridation In Situ (HIS) comme outil pour évaluer des biomarqueurs théranostiques en Anatomie et Cytologie Pathologique

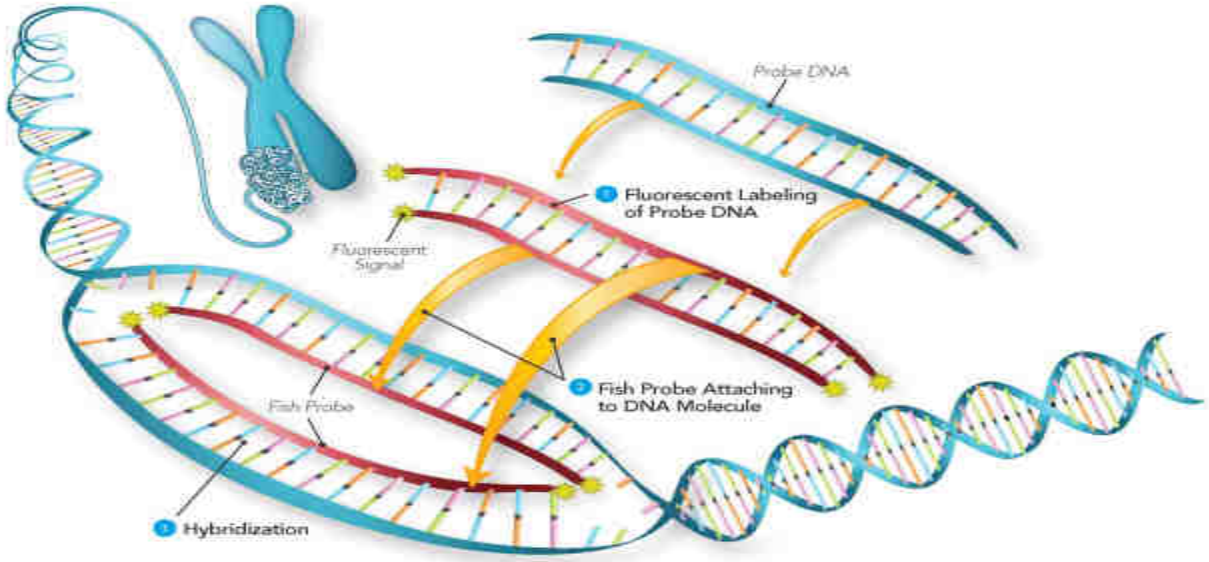
Anne Cayre Ingénieur, PhD

Techniques d'Hybridation In Situ

- Ces techniques arrivent dans les labos d'ACP dans les années 2000 pour la détection de l'amplification du gène *ERBB2* dans le cancer du sein
- Elles sont réalisées sur noyaux interphasiques donc applicables à une très grande variété de spécimens : cytologie, appositions, biopsies, pièces opératoires le plus souvent incluses en paraffine

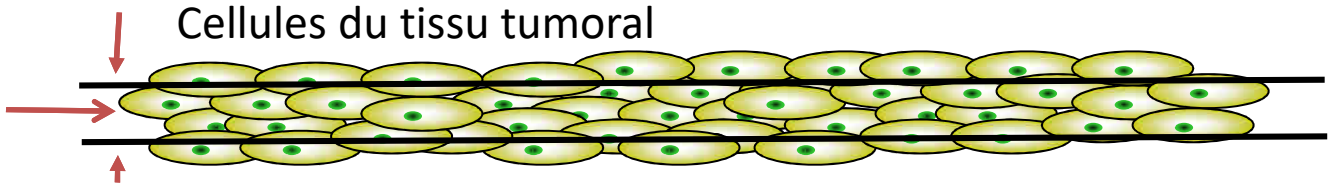
Techniques d'Hybridation In Situ

Utilisation de **sondes** d'ADN spécifiques la plupart du temps double brin, pour détecter des anomalies au niveau de séquences d'ADN **cibles**



Technique d'HIS_Préparation des lames J1

- Coupes à 4 µm



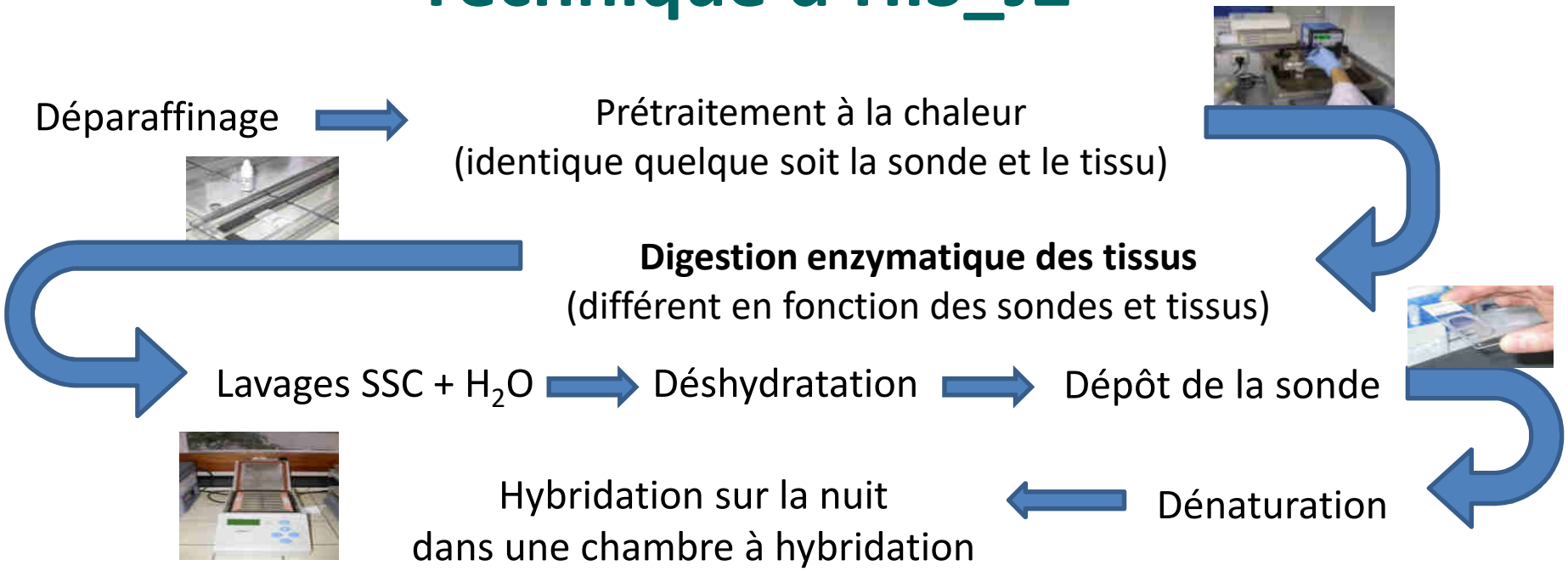
- Étalement sur lames silanisées

- Séchage des lames 1 nuit à 37°C ou minimum 1h à 56°C

Technique d'HIS_Prétraitement

- **Sondes de 40 à 300Kb**
  → Nécessité d'un prétraitement à la chaleur et d'une digestion enzymatique pour leur faire traverser les membranes cytoplasmiques et nucléaires

Technique d'HIS_J2



Technique d'HIS_J3

- Lavage stringeant

FISH (Fluorescence)

- déshydratation
- Séchage à l'obscurité
- Montage DAPI
- Lecture au microscope à fluorescence
- Prise d'images
- Conservation des lames à -20°C

DDISH

Dual color, Dual hapten

- Procédure d'immunodétection
- déshydratation
- Montage
- Lecture au microscope à fond clair
- Conservation des lames à température ambiante

– En parallèle les techniciens commencent une nouvelle technique de FISH (4/semaine)

Application à la détection d'une amplification du gène *ERBB2* dans le cancer du sein

Sont testés tous les cas montrant un score 2+ en IHC

Application à la détection d'une amplification du gène *ERBB2* dans le cancer du sein

Nouvelles recommandations Juillet 2018

VOLUME 36 · NUMBER 20 · JULY 10, 2018

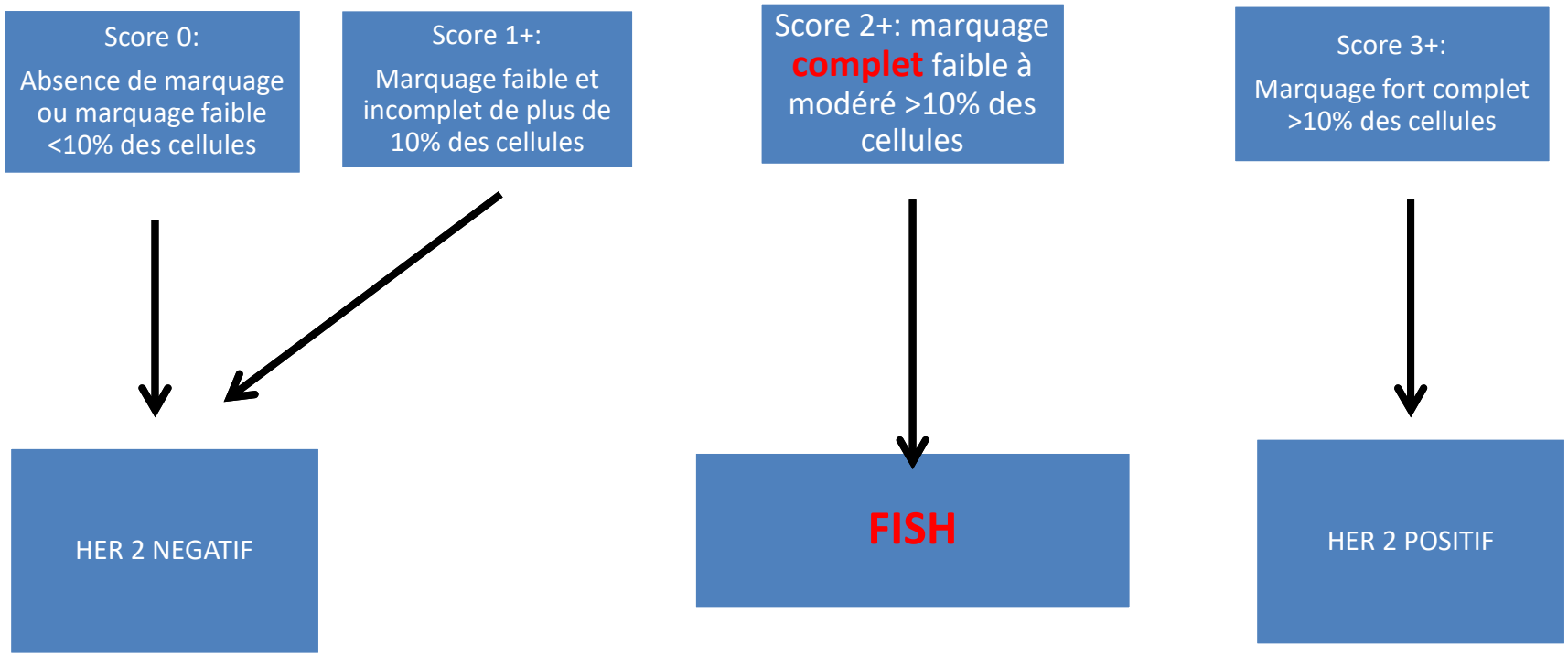
JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY

ASCO SPECIAL ARTICLE

Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Clinical Practice Guideline Focused Update

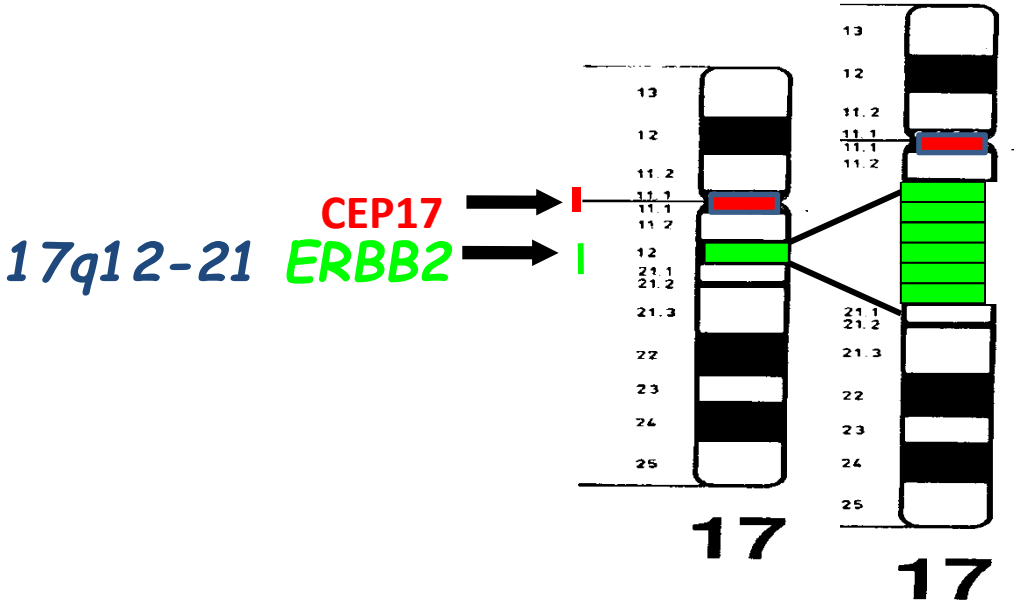
Antonio C. Wolff, M. Elizabeth Hale Hammond, Kimberly H. Allison, Brittany E. Harvey, Pamela B. Mangu, John M.S. Bartlett, Michael Bilous, Ian O. Ellis, Patrick Fitzgibbons, Wedad Hanna, Robert B. Jenkins, Michael F. Press, Patricia A. Spears, Gail H. Vance, Giuseppe Viale, Lisa M. McShane, and Mitchell Dowsett

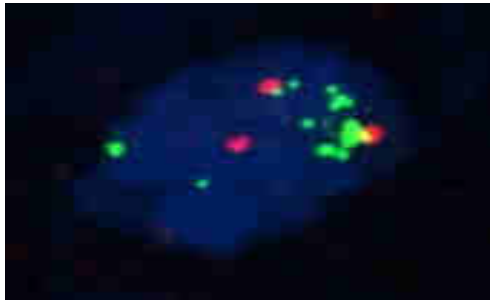
Application à la détection d'une amplification du gène *ERBB2* dans le cancer du sein



Application à la détection d'une amplification du gène *ERBB2* dans le cancer du sein

Utilisation de sondes de numération





Application à la détection d'une amplification du gène *ERBB2* dans le cancer du sein

- Regarder la lame HPS et IHC avec un médecin pour cibler les zones à compter
- Si la lame est hétérogène, cibler les zones où il y a du marquage
- Evaluer la qualité de la technique
  - Aspect des noyaux au DAPI
    - Ne doivent pas être troués (trop digérés)
  - Vérifier qu'il n'y a pas trop de bruit de fond sur les noyaux et entre-eux (sous-digestion)
  - Les signaux fluorescents doivent être présent dans 75% des cellules
- Ne pas compter les signaux dans des noyaux superposés

Application à la détection d'une amplification du gène *ERBB2* dans le cancer du sein

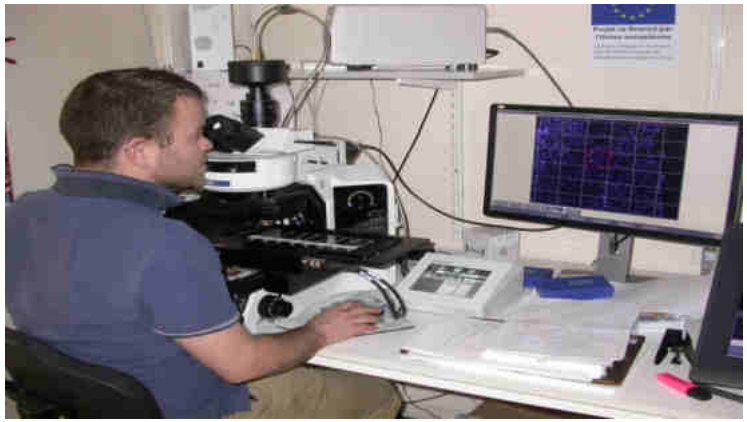
- <u>Lecture directe:</u>
- Repérer une zone de carcinome invasif à l'objectif X10
- Passer à l'objectif X60 ou X100 à immersion
- Compter les signaux du gène et du centromère dans 40 noyaux dans diverses zones de la lame

Application à la détection d'une amplification du gène *ERBB2* dans le cancer du sein

- <u>Lecture directe:</u>
- Faire la moyenne des signaux *ERBB2*
- Faire la moyenne des signaux CEP17
- Faire le ratio nb de copies *ERBB2/* nb de copies CEP17
- Appliquer les recommandations en vigueur pour conclure sur le statut du gène ERBB2

Application à la détection d'une amplification du gène *ERBB2* dans le cancer du sein

- <u>Lecture avec le scanner de lame Bioview:</u>
- Dépôt de 8 lames sur la platine
- Sélection des zones à scanner à l'objectif X10 (30 min)
- Scan des lames à l'objectif X60 à immersion
- Durée du scan environ 1h

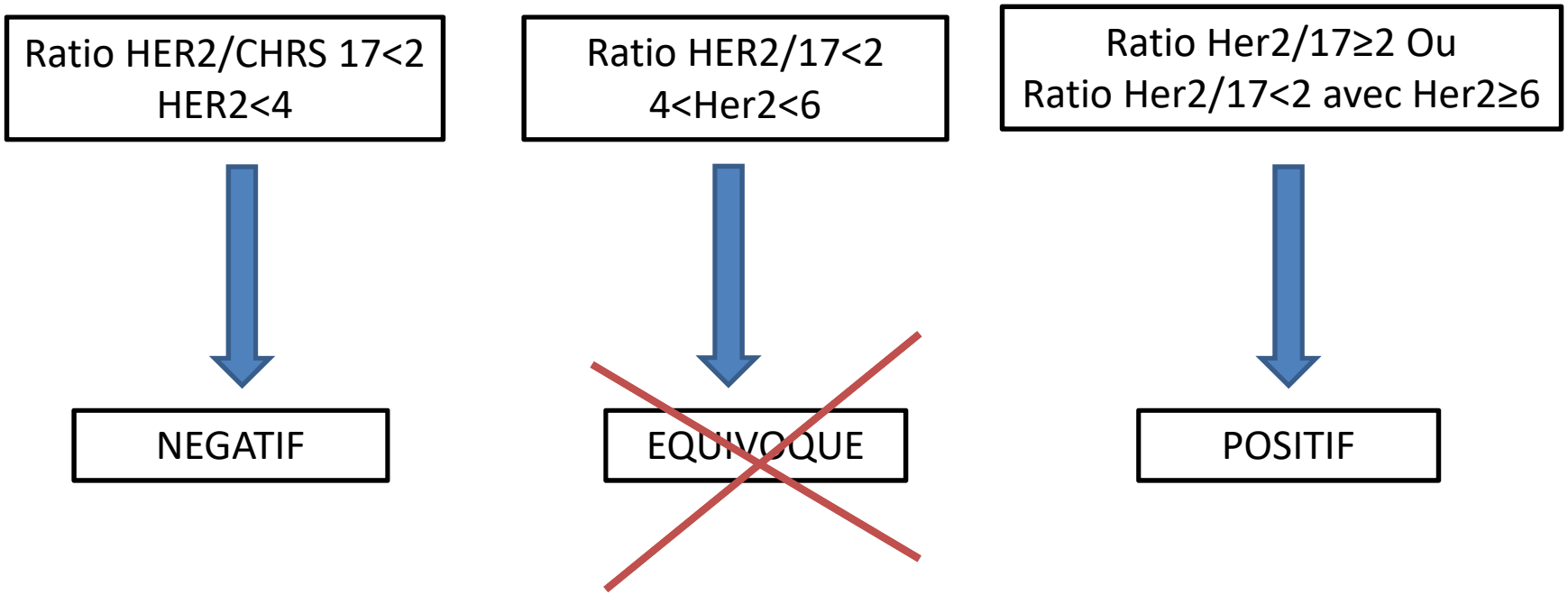


Application à la détection d'une amplification du gène *ERBB2* dans le cancer du sein

- Dés que la première lame est scannée on peut l'analyser sur une station déportée avec logiciel d'aide au comptage et à l'interprétation
- Les images sont conservées et des CRs d'interprétation sont générés

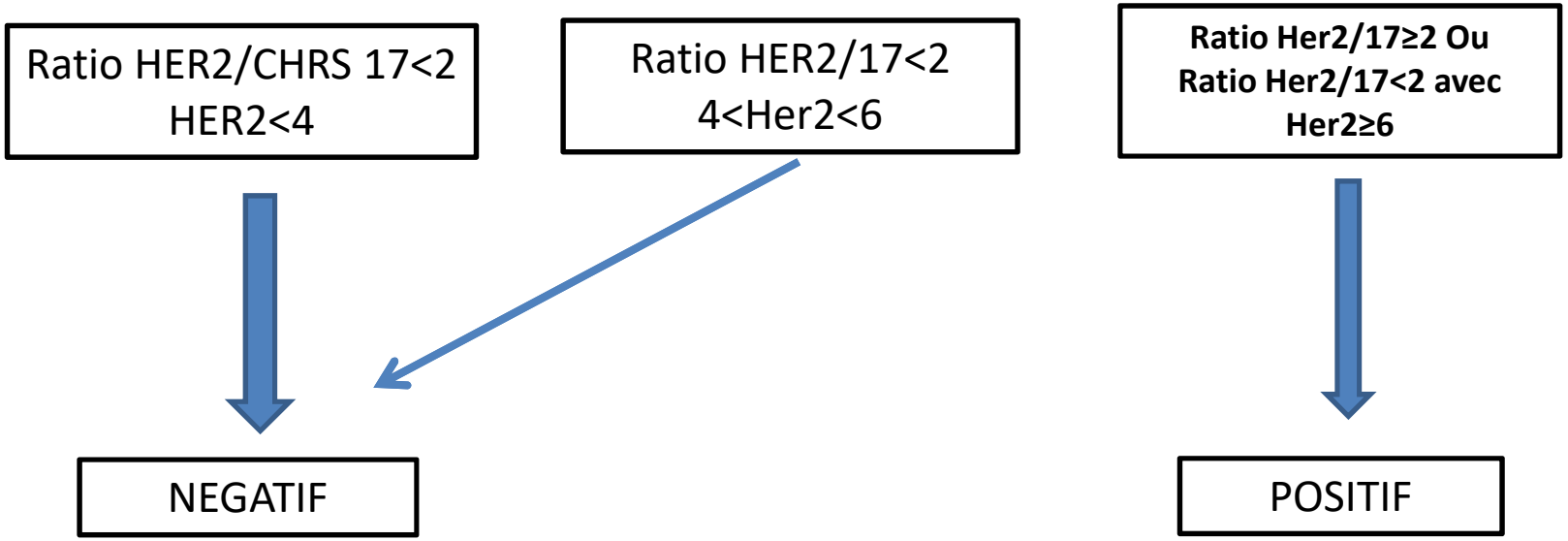
Application à la détection d'une amplification du gène *ERBB2* dans le cancer du sein

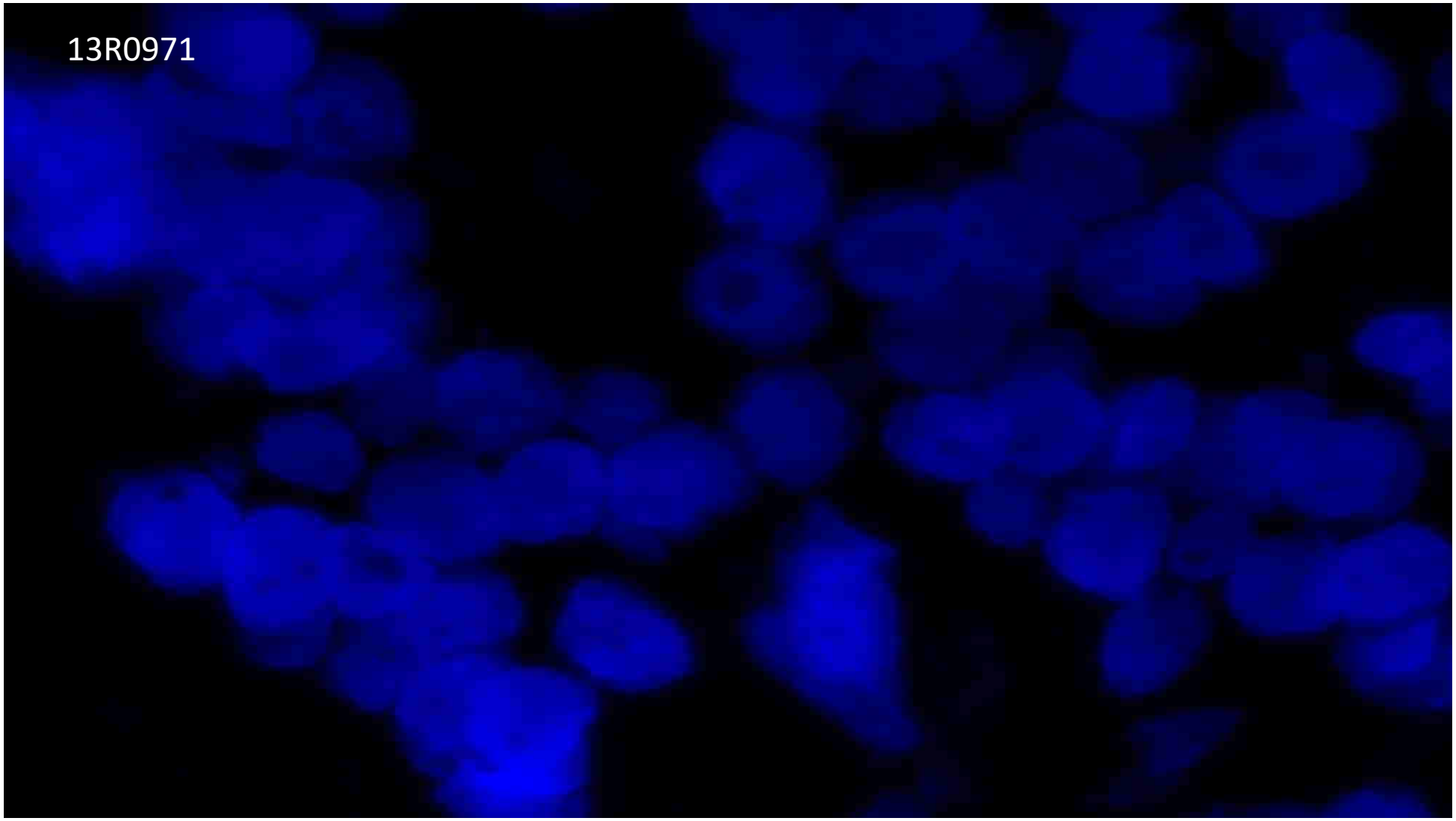
Nouvelles recommandations Juillet 2018

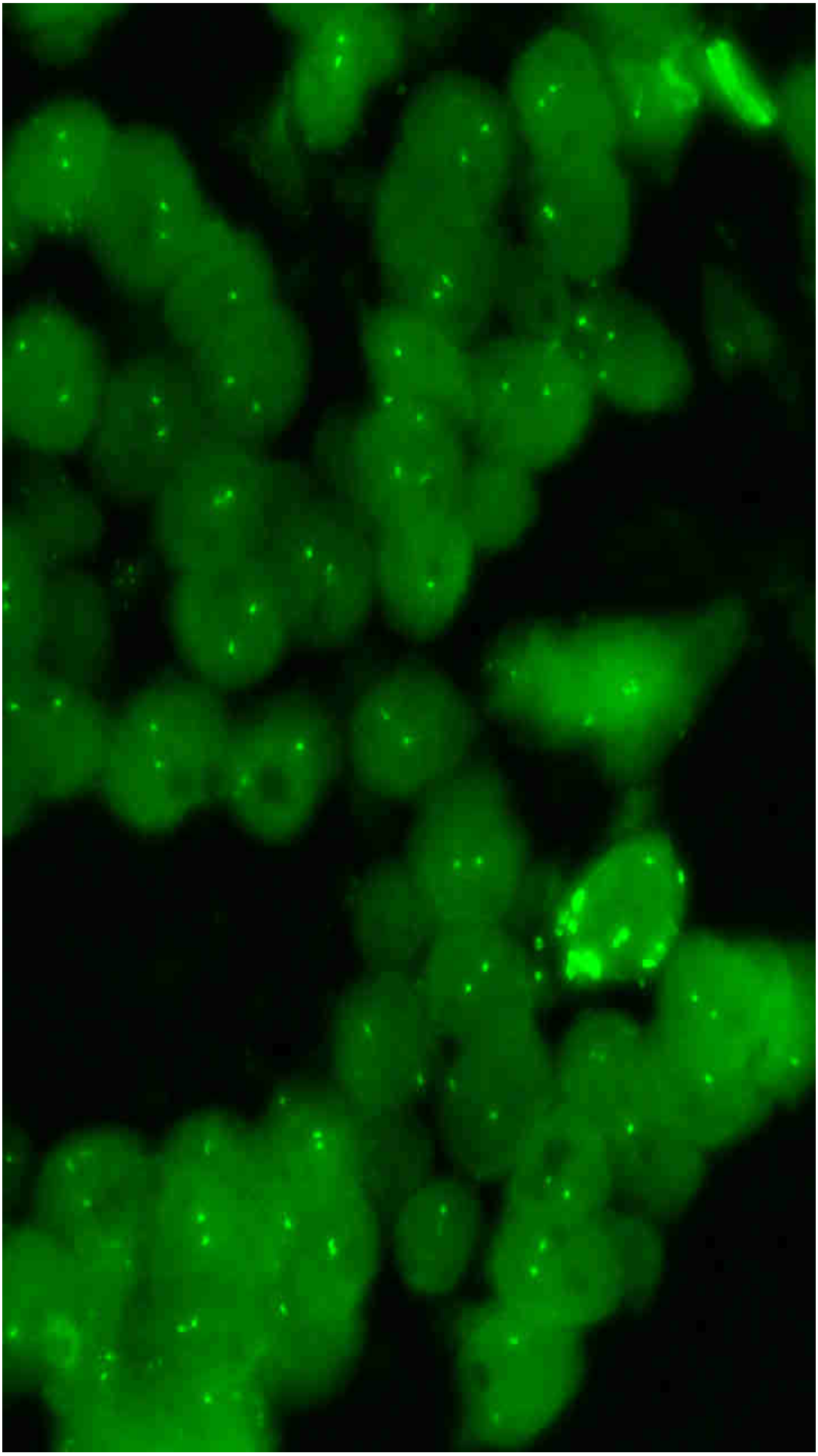


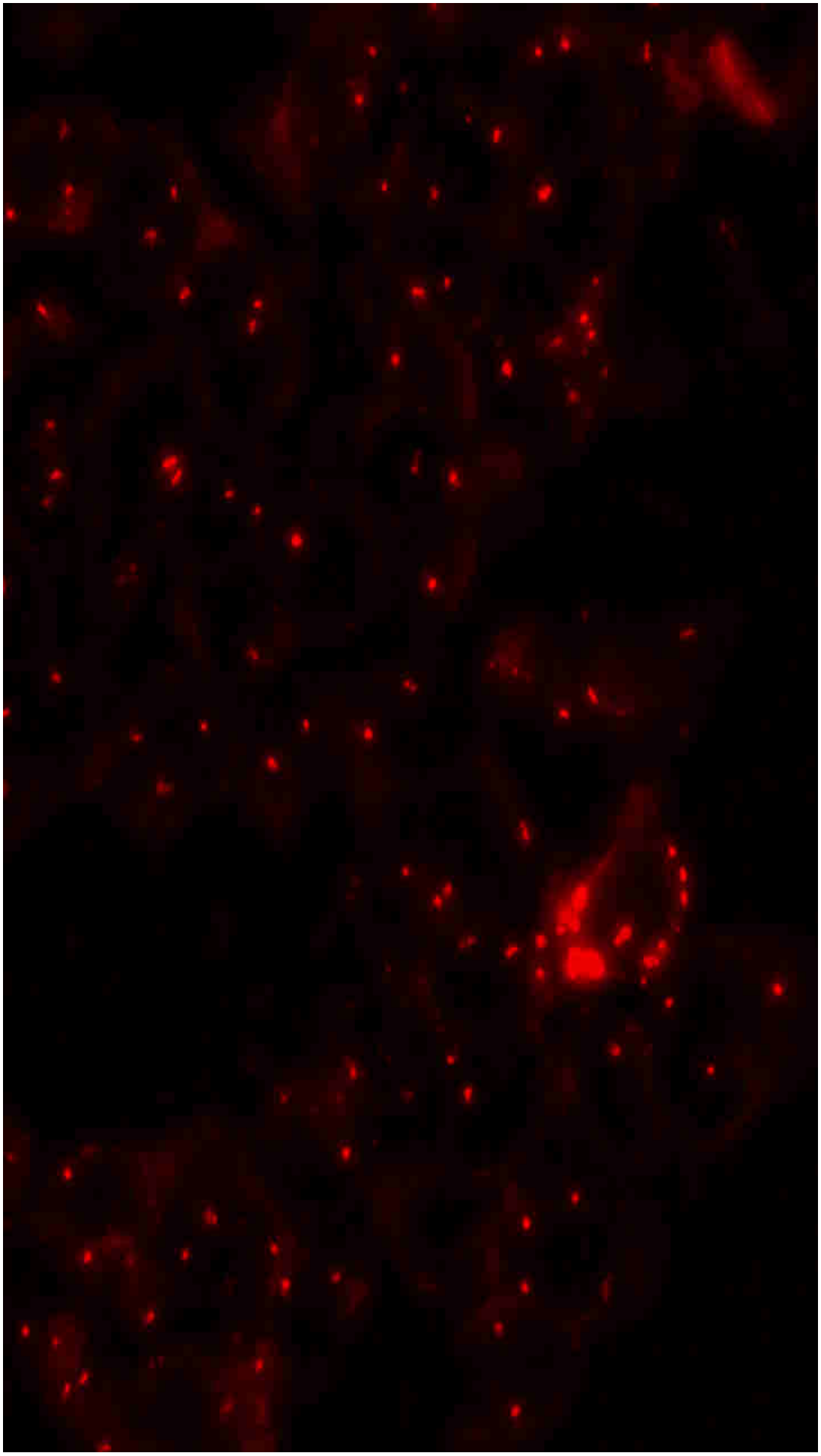
Application à la détection d'une amplification du gène *ERBB2* dans le cancer du sein

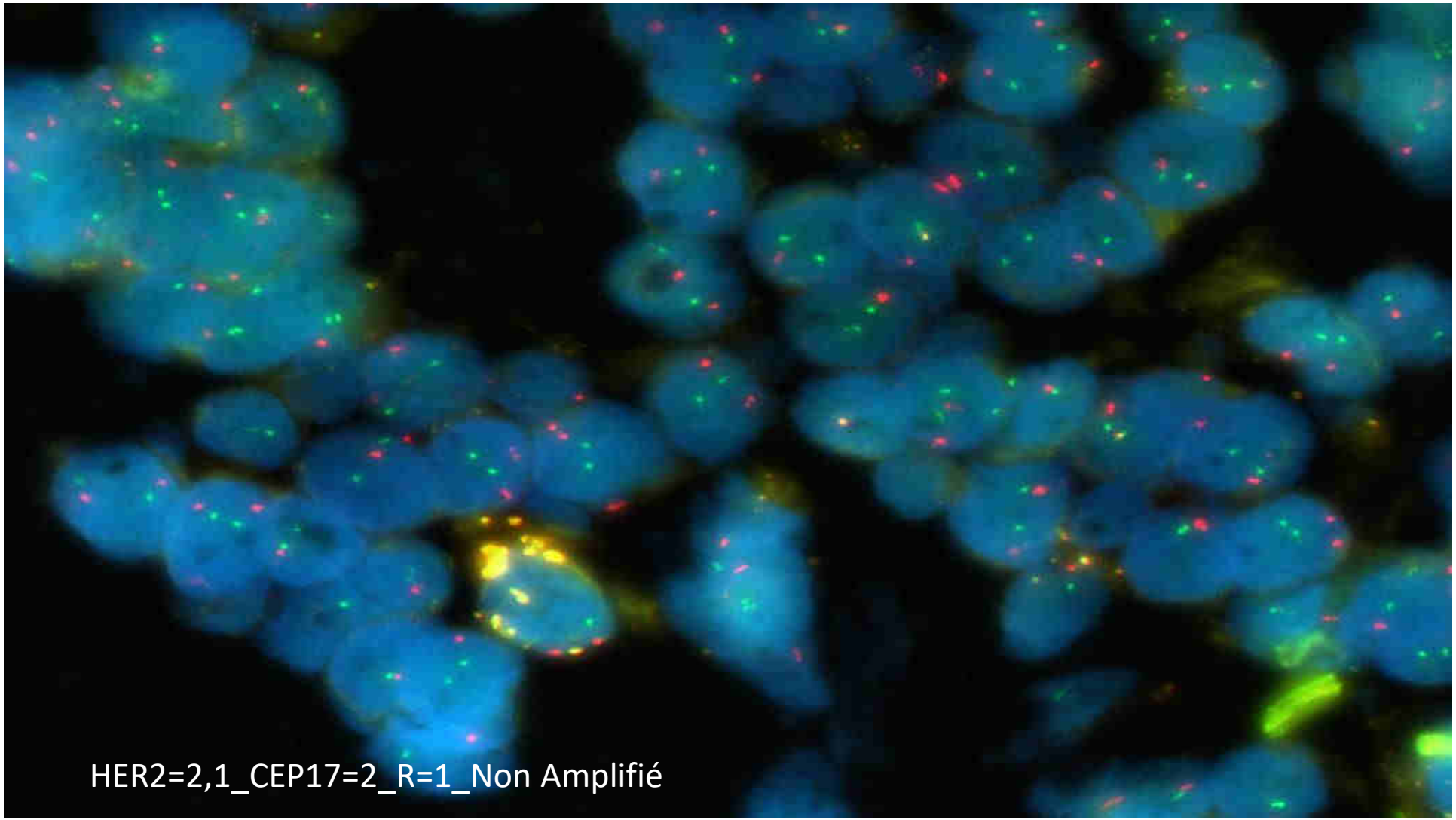
Nouvelles recommandations Juillet 2018

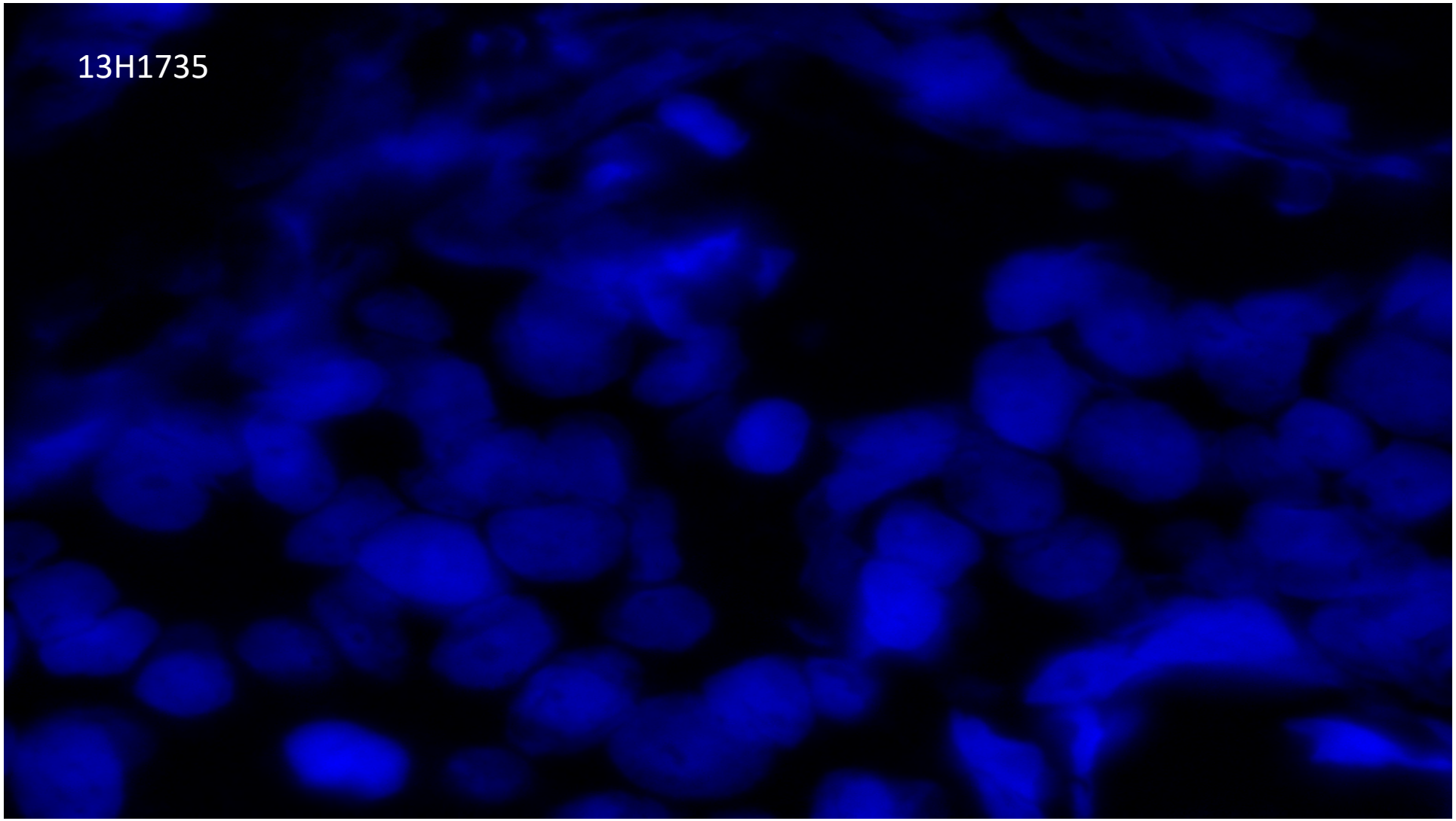


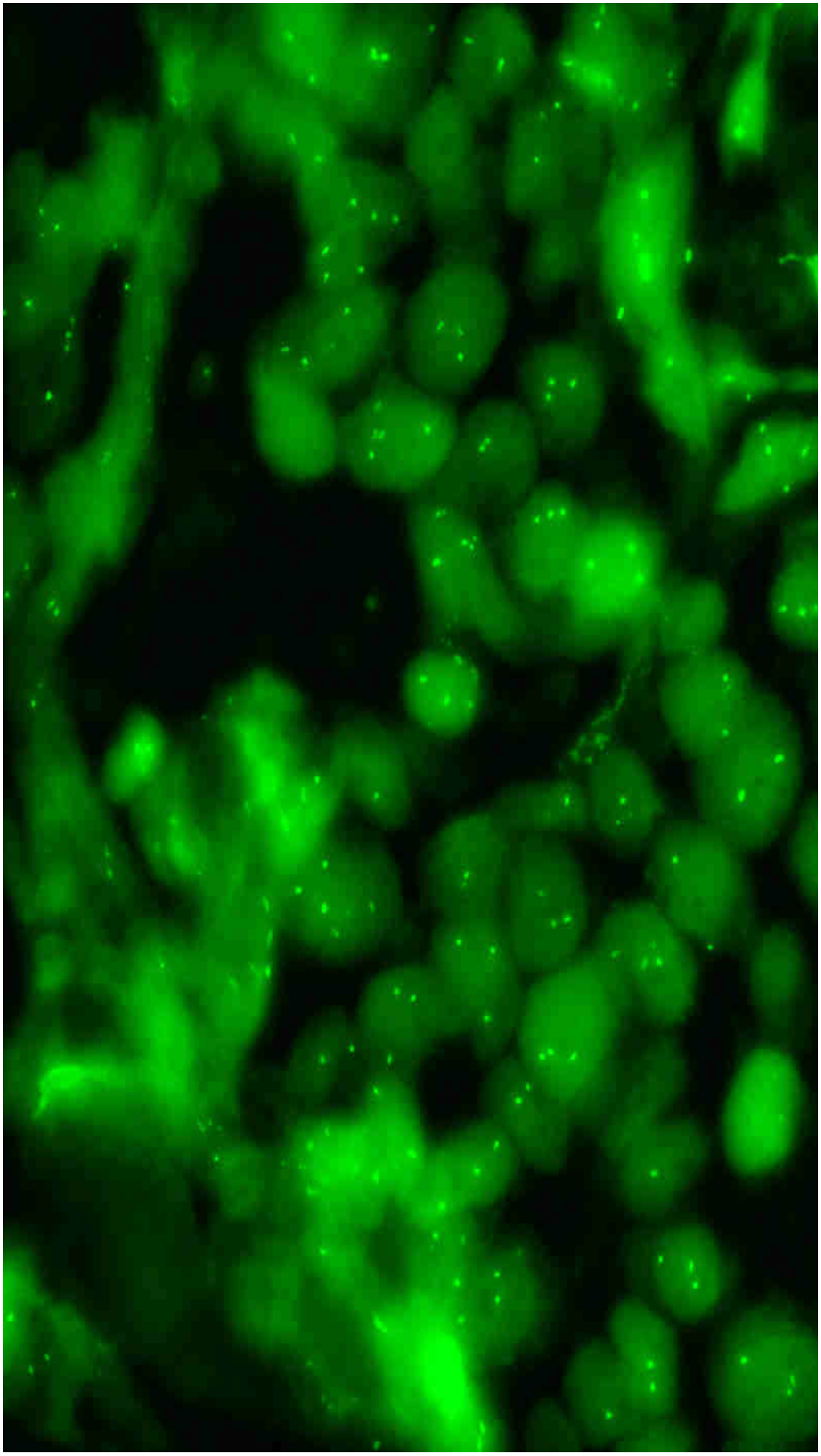

13R0971

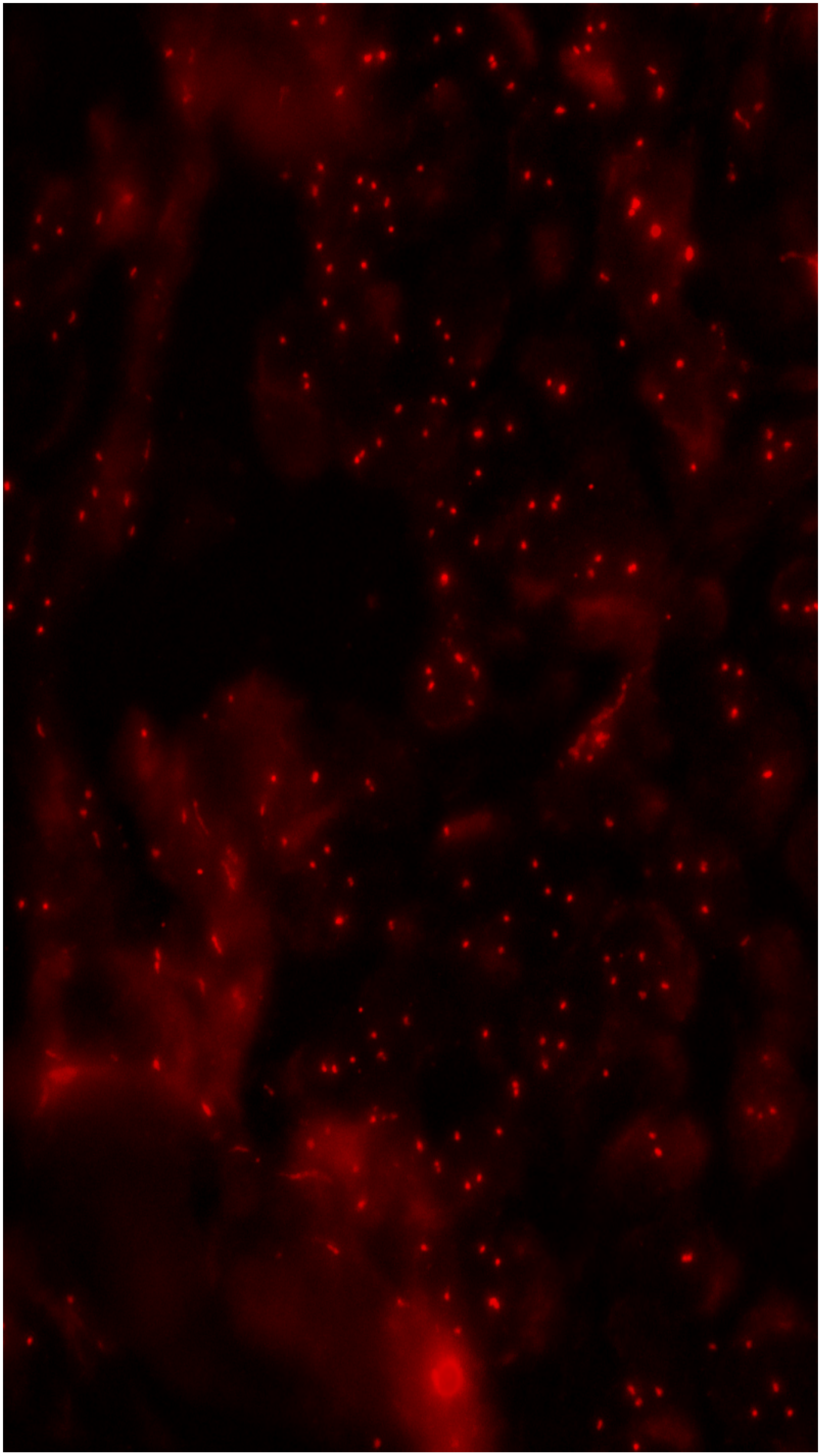


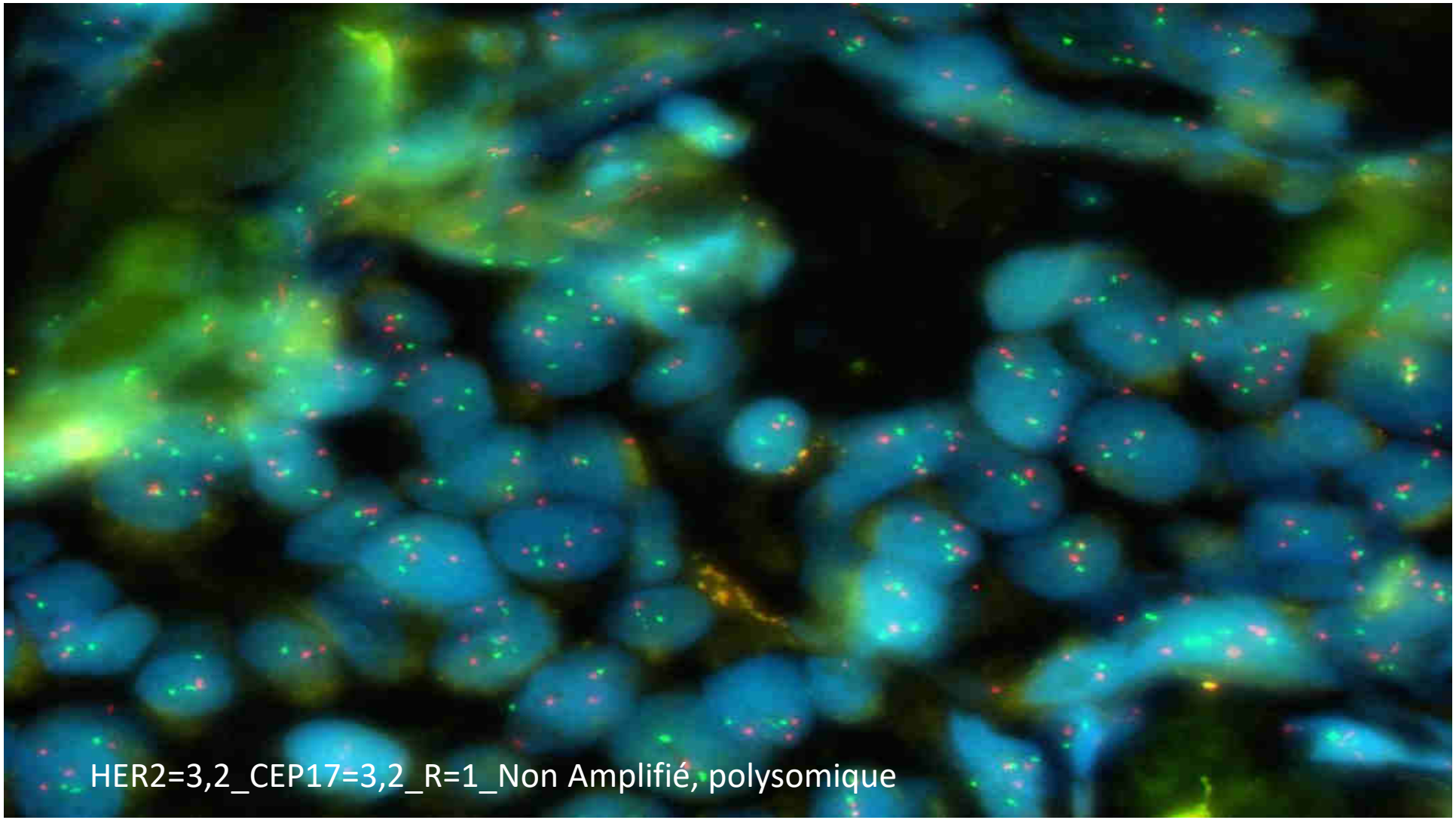


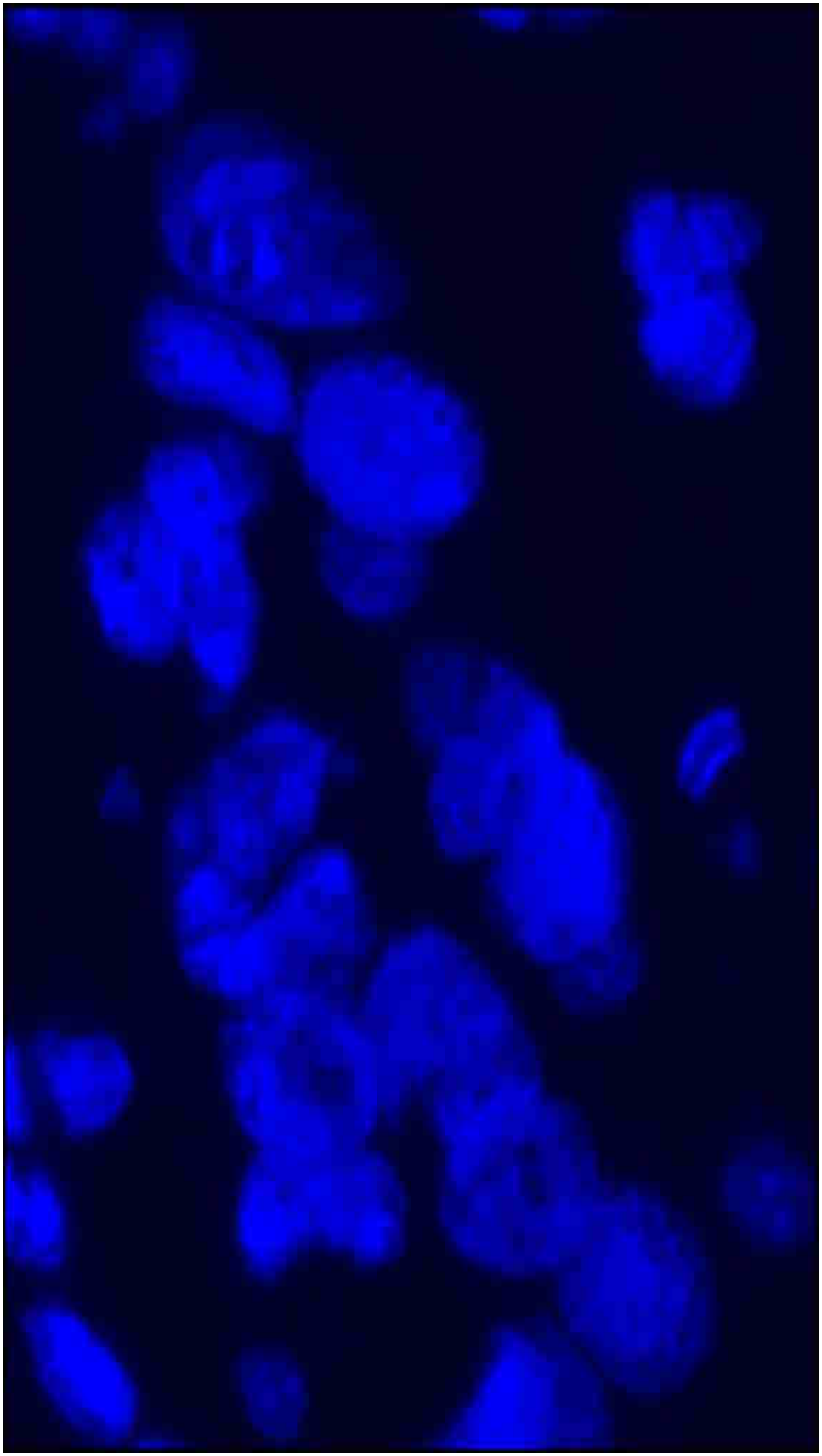

HER2=2,1_CEP17=2_R=1_Non Amplifié

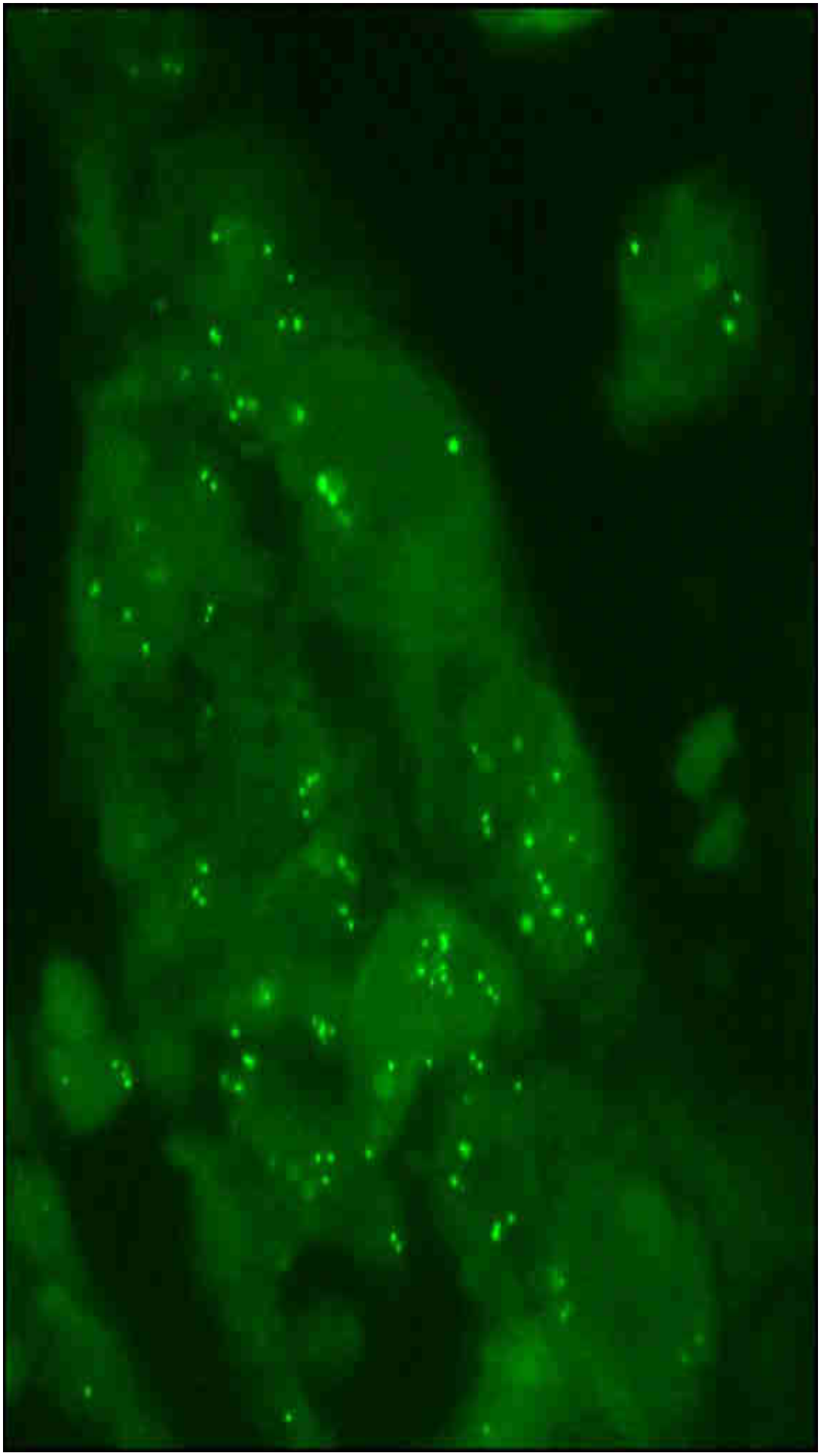

13H1735

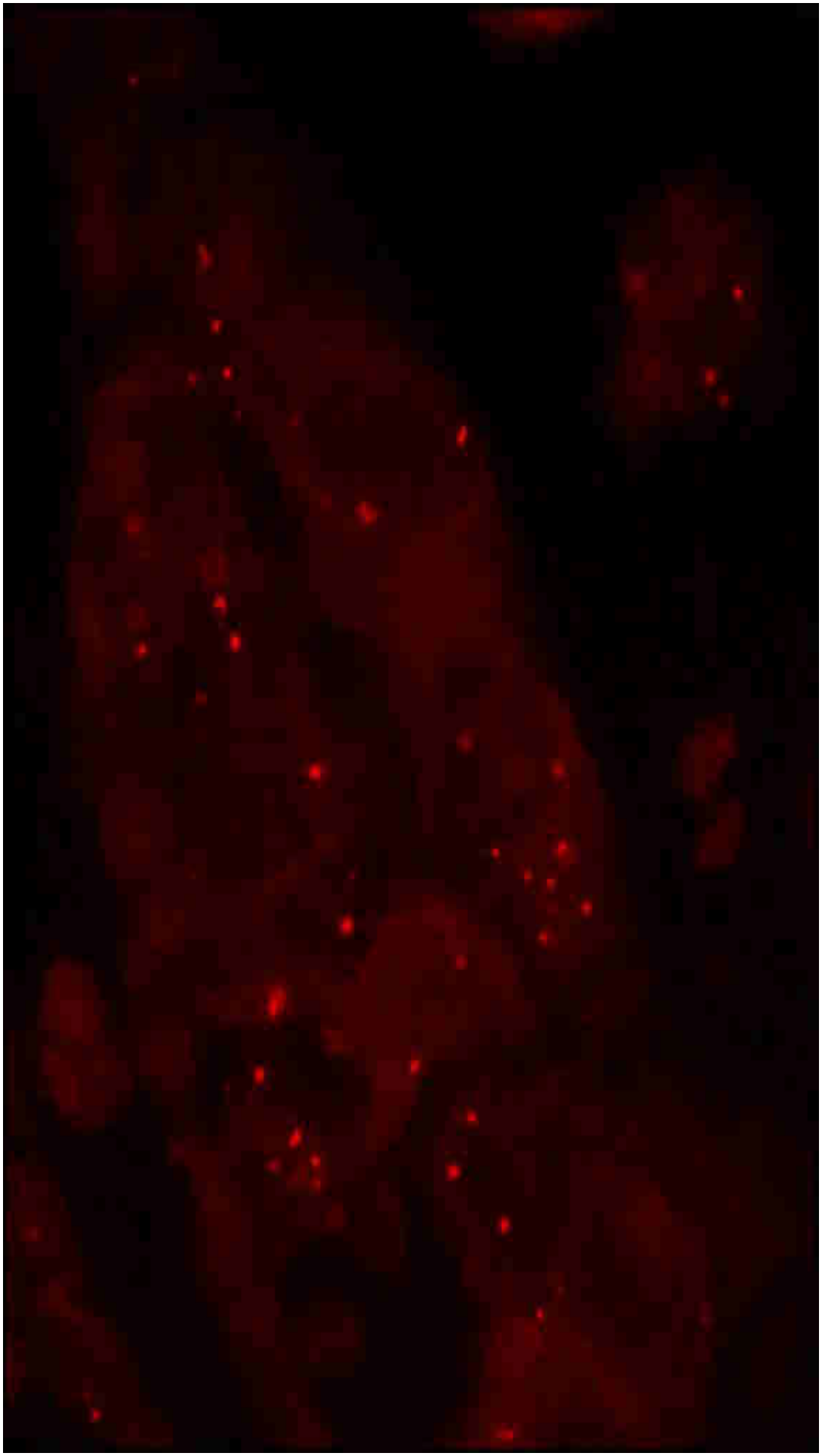


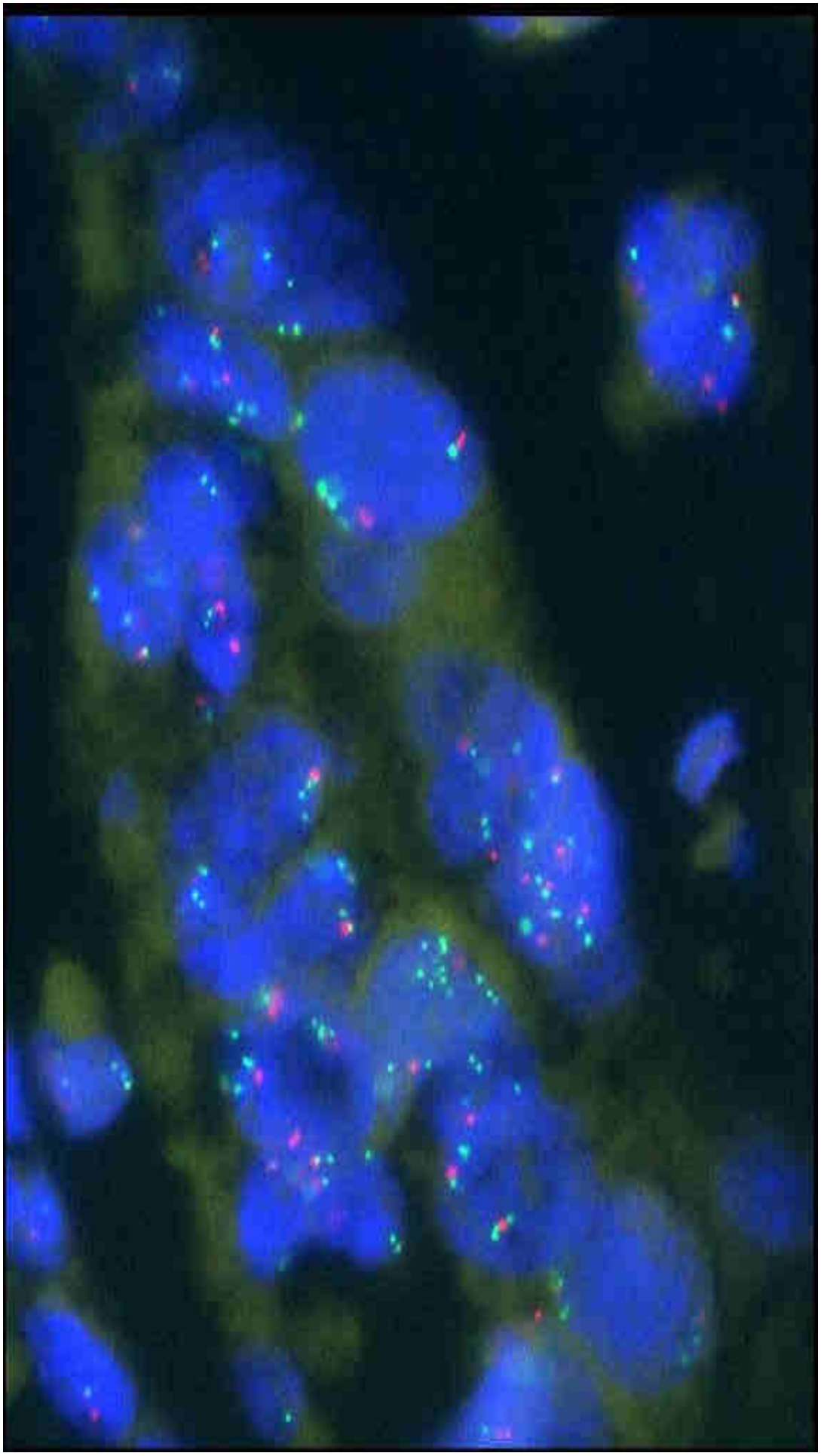


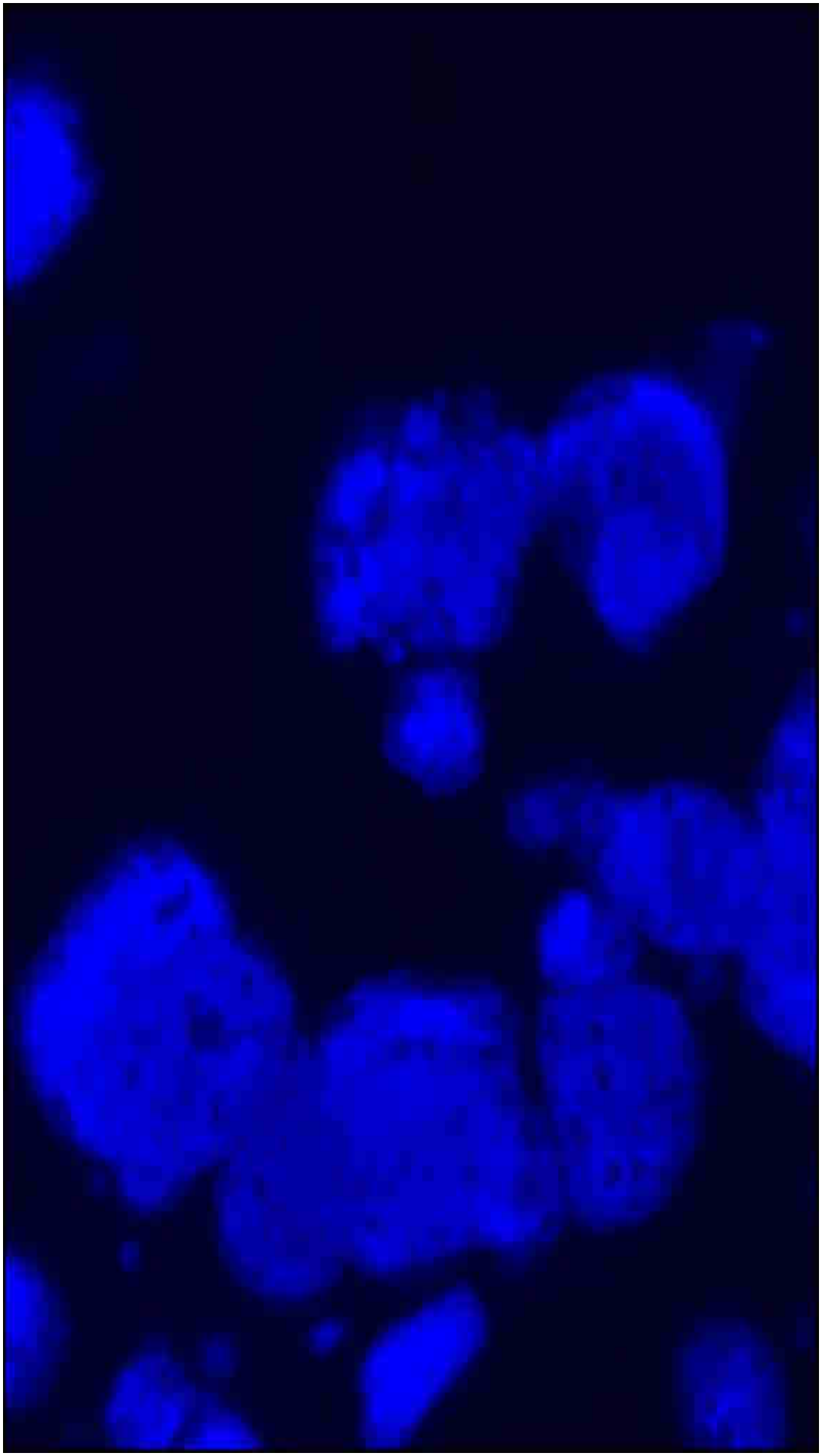

HER2=3,2_CEP17=3,2_R=1_Non Amplifié, polysomique

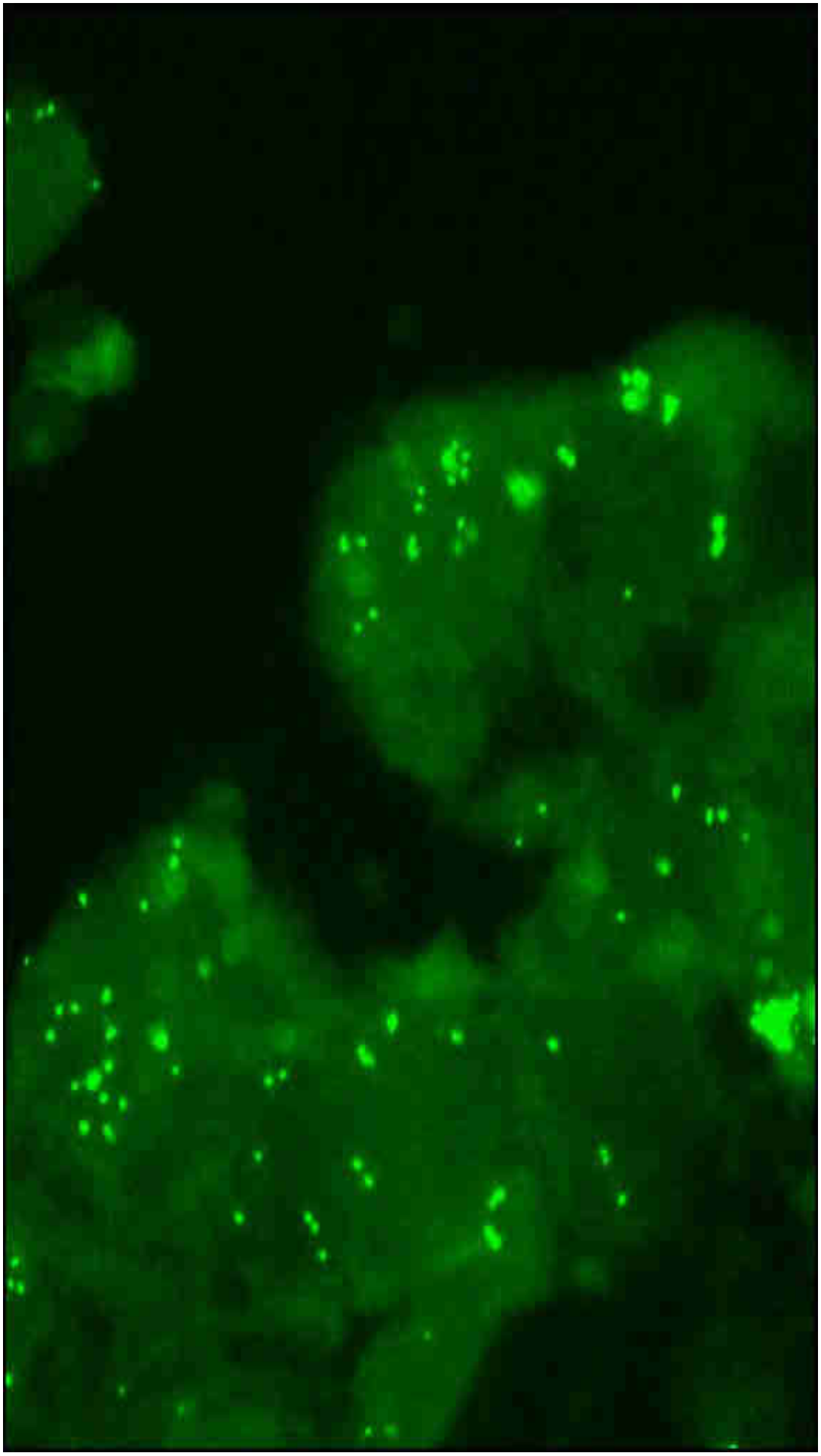


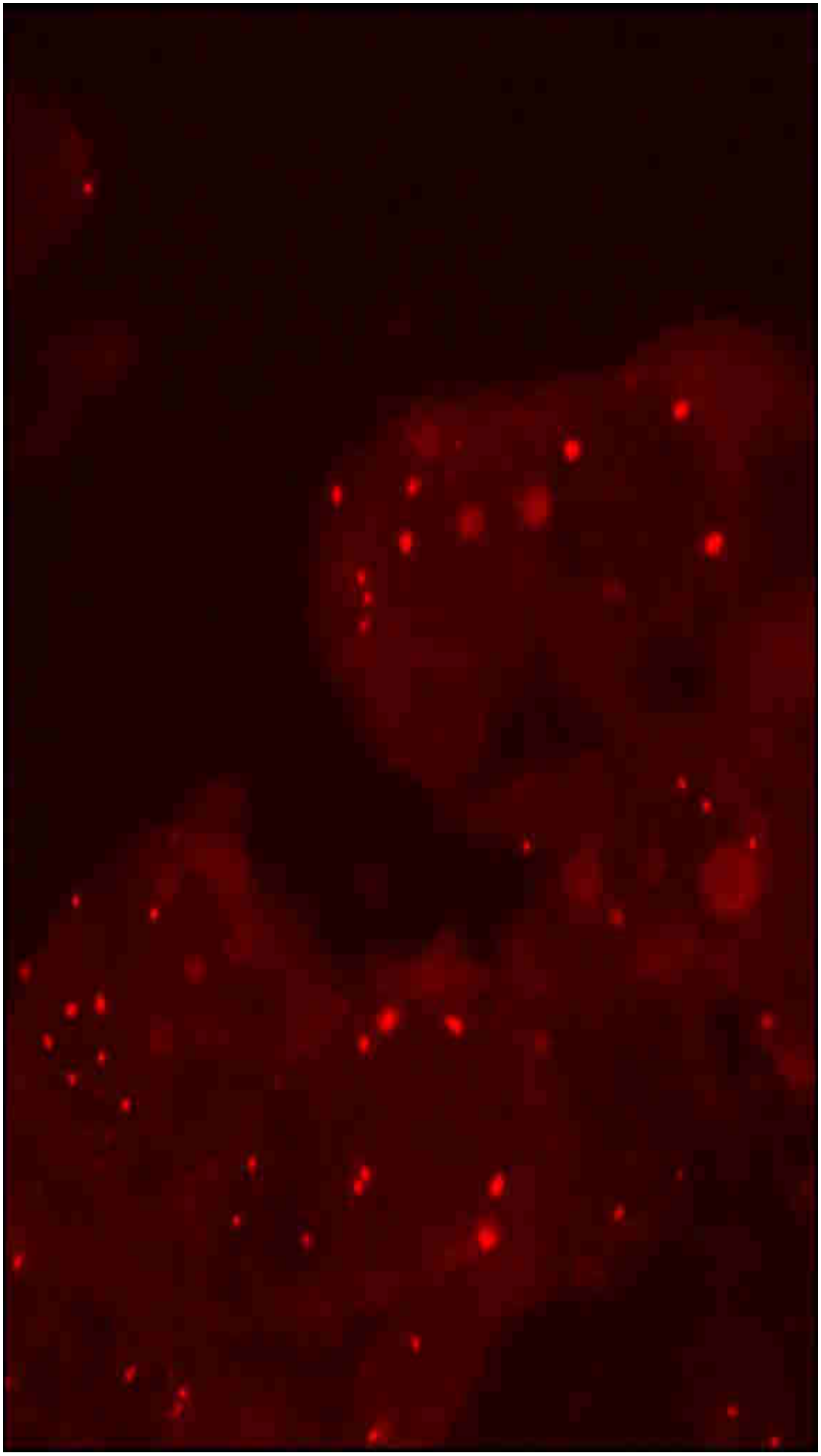


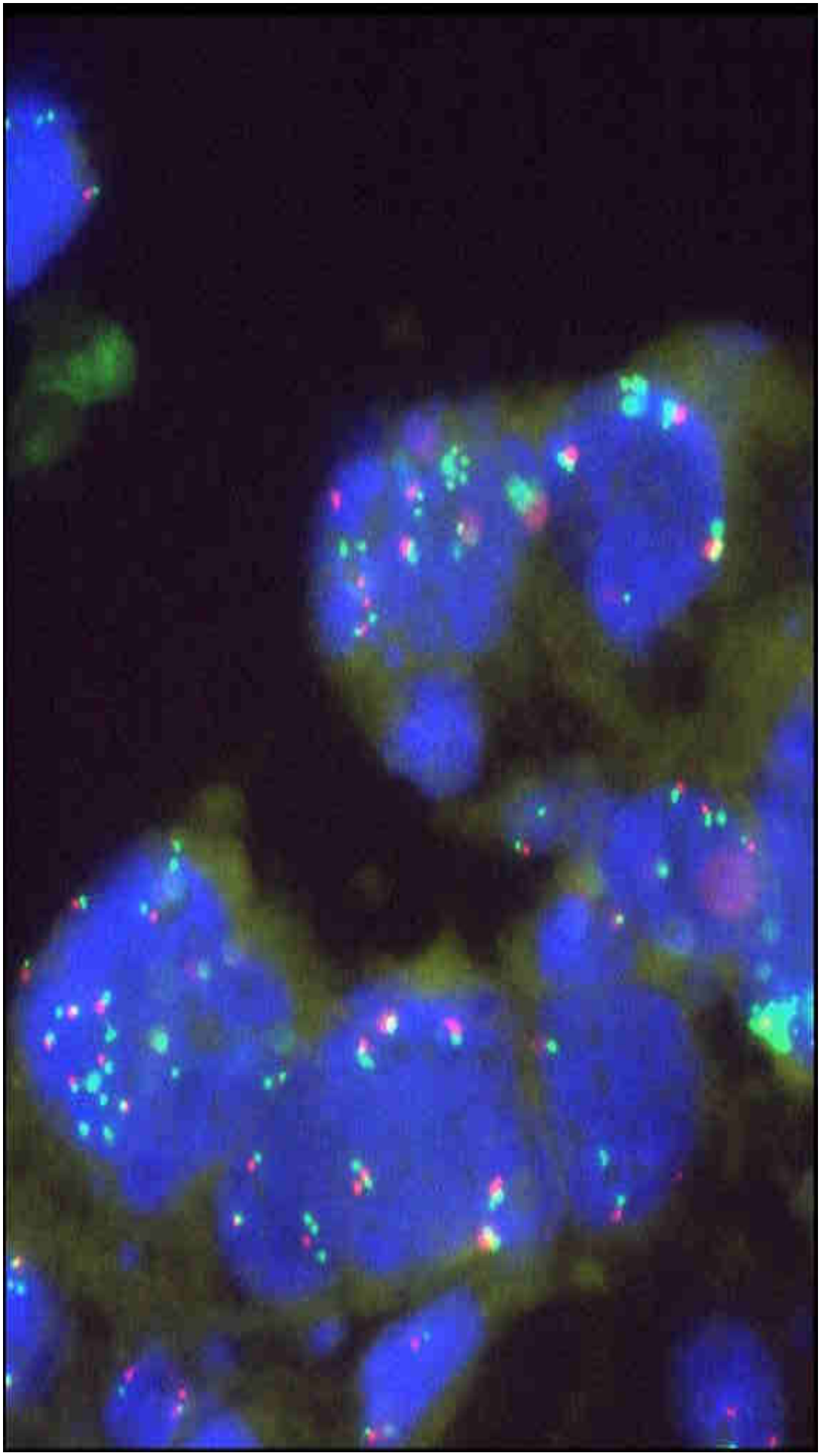


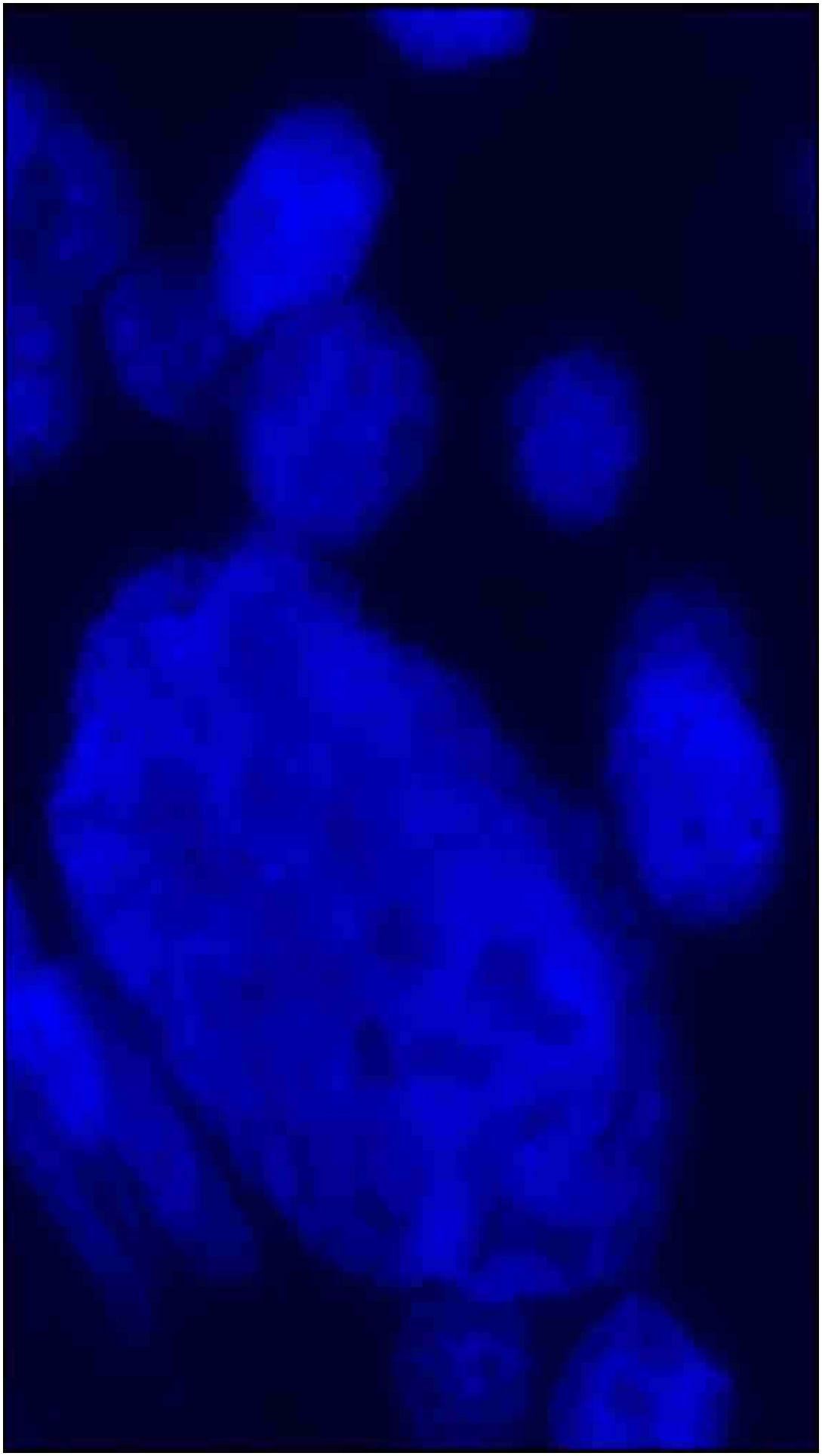


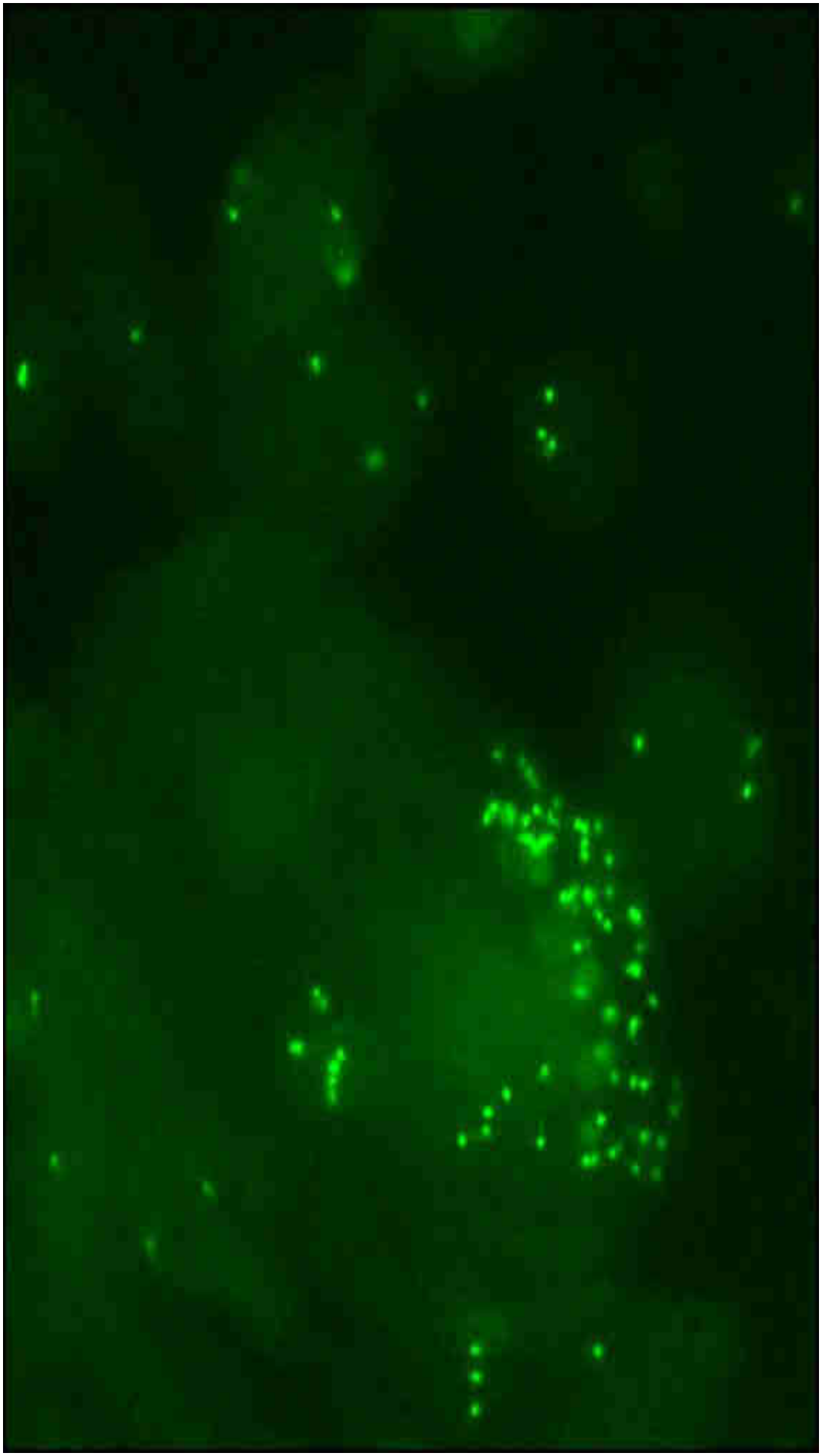


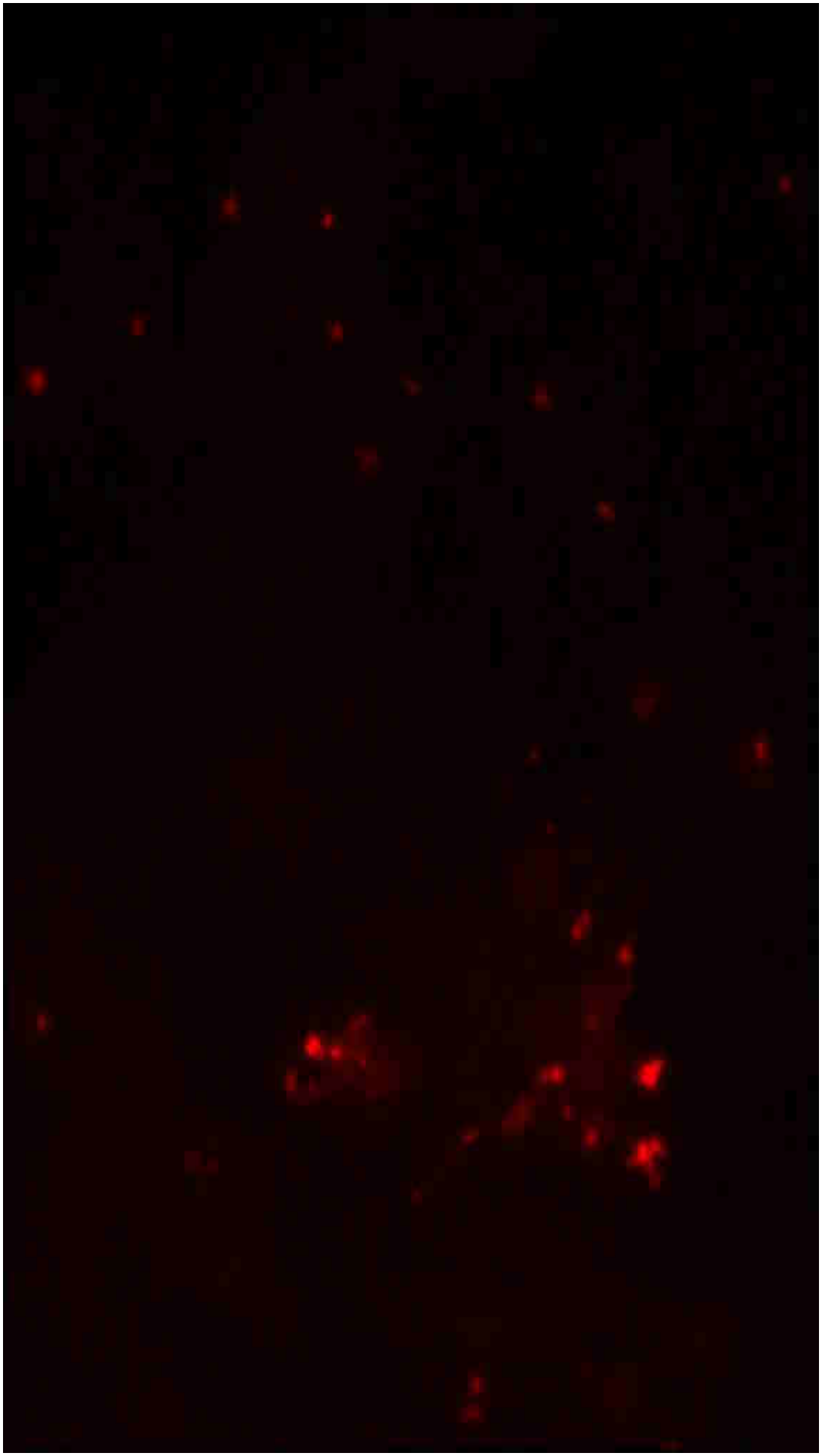


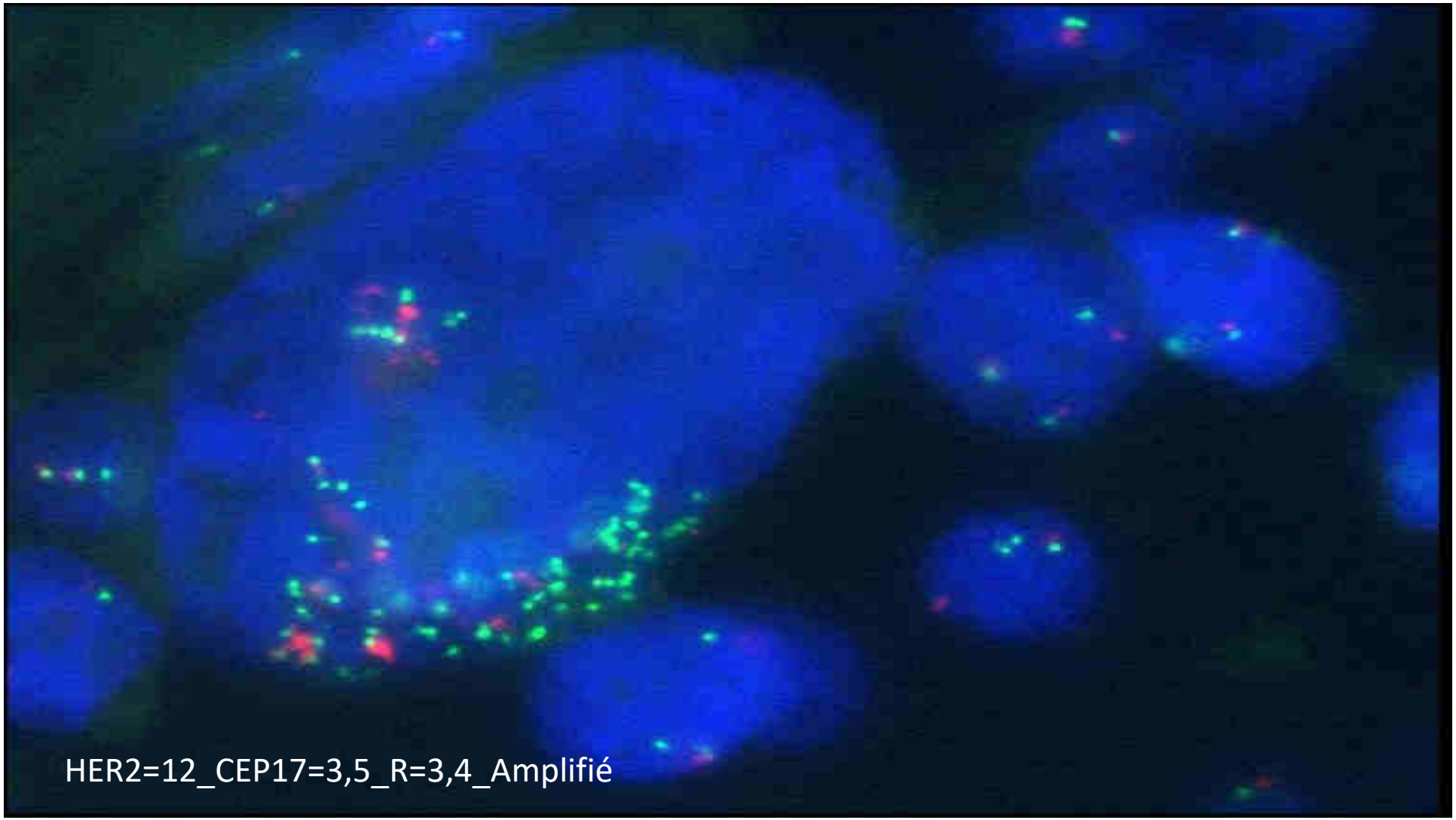


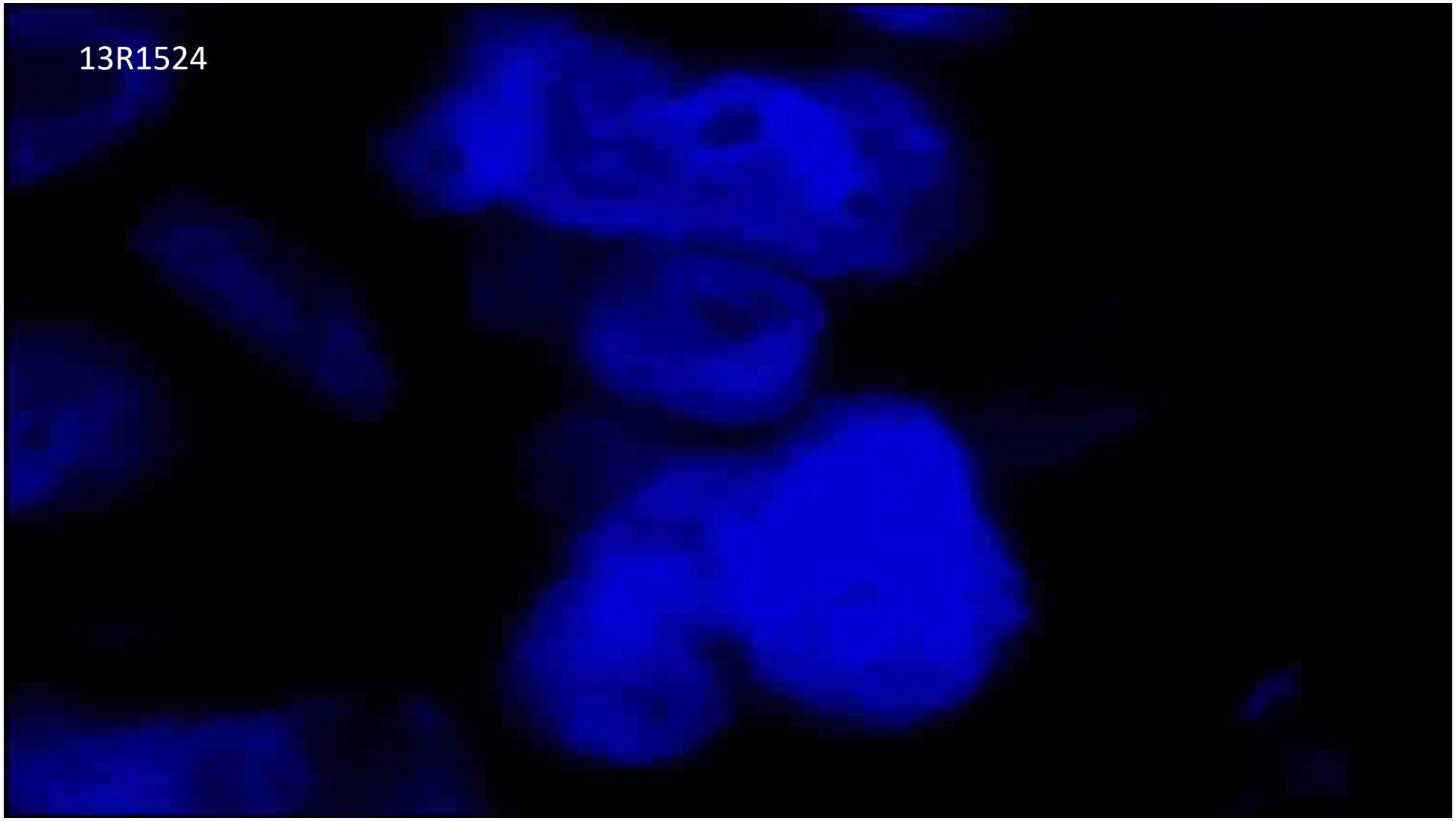


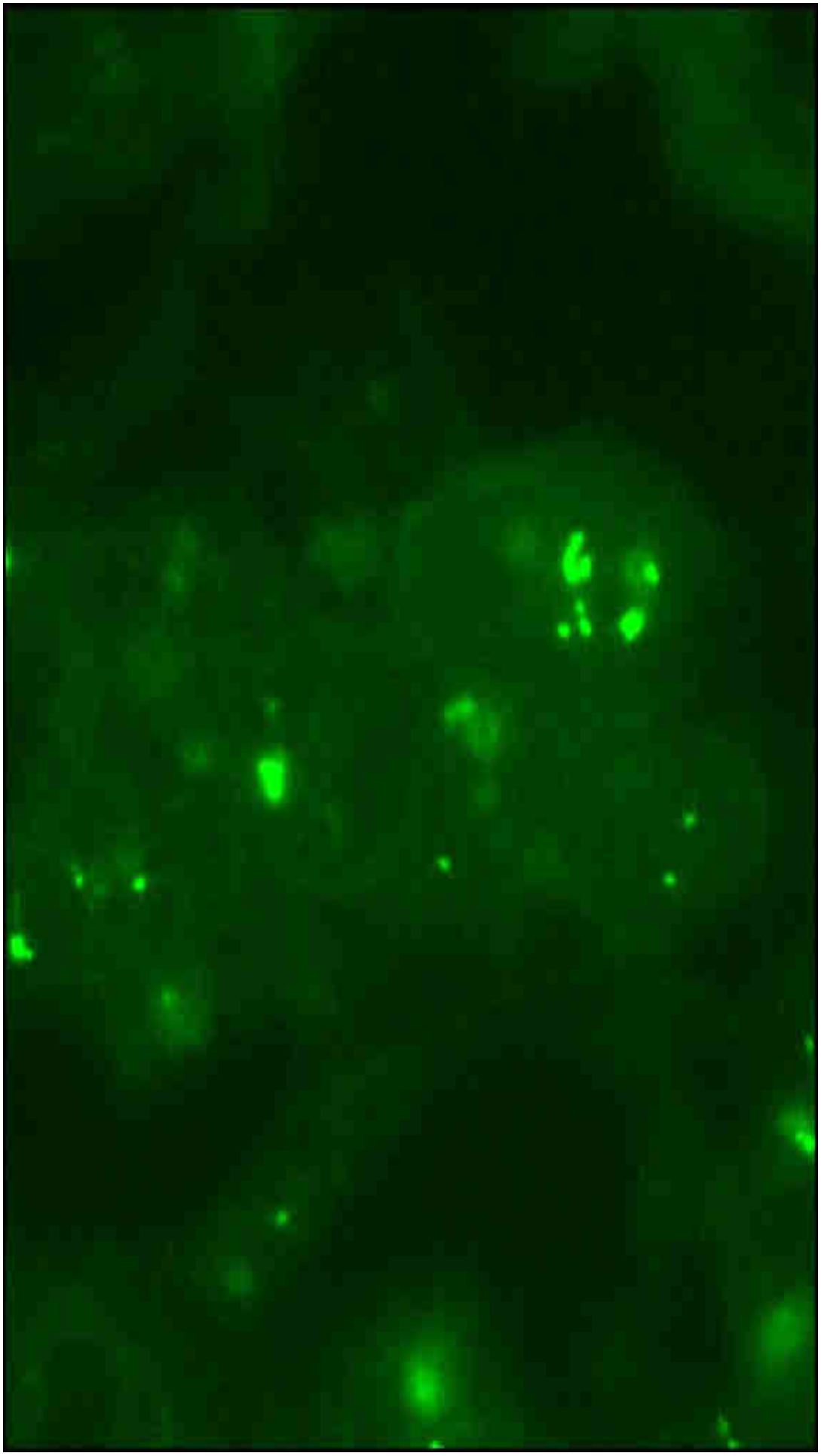


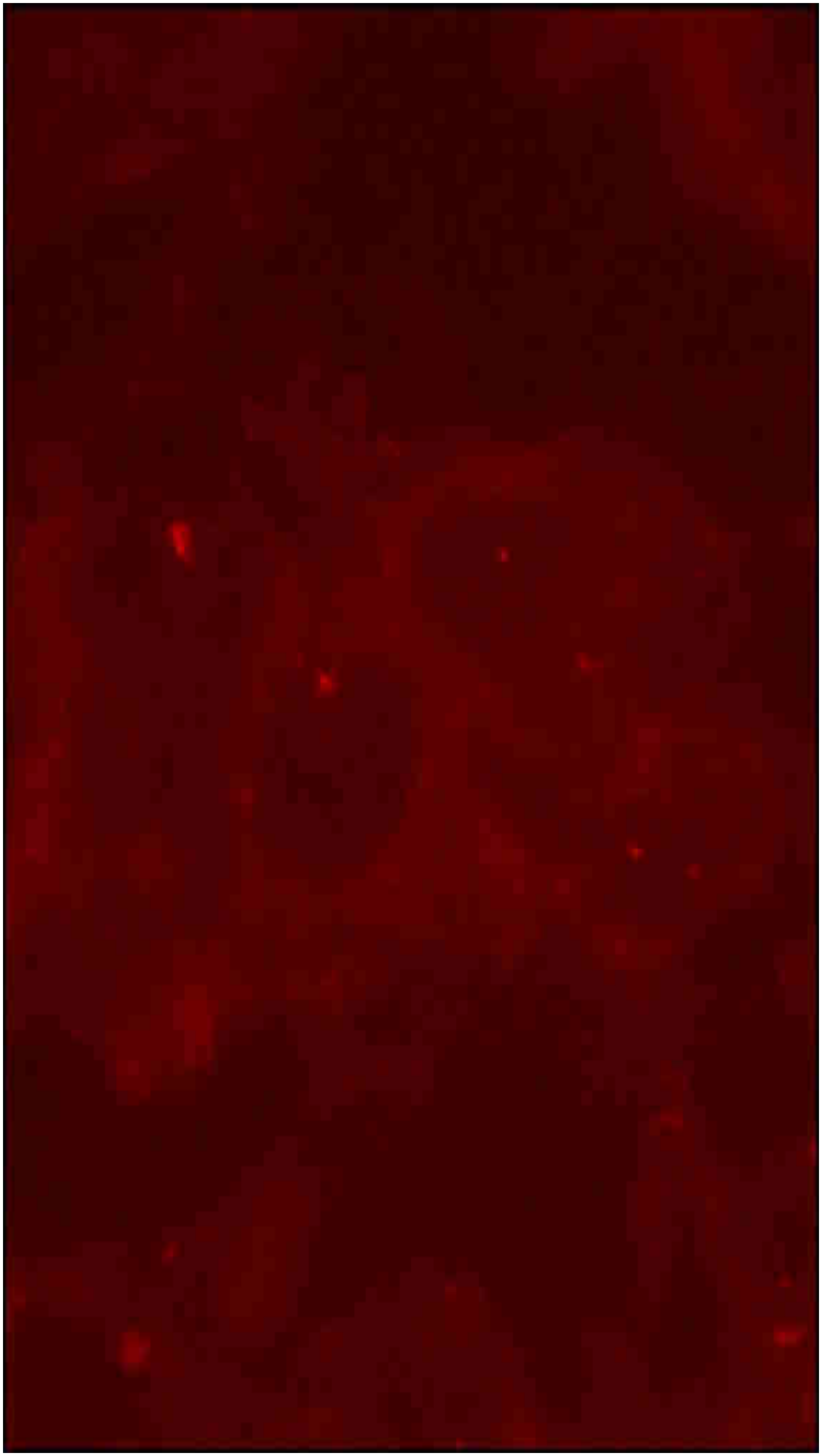


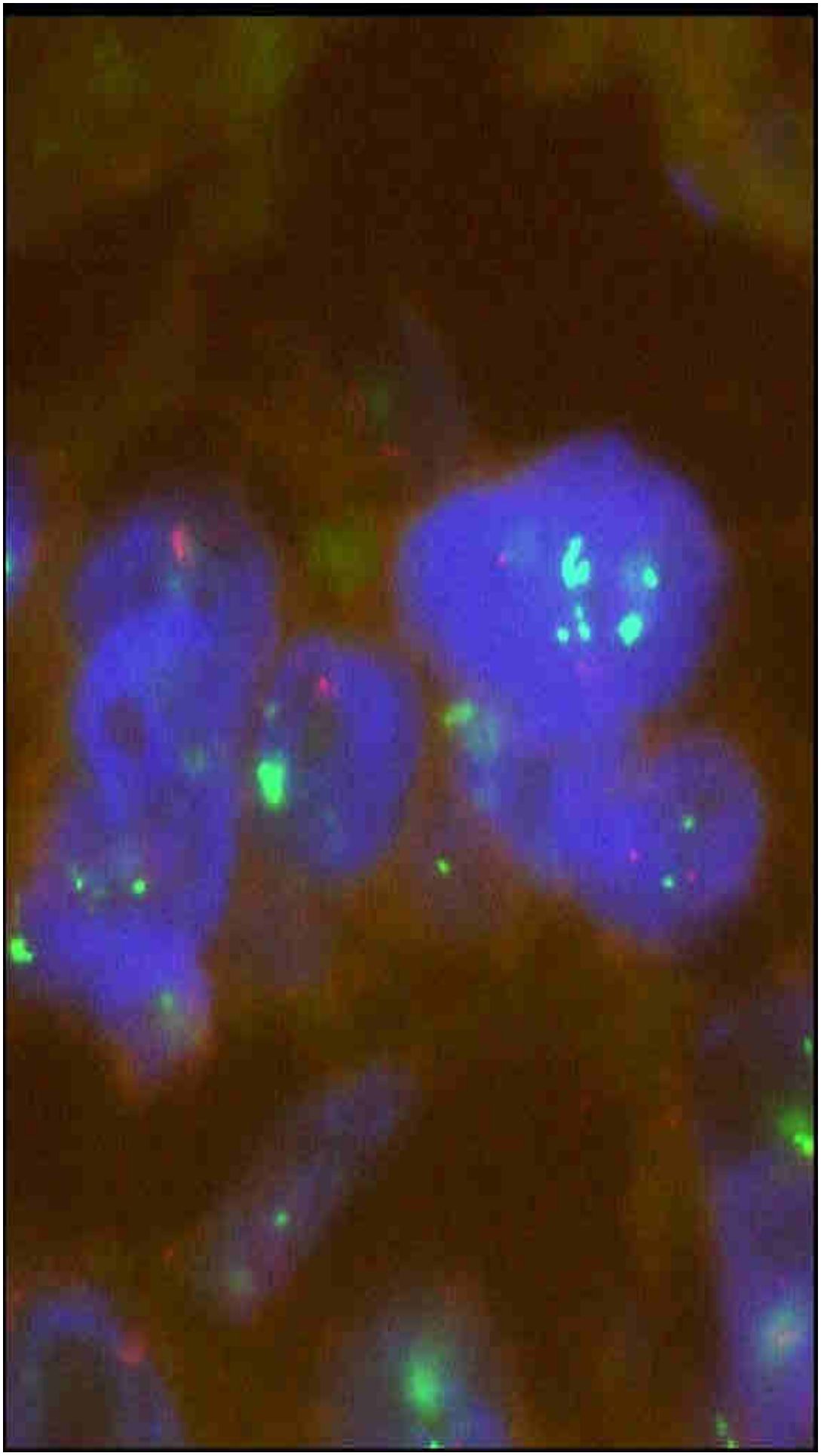


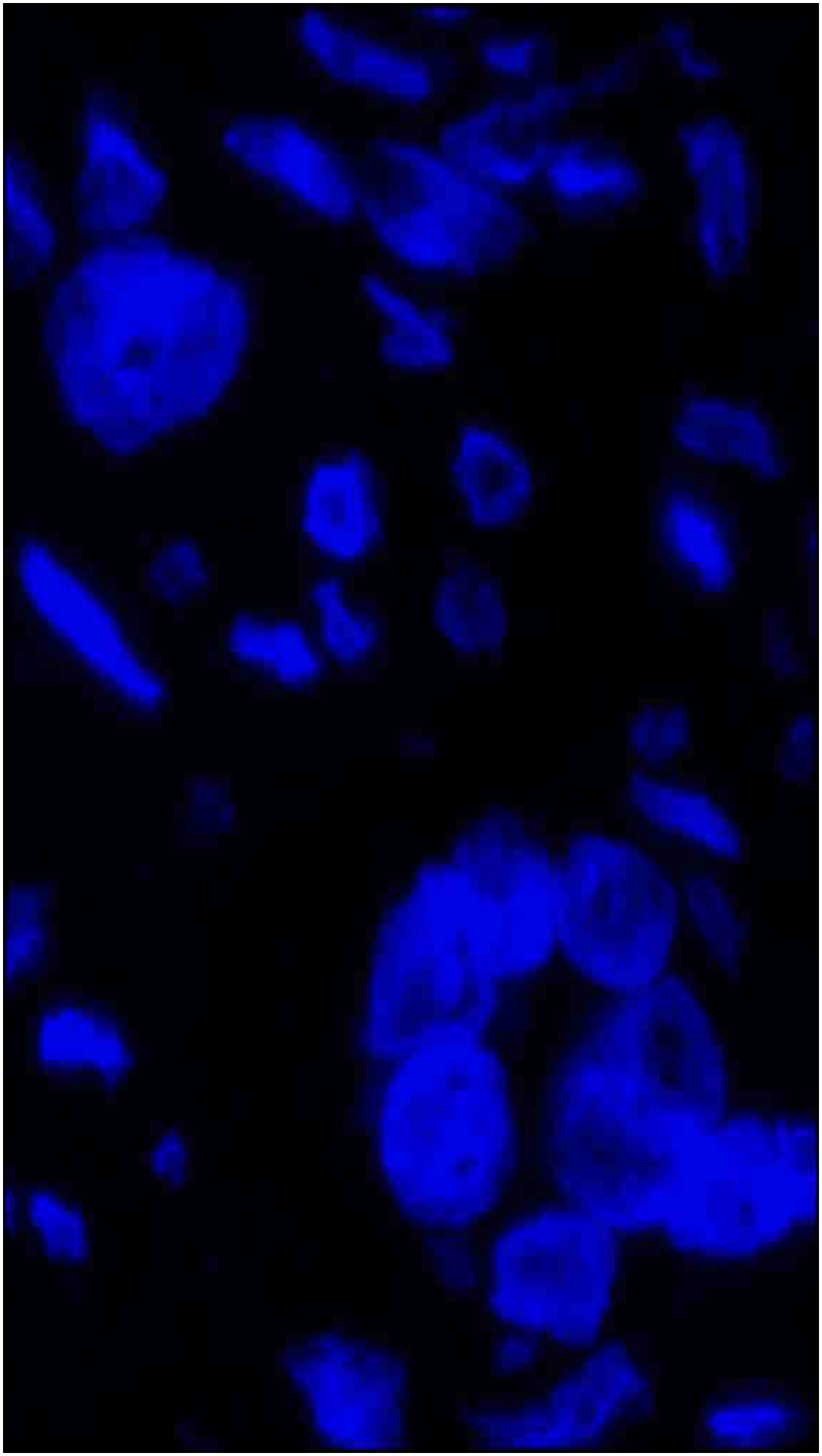

HER2=12_CEP17=3,5_R=3,4_Amplifié

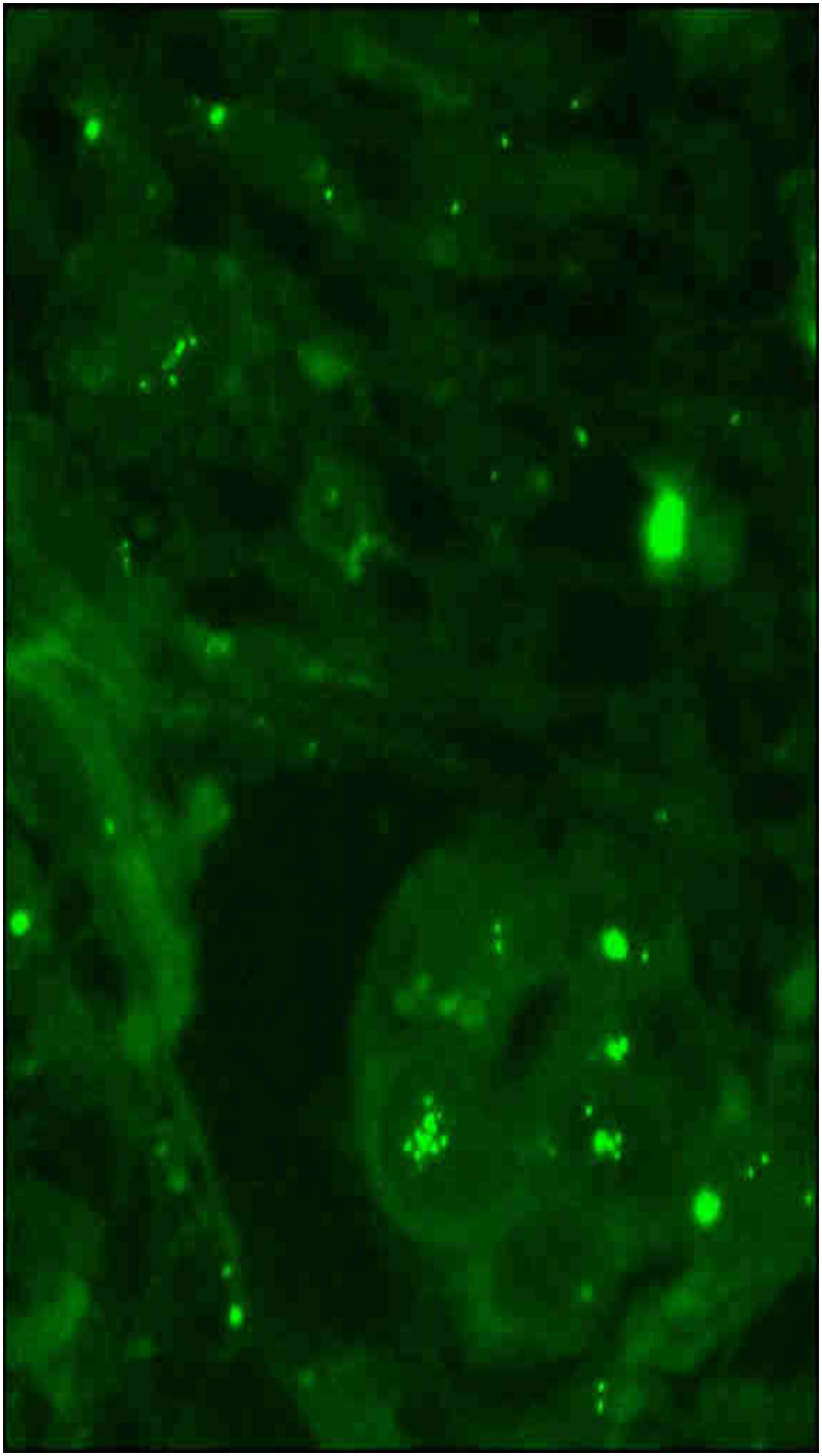

13R1524

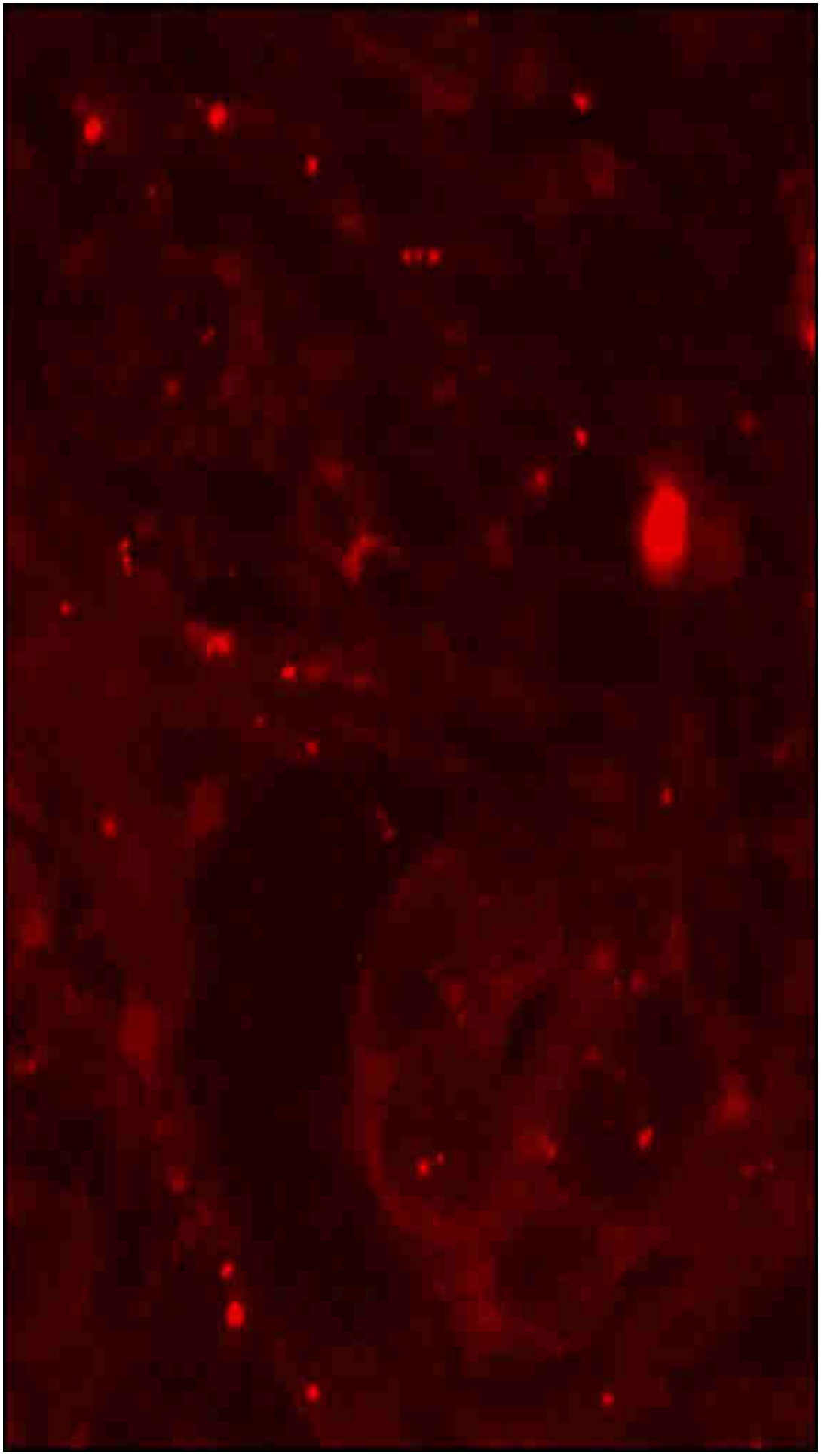


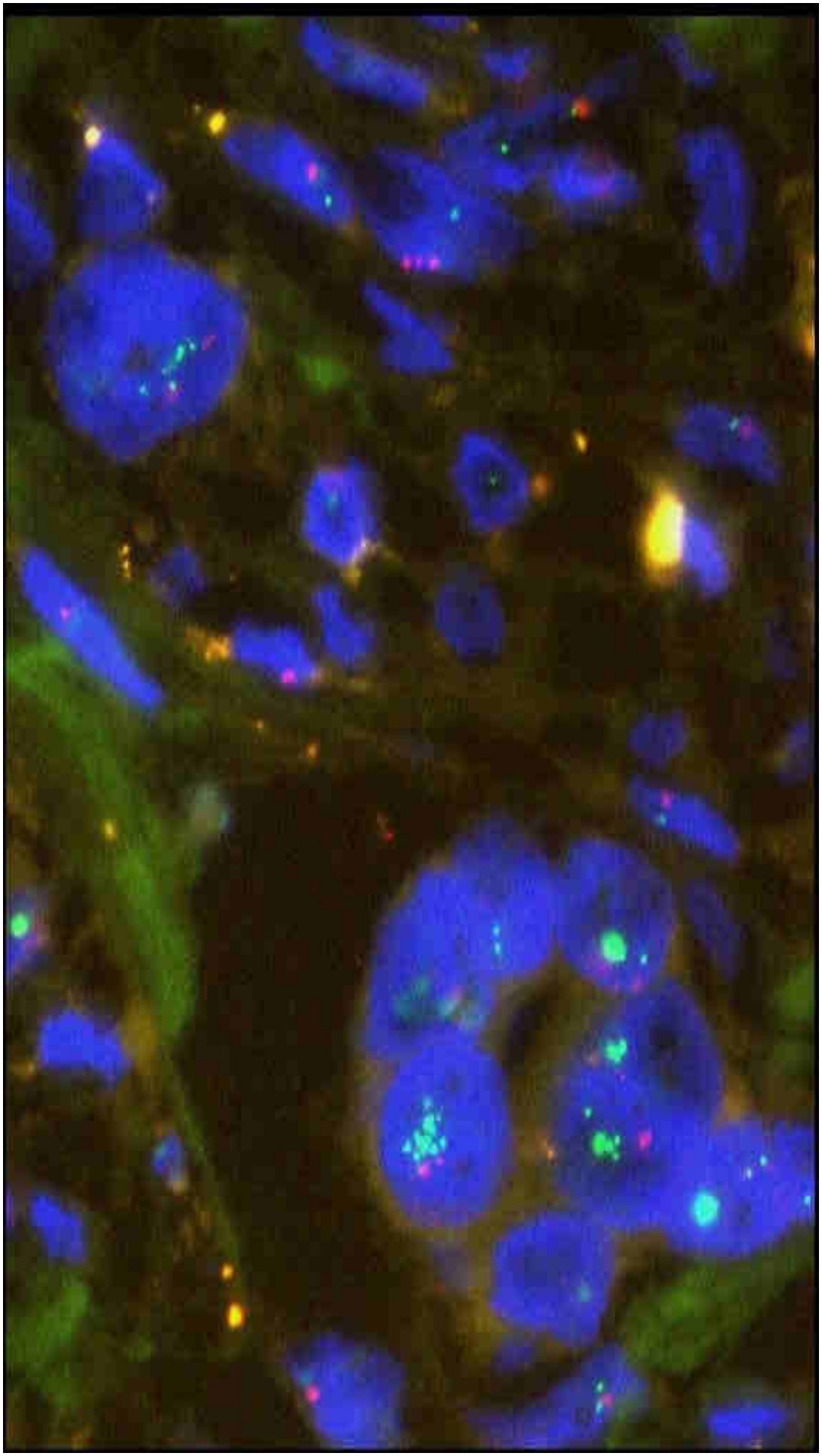


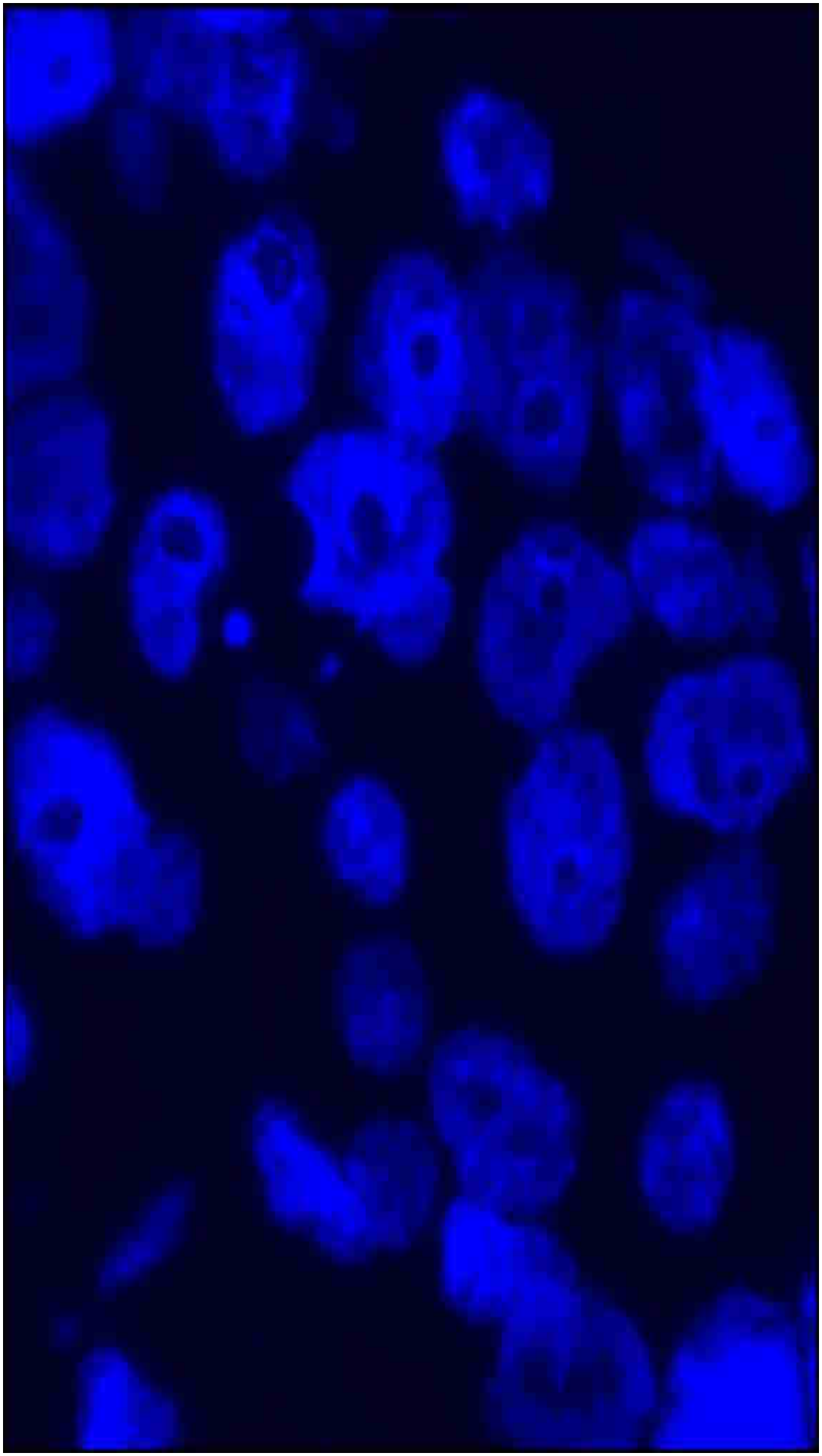


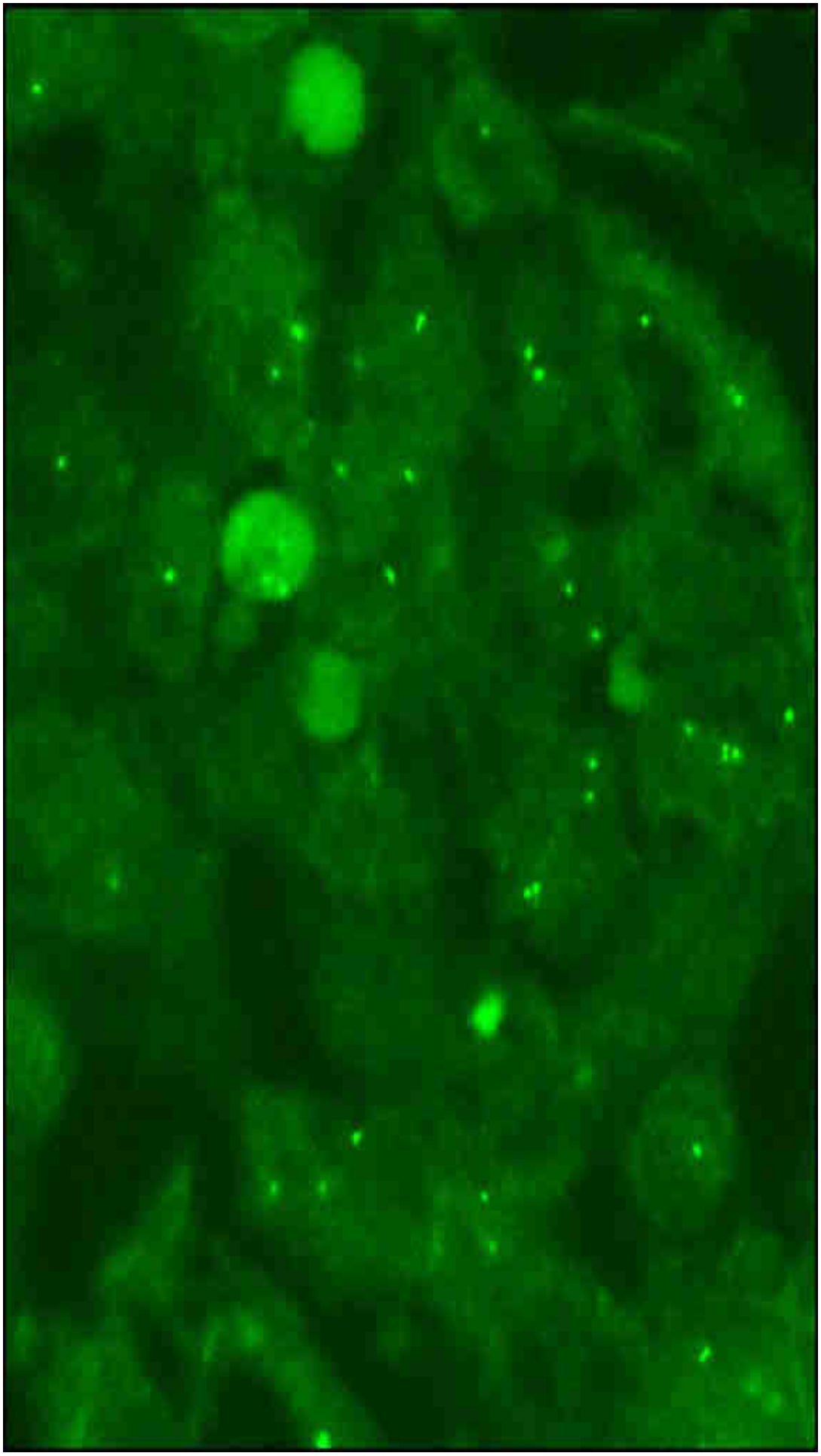


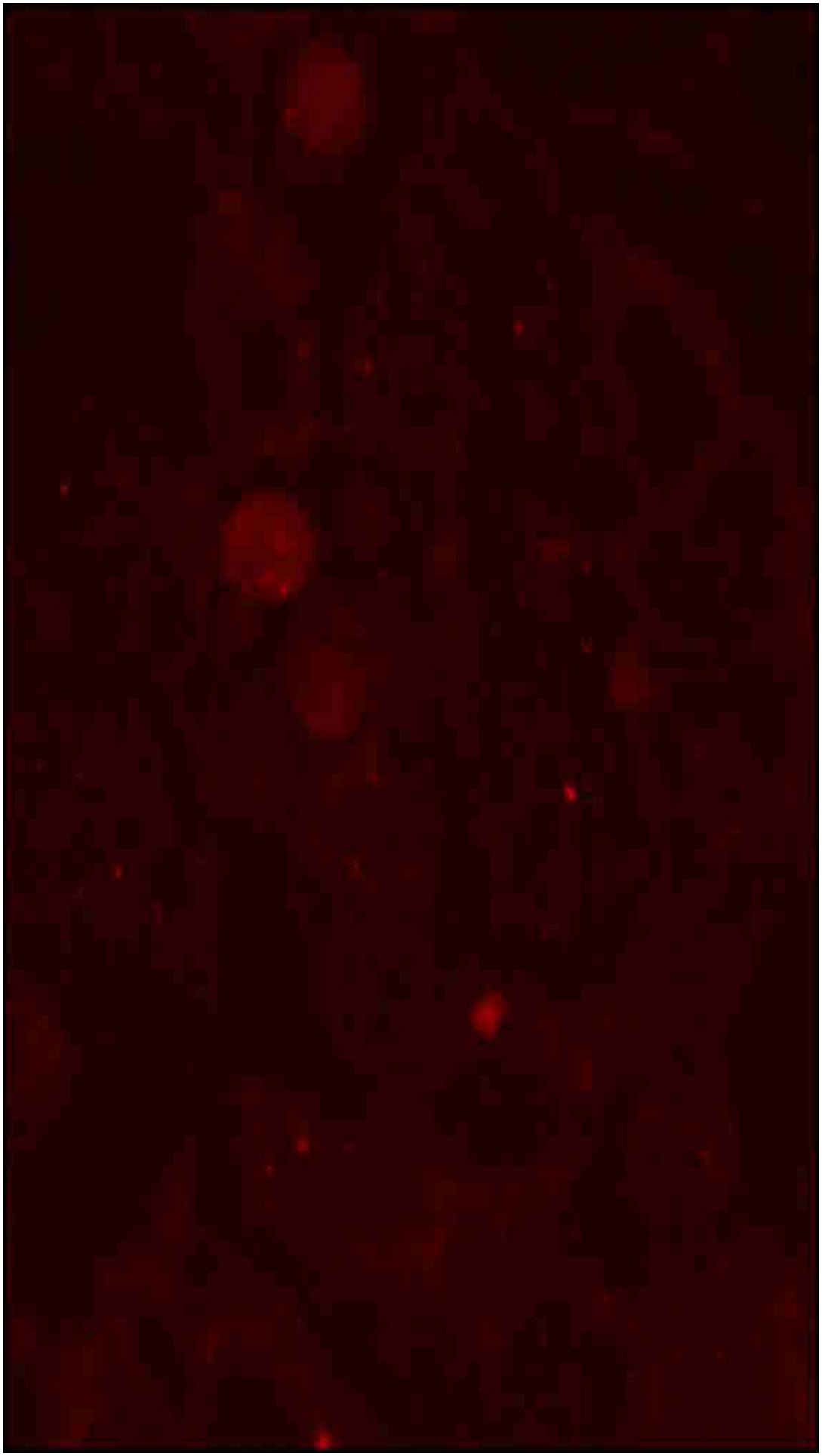


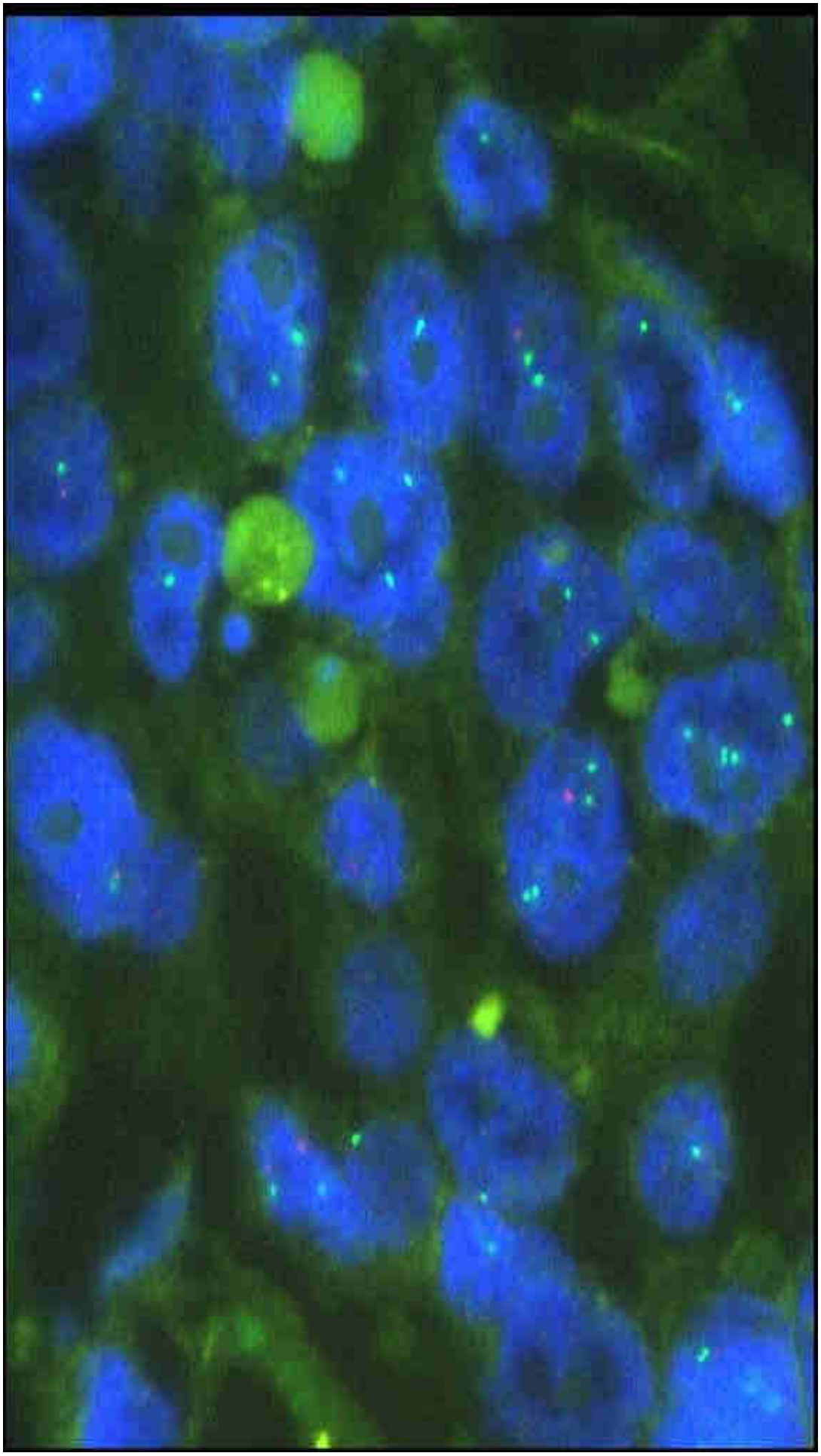


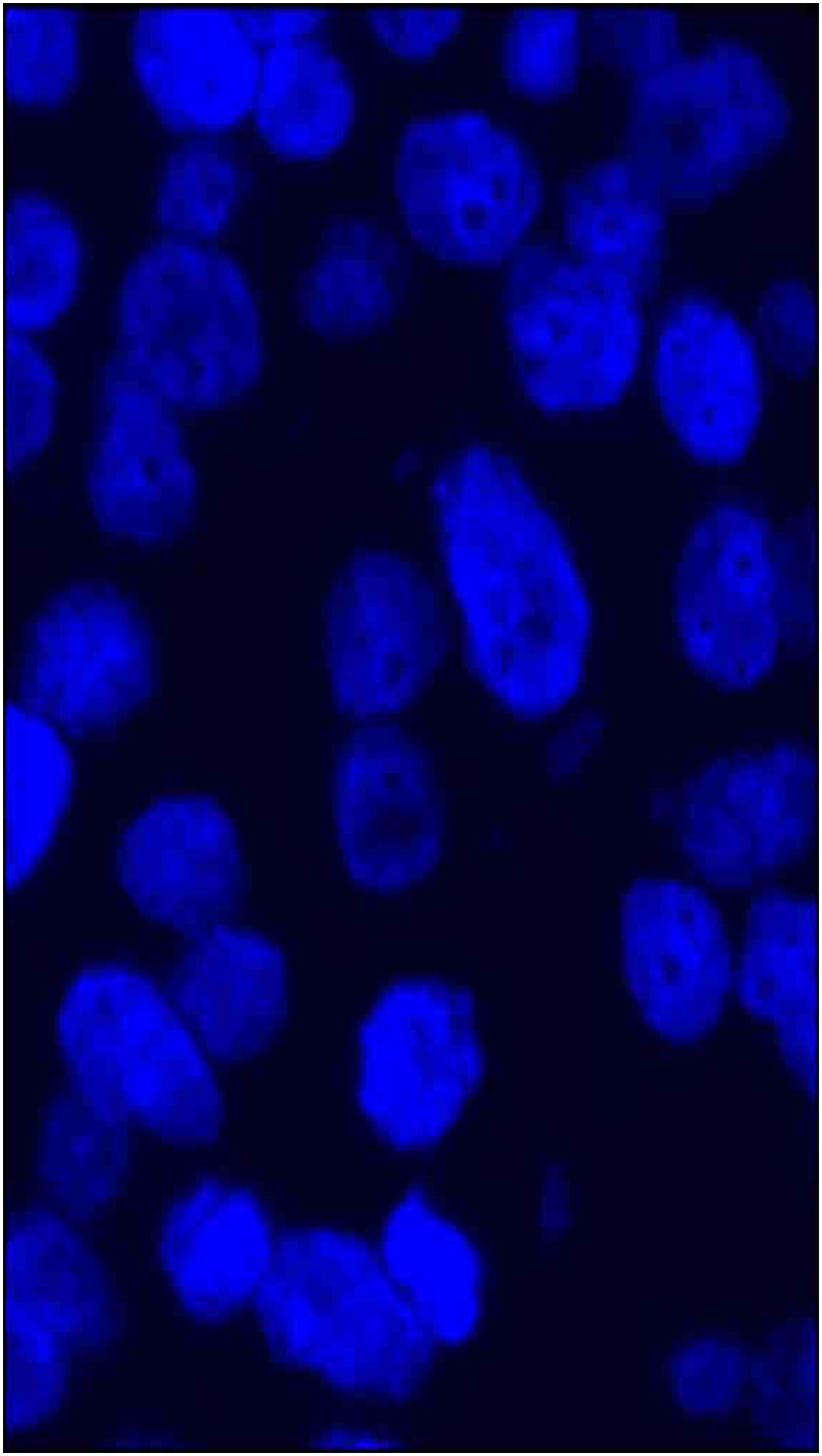


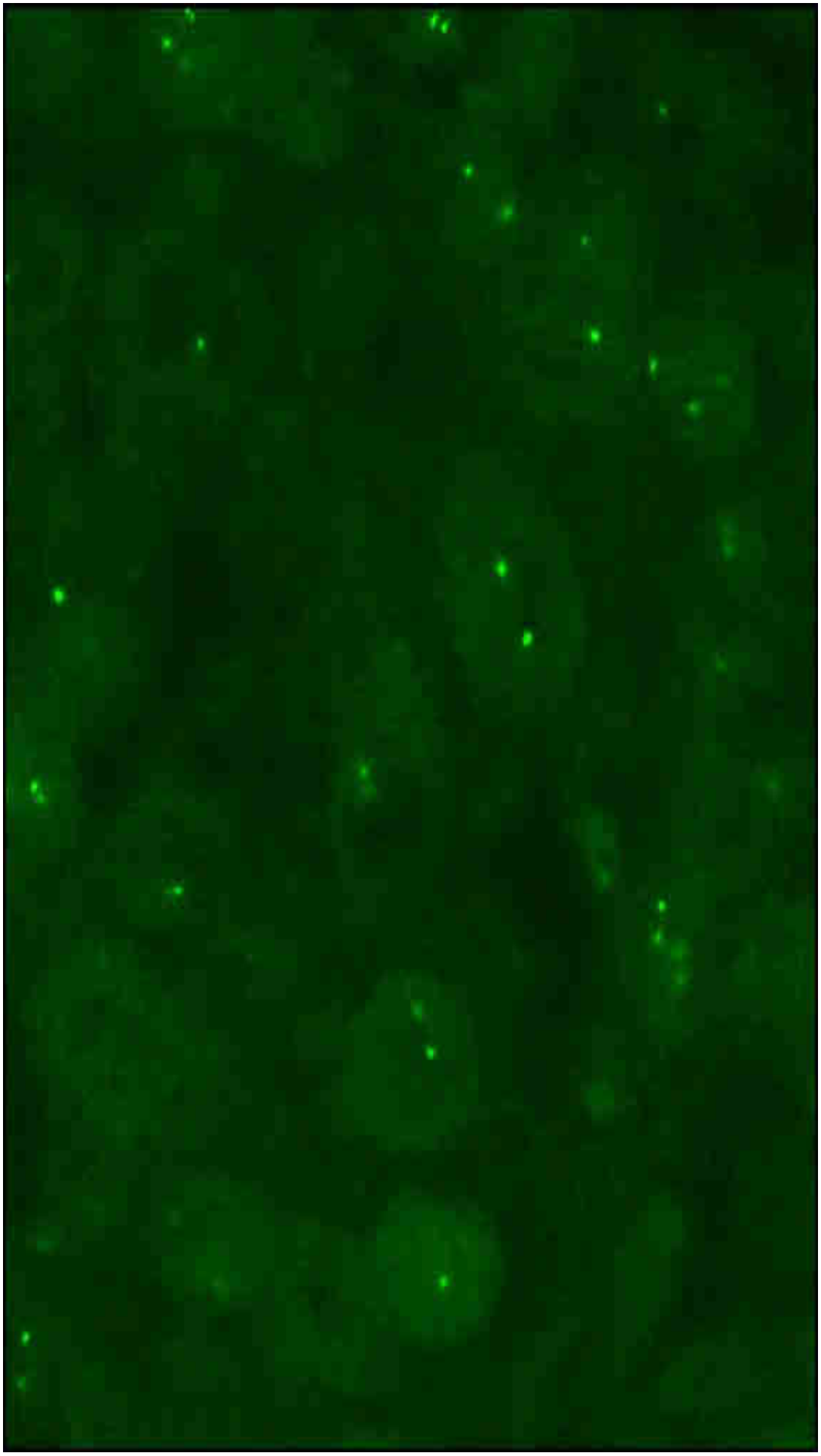


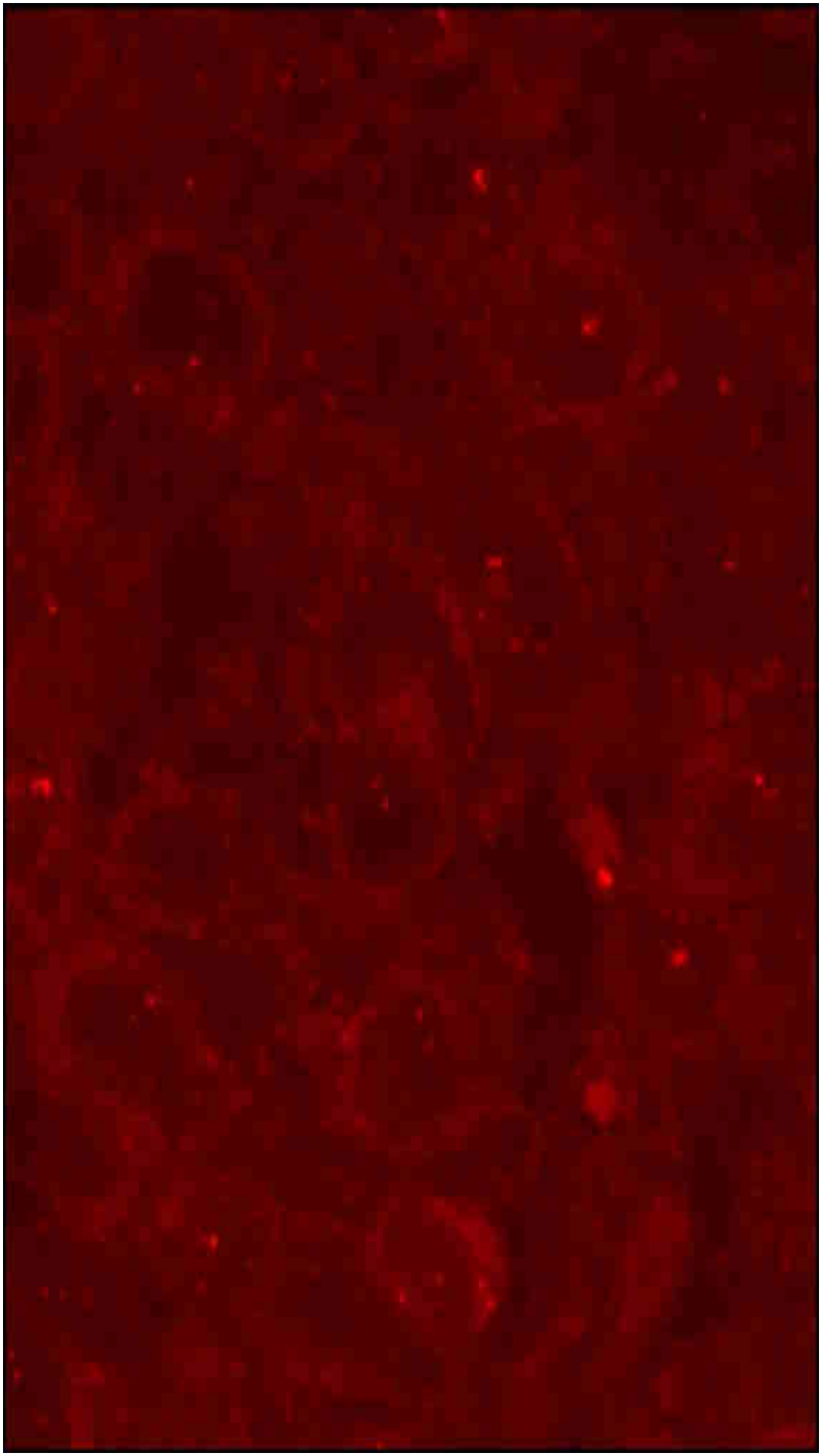


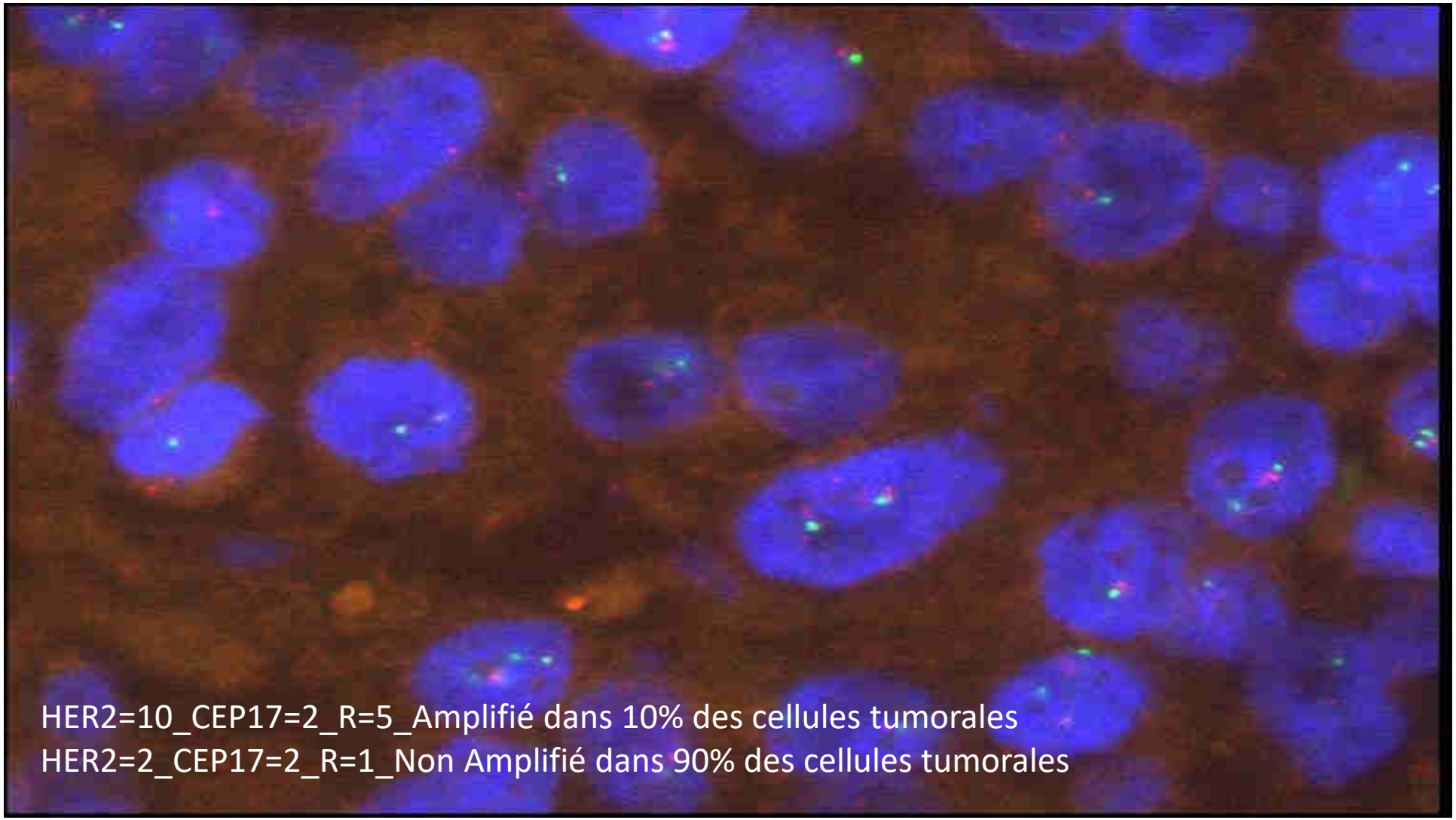


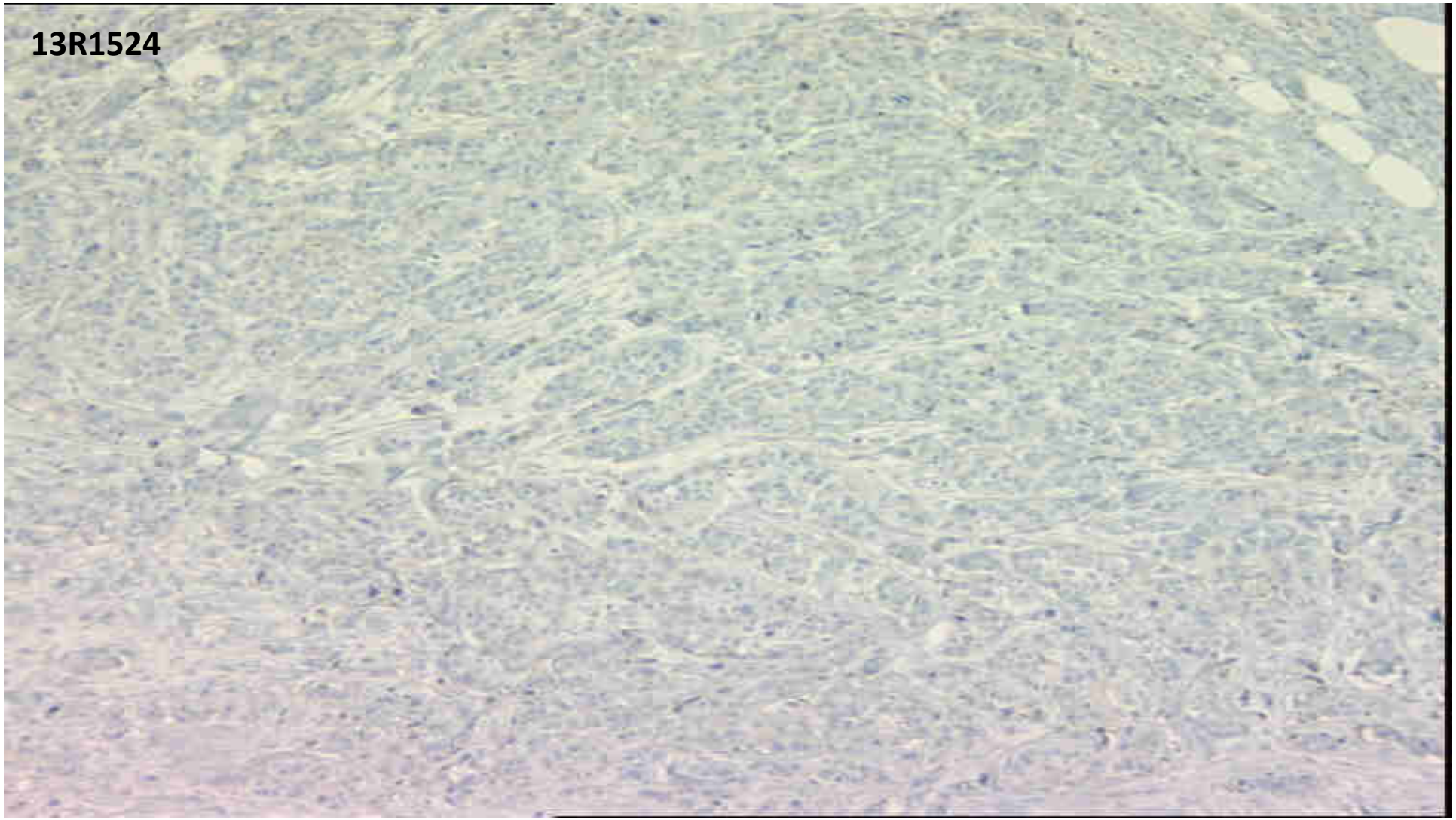


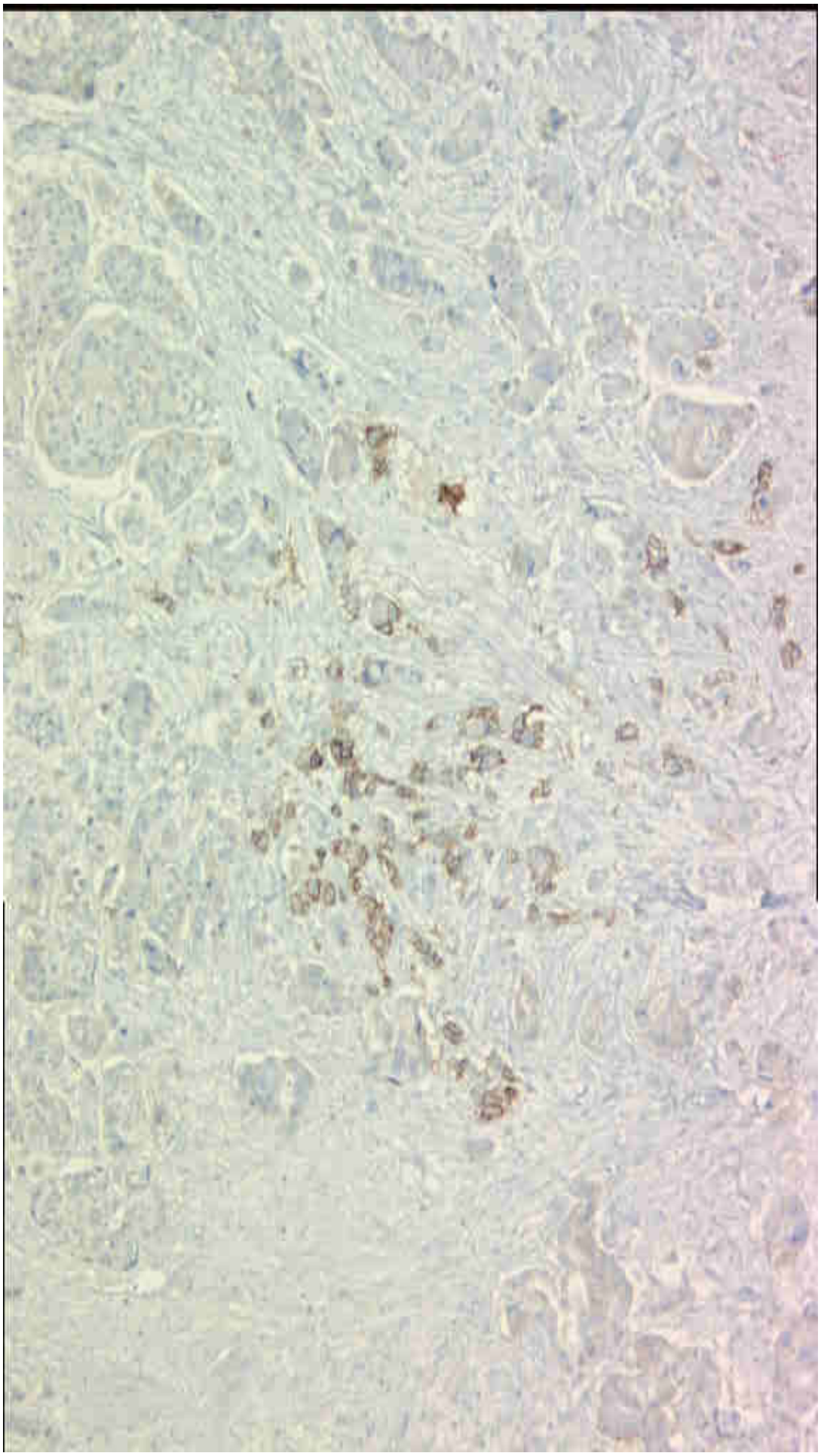


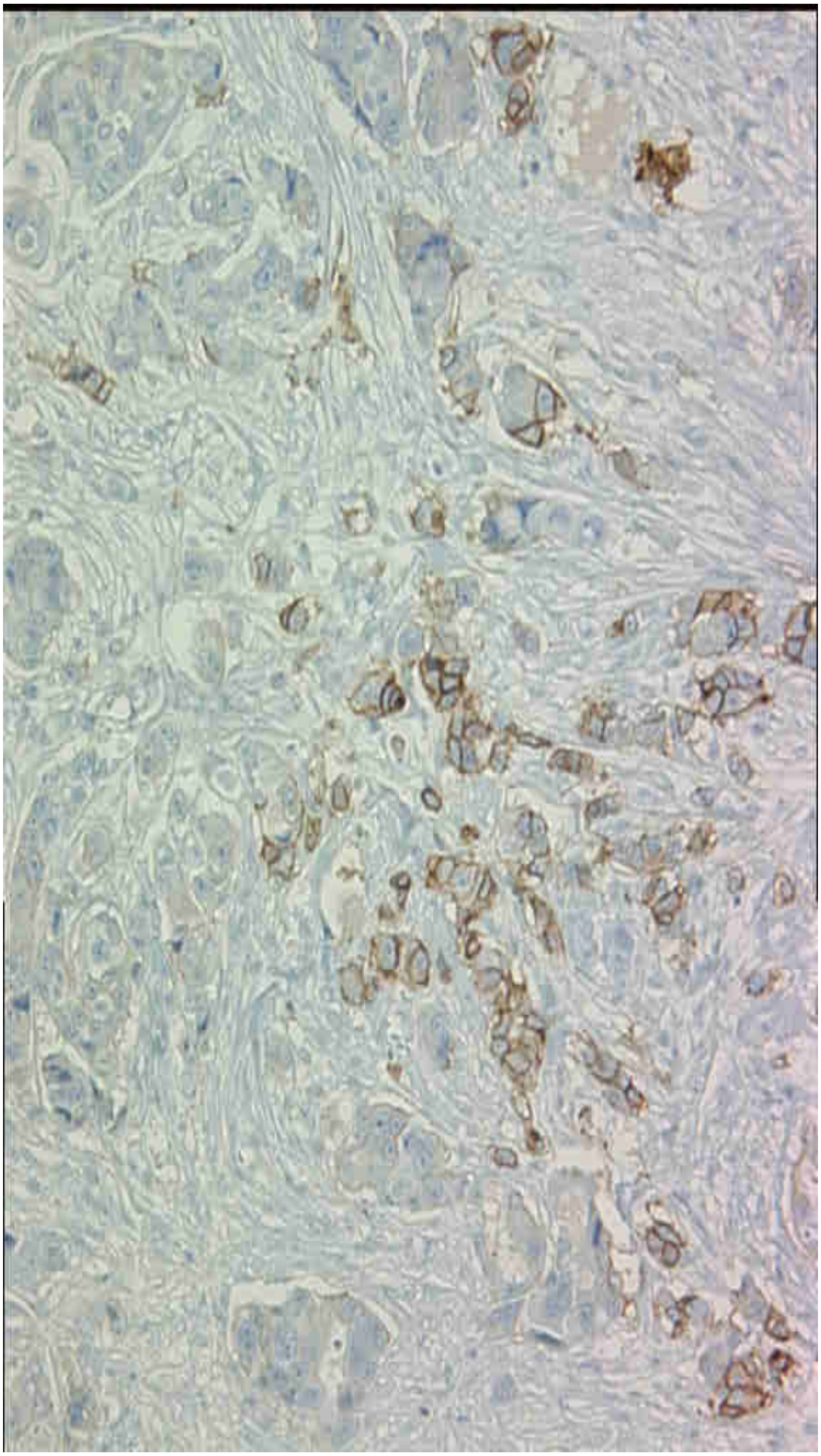


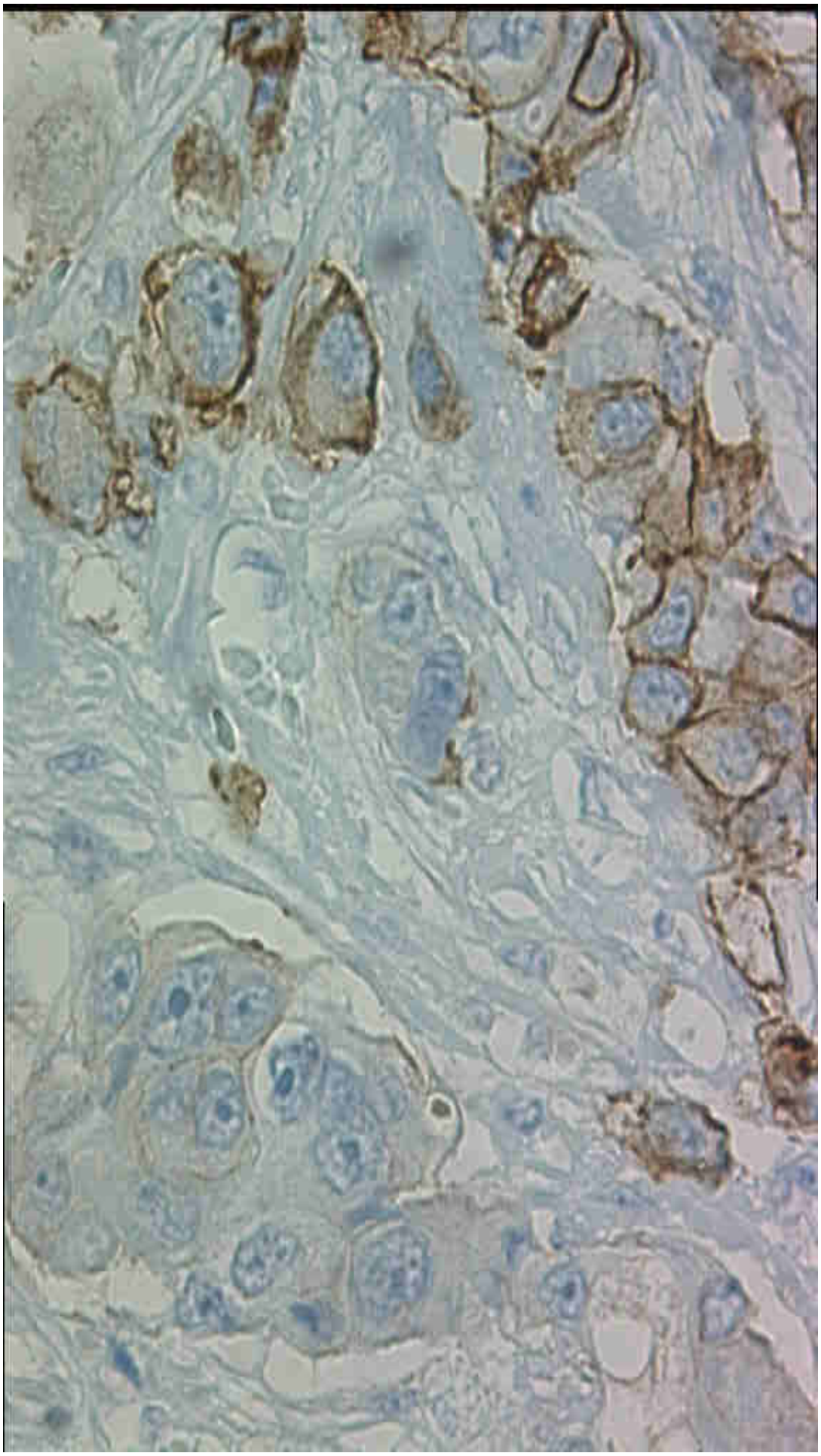


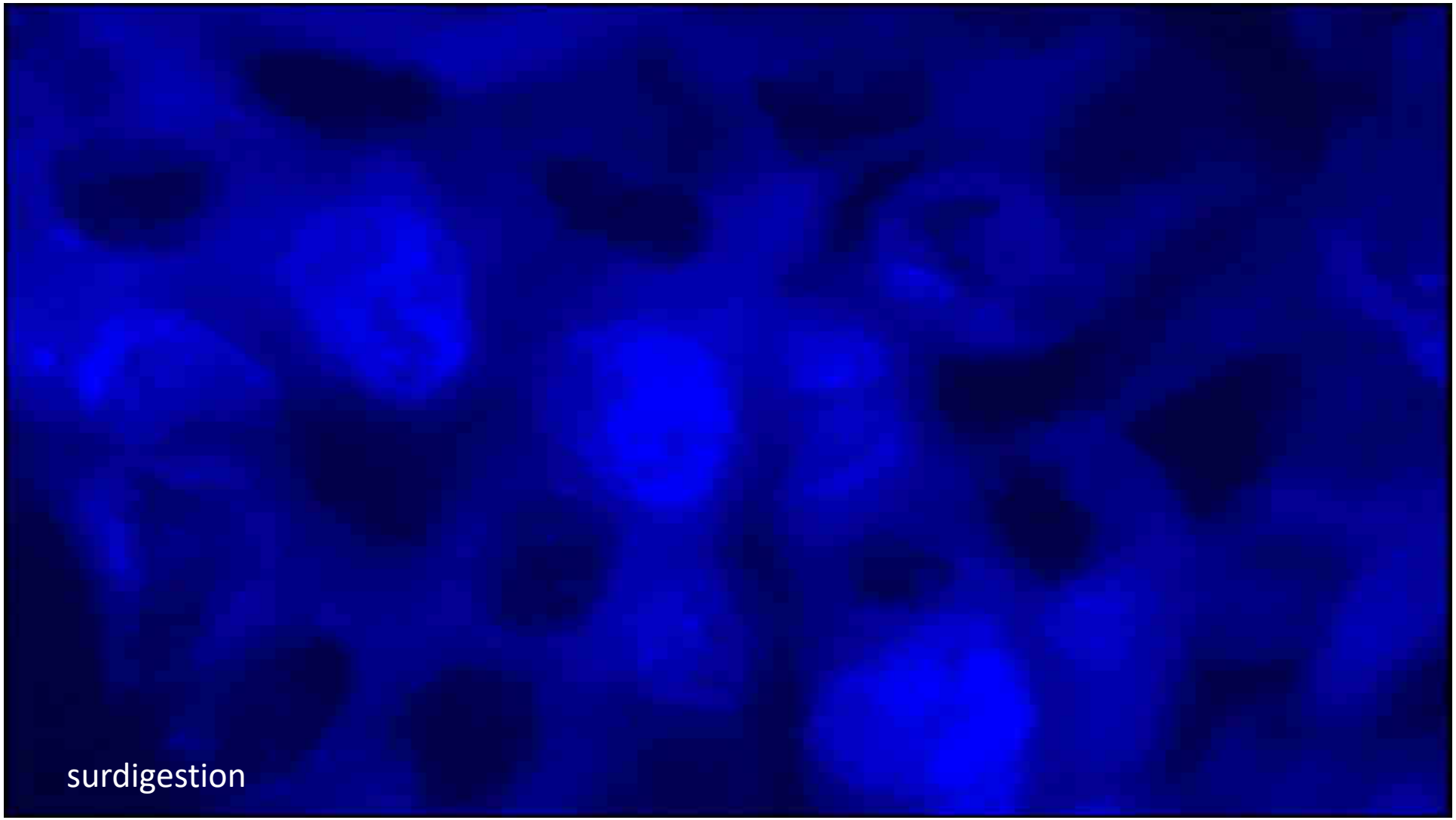

HER2=10_CEP17=2_R=5_Amplifié dans 10% des cellules tumorales
HER2=2_CEP17=2_R=1_Non Amplifié dans 90% des cellules tumorales

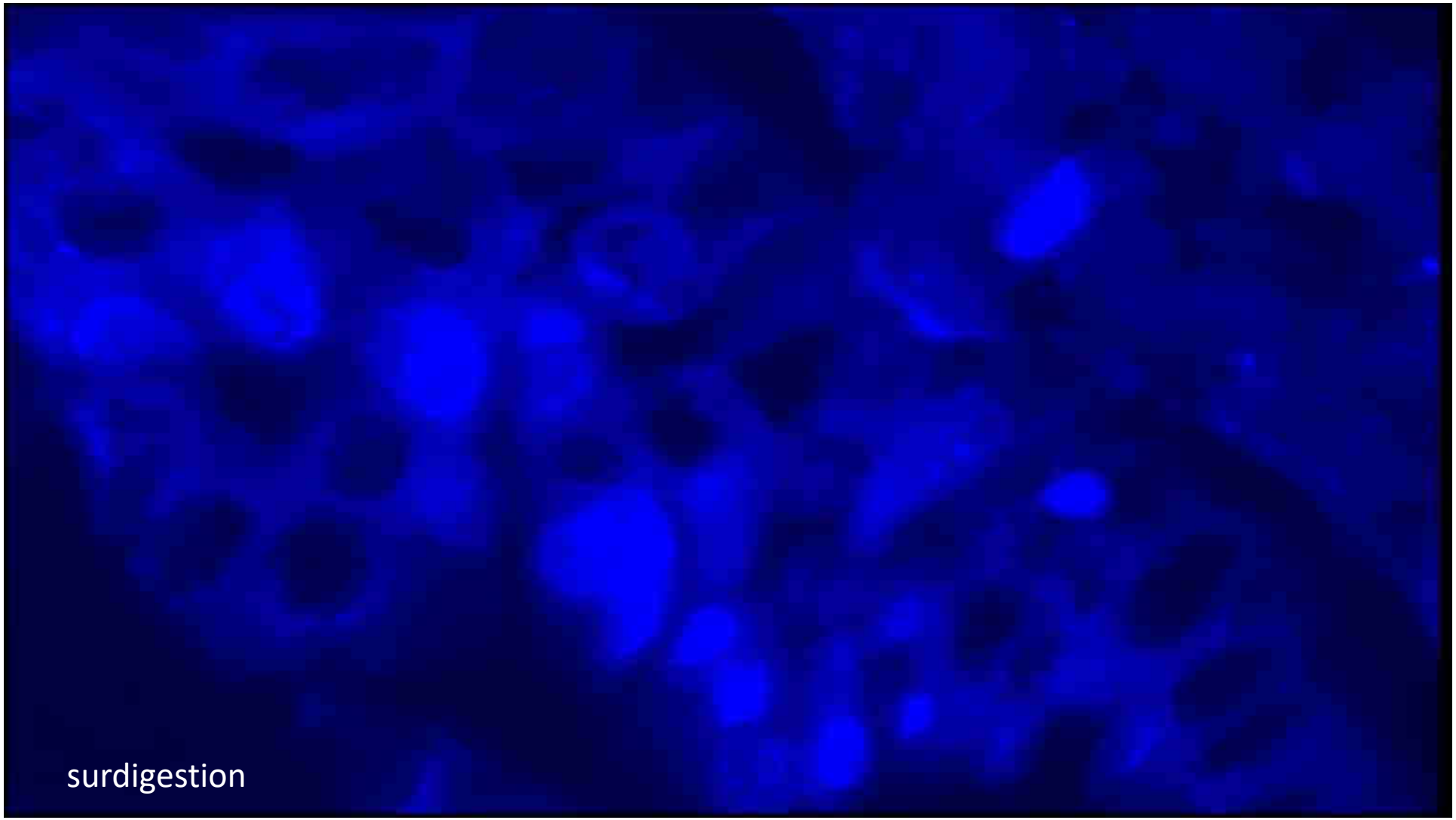

13R1524

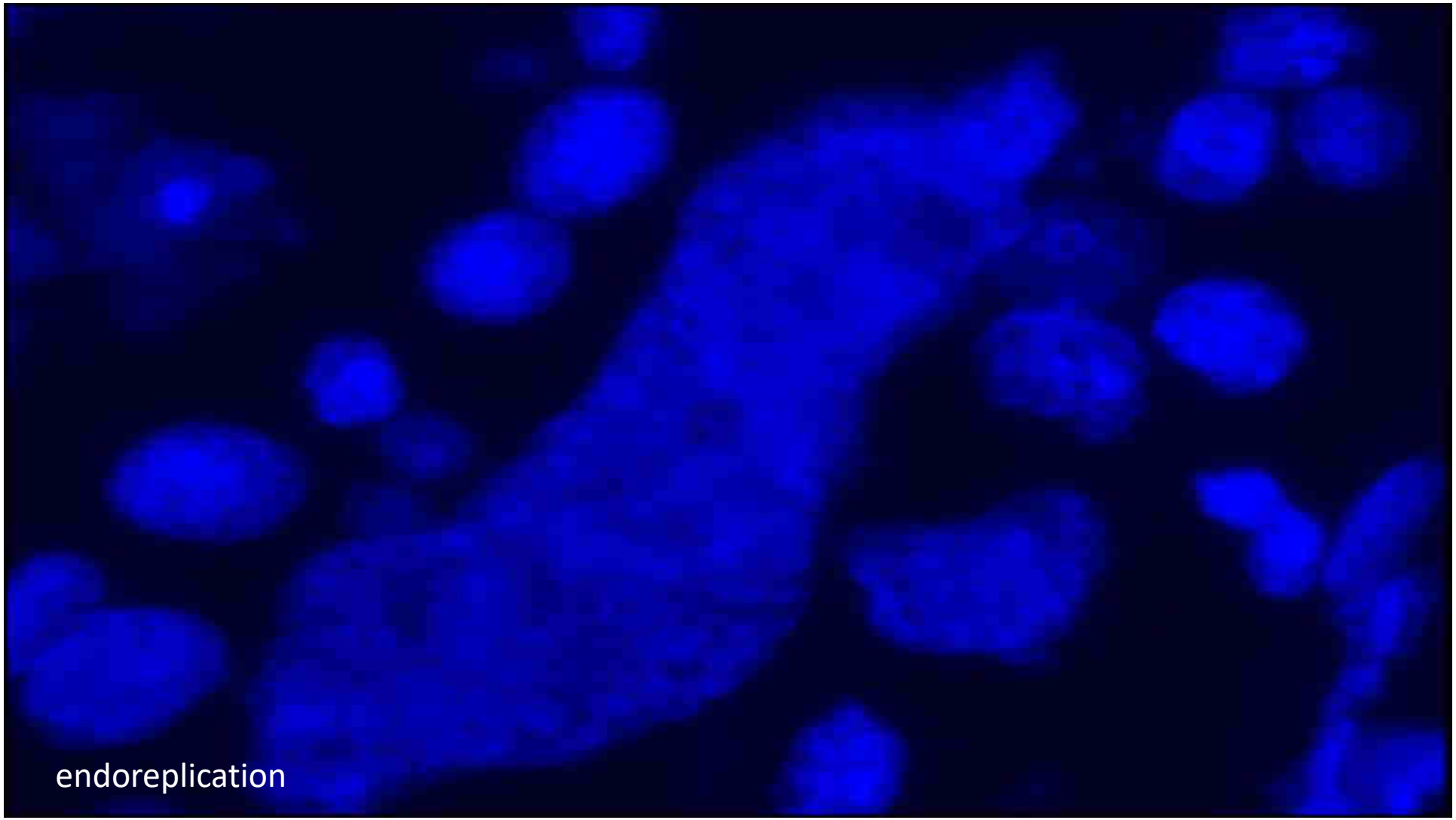


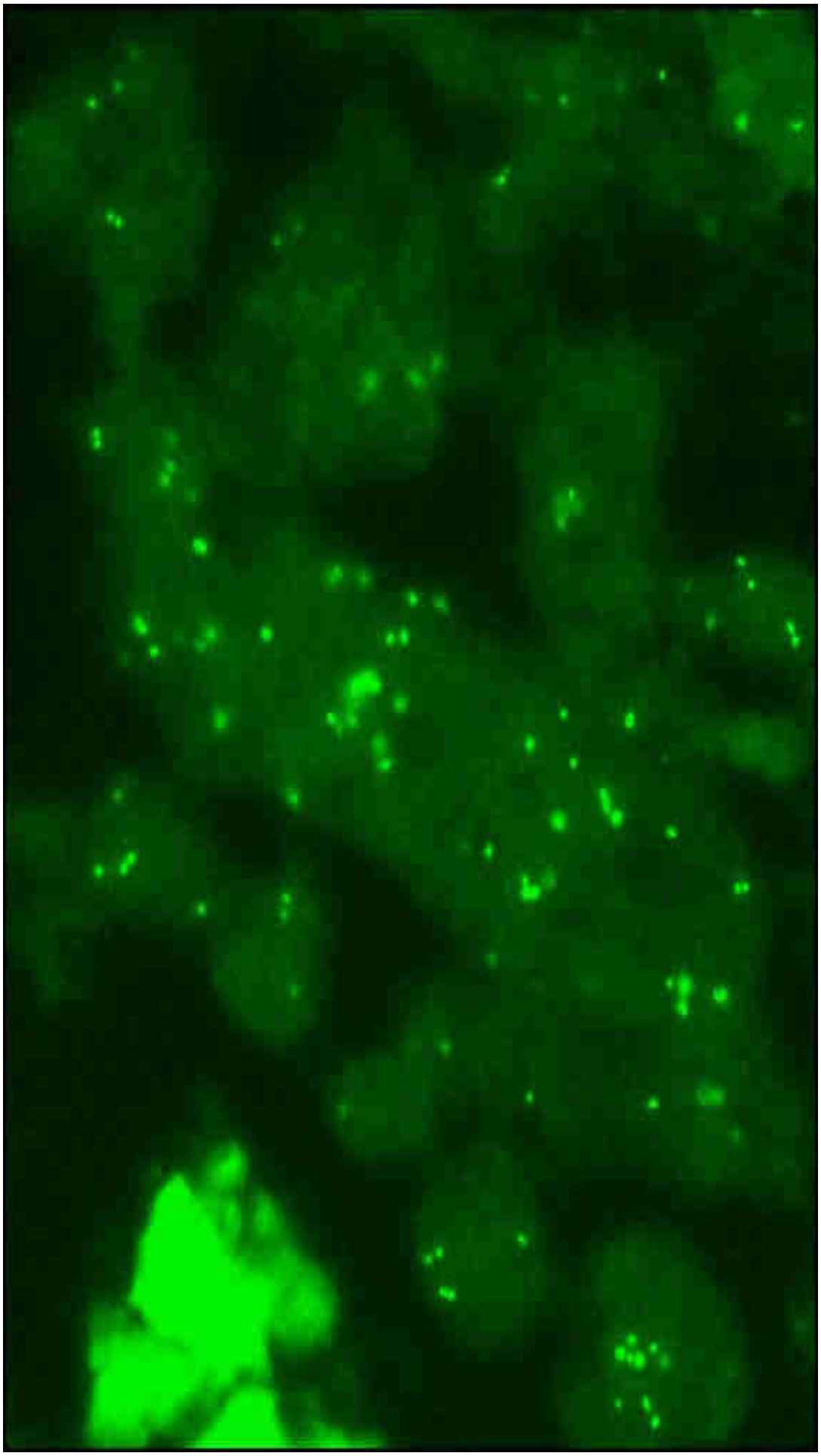


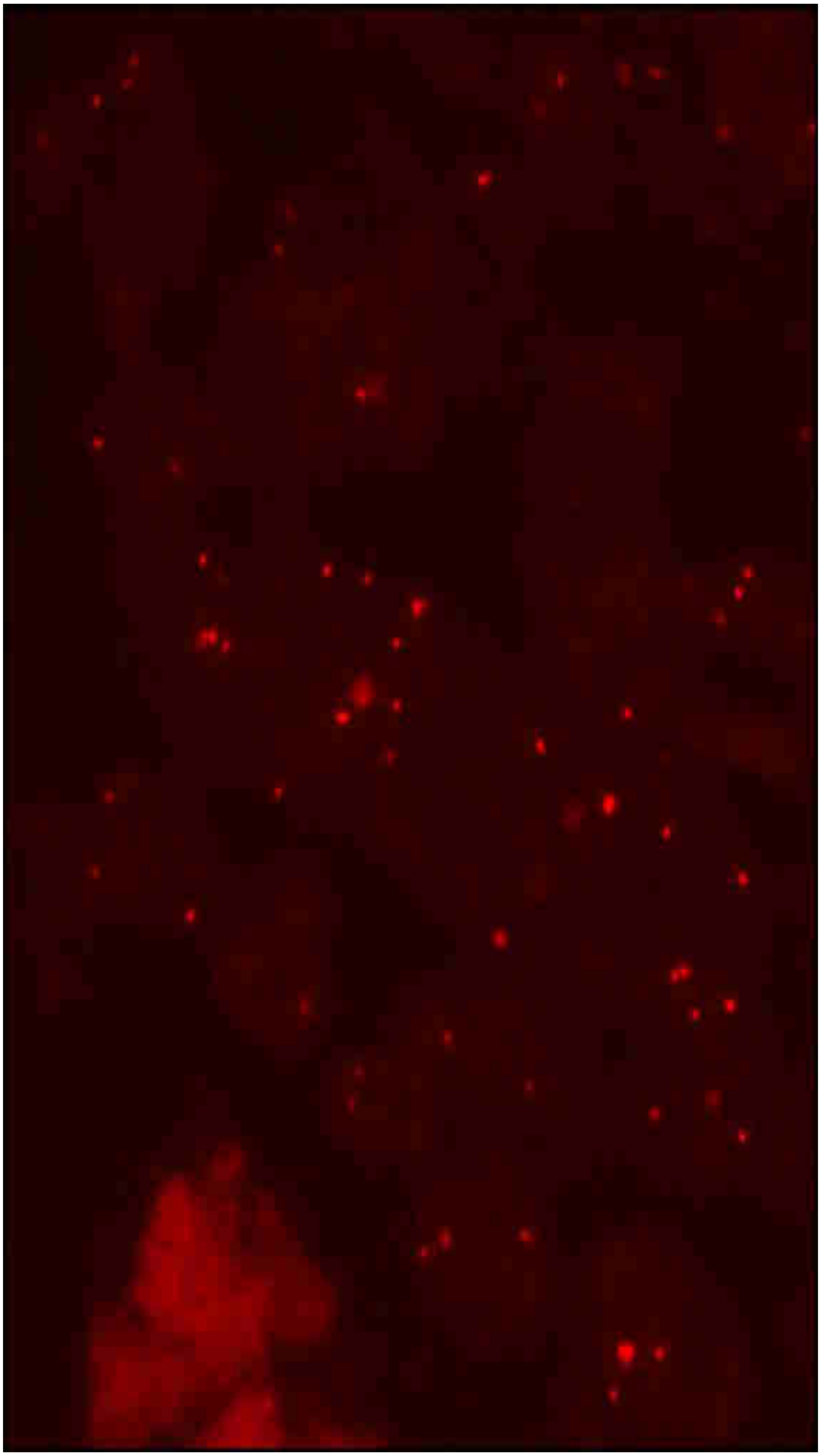


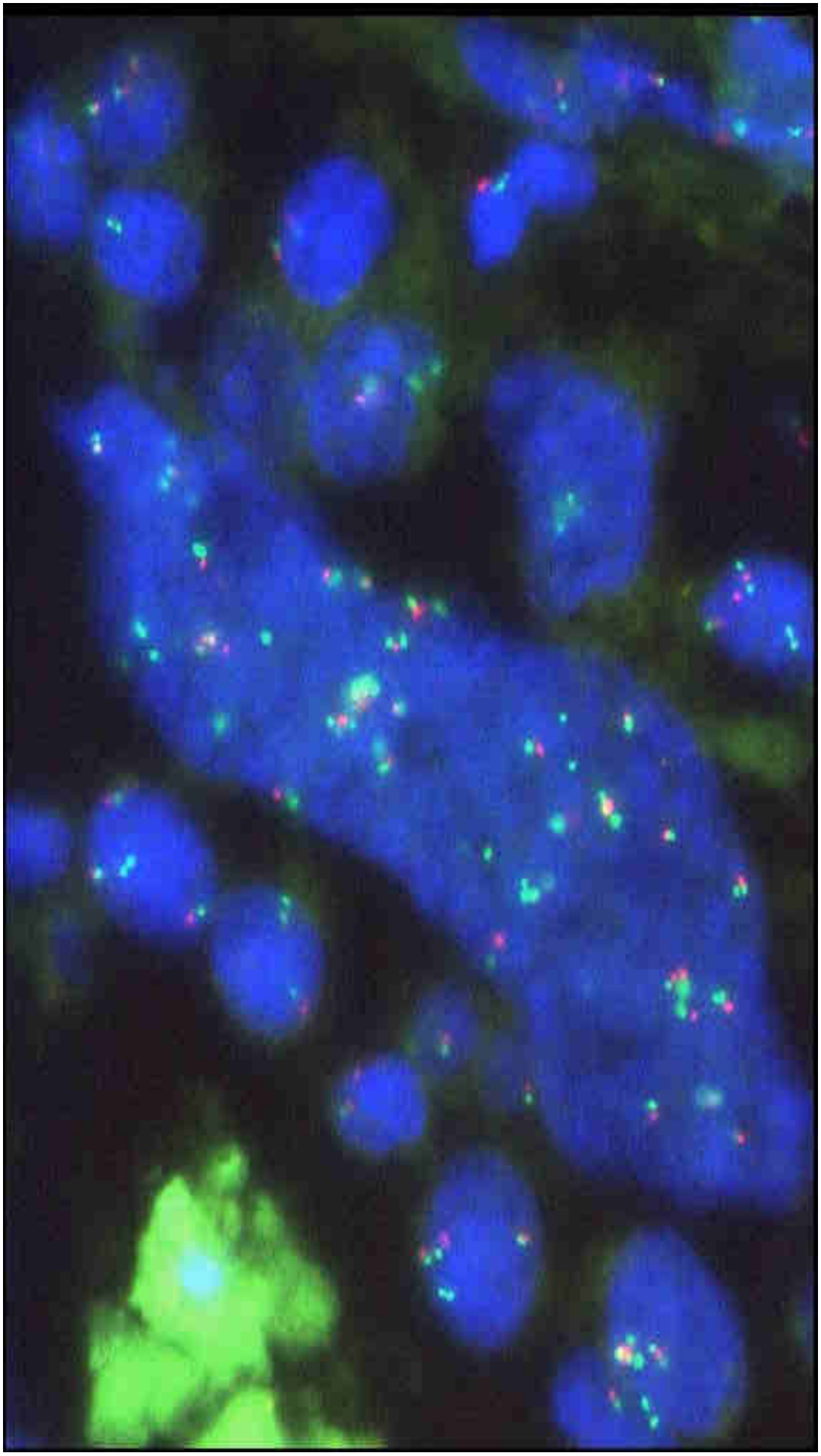

surdigestion


surdigestion


endoreplication







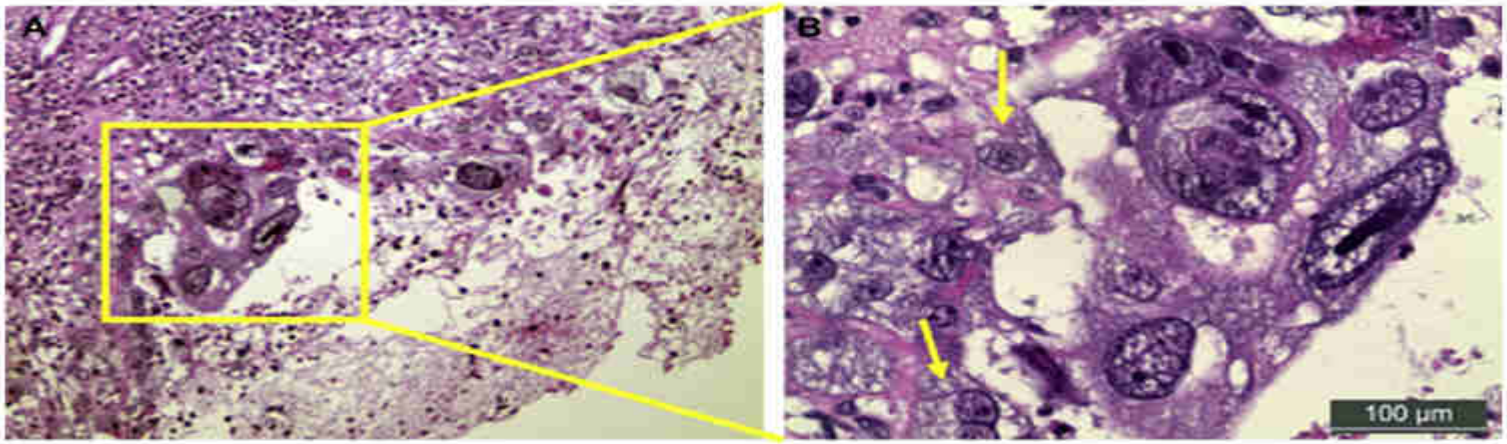
Atelier FISH

ELSEVIER Cancer Genetics 206 (2013) 37–41

BRIEF COMMUNICATION

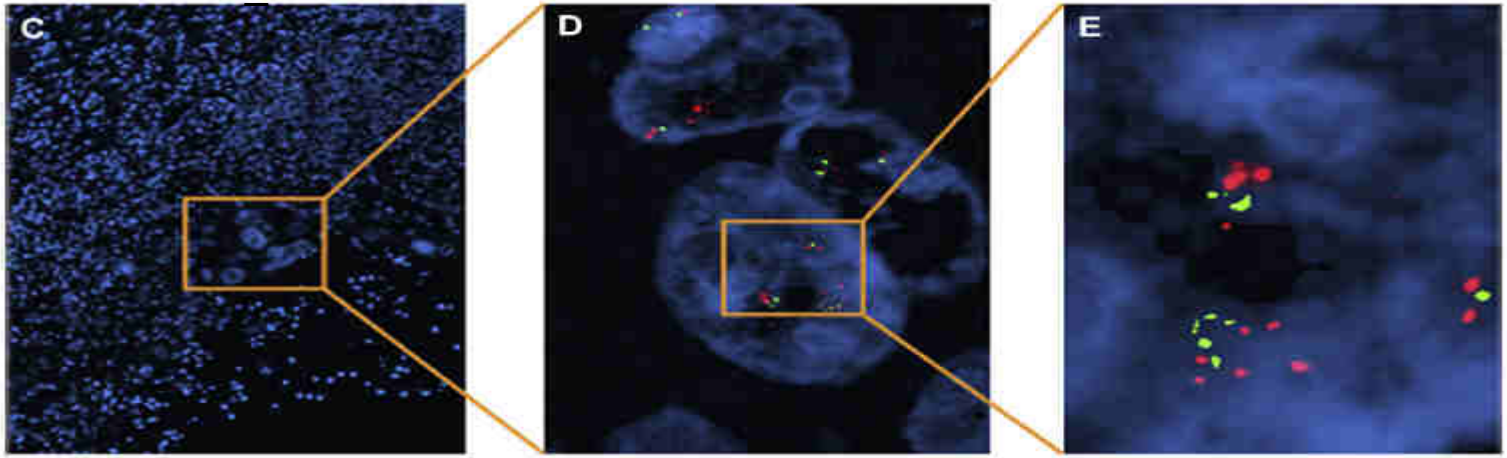
Change in *HER2* (*ERBB2*) gene status after taxane-based chemotherapy for breast cancer: polyploidization can lead to diagnostic pitfalls with potential impact for clinical management

Alexander Valent [a,*], Frédérique Penault-Llorca [b,c], Anne Cayre [b], Guido Kroemer [d,e,f,g,h]

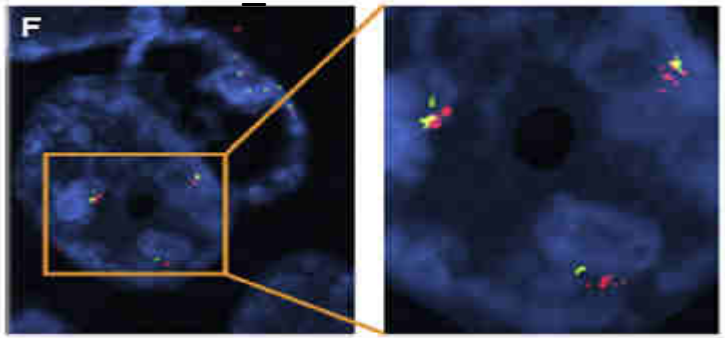


Atelier FISH

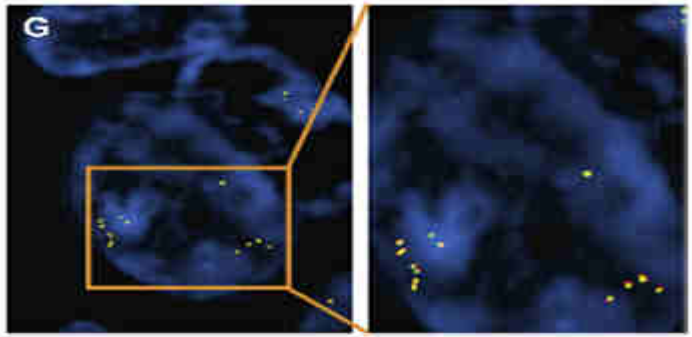
Sonde HER2_CEP17

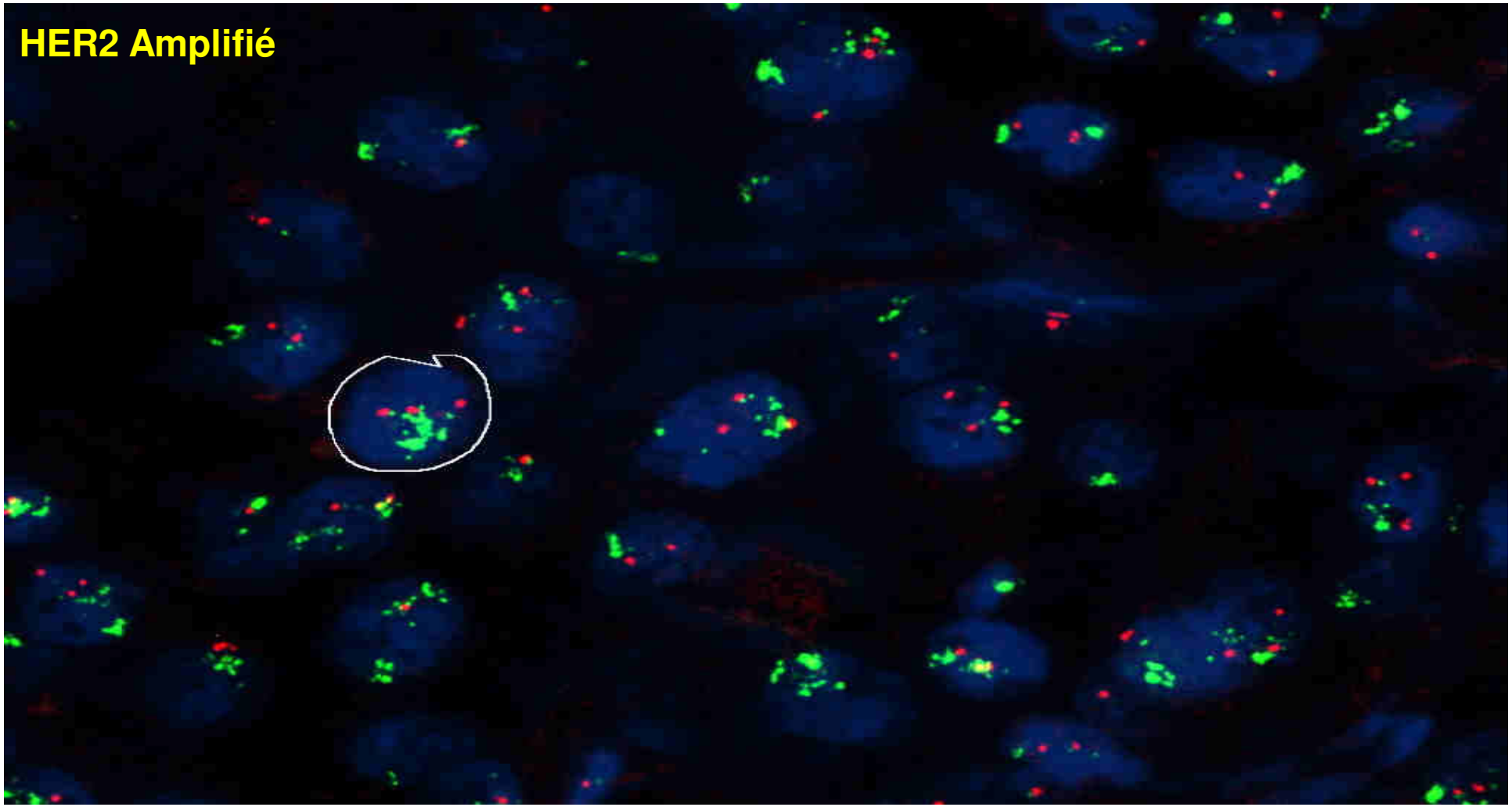


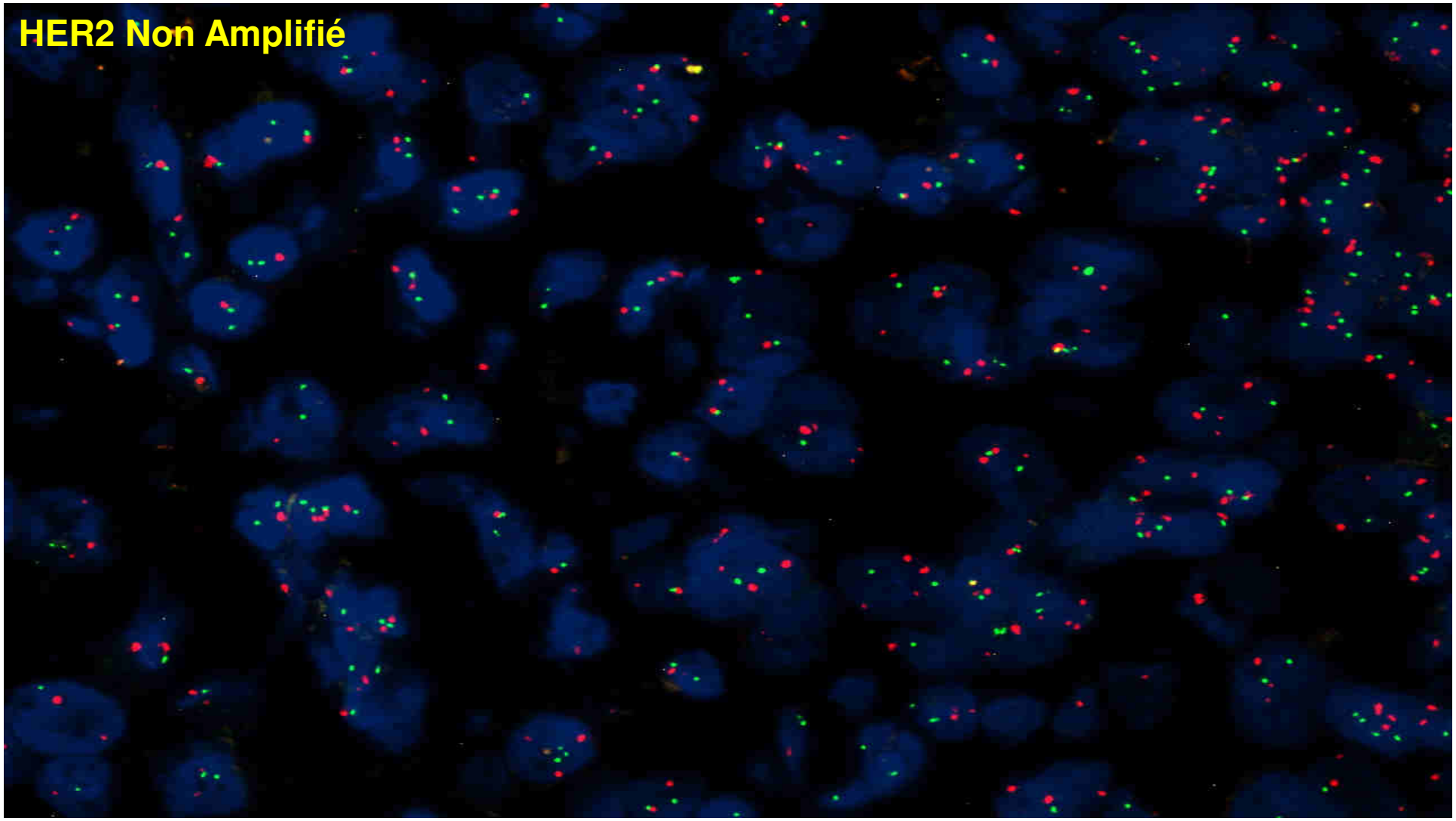
Sonde EGFR_CEP7

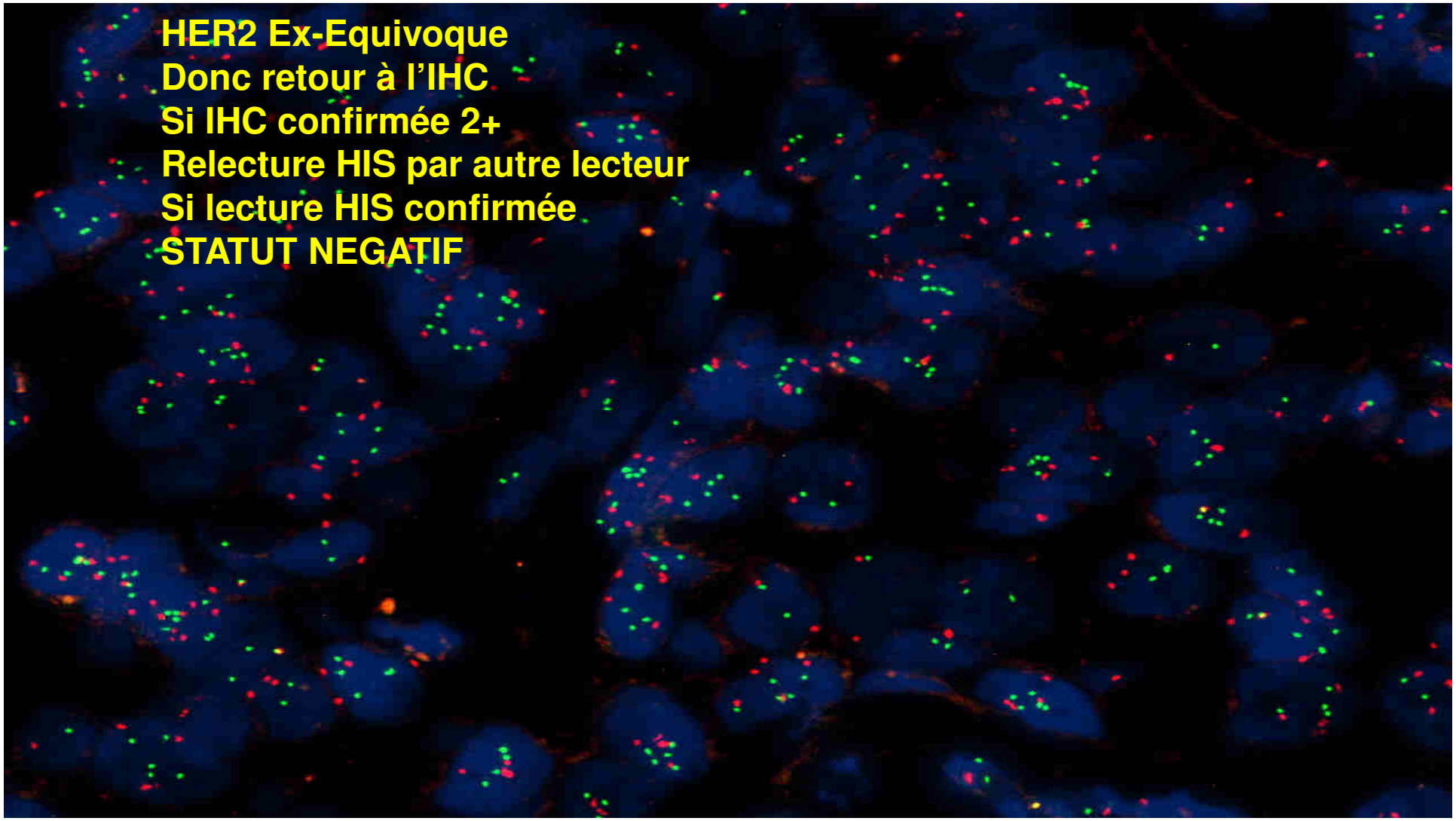


Sonde ALK



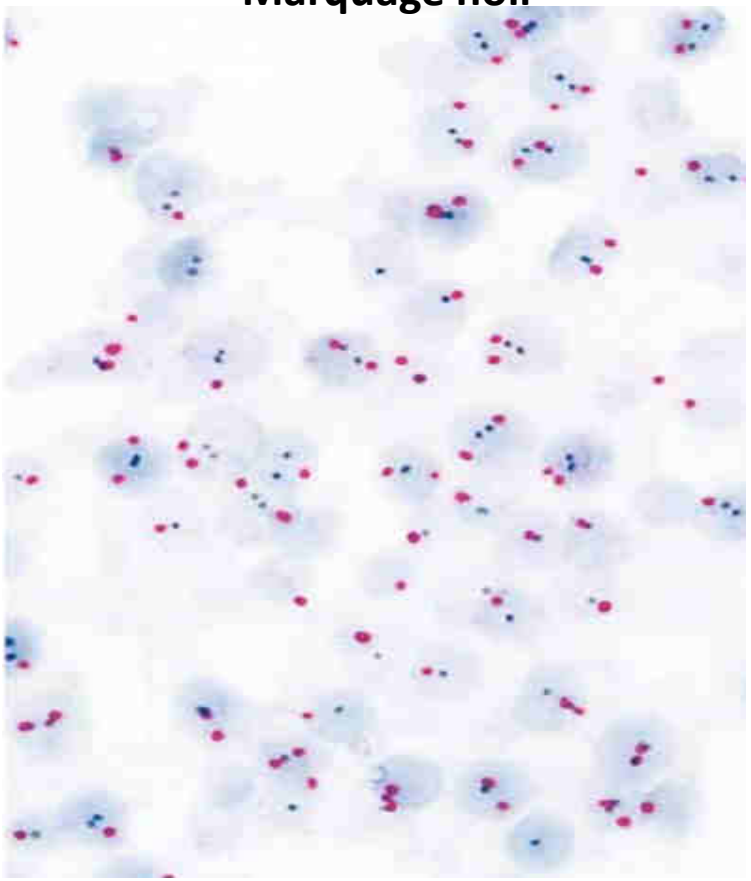

HER2 Amplifié


HER2 Non Amplifié


HER2 Ex-Equivoque
Donc retour à l'IHC
Si IHC confirmée 2+
Relecture HIS par autre lecteur
Si lecture HIS confirmée
STATUT NEGATIF

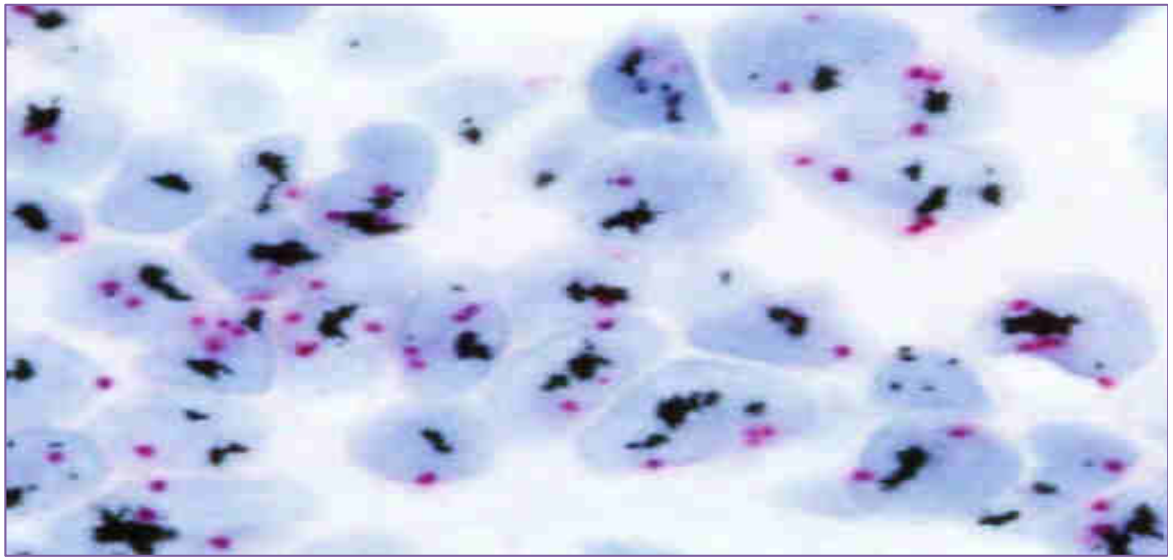
DDISH
Dual-color Dual-hapten In Situ Hybridization

ERBB2 **réduction de grains d'Argent**
Marquage noir



Non amplifié

CEP 17 **oxydation du FAST-Red**
Marquage rouge



Amplifié

Application à la détection d'une amplification du gène *ERBB2* dans le cancer du sein

- Participer aux EEQ
  - AFAQAP (évaluation de la lecture)
  - UKNEQAS (évaluation de la lecture et de la technique)

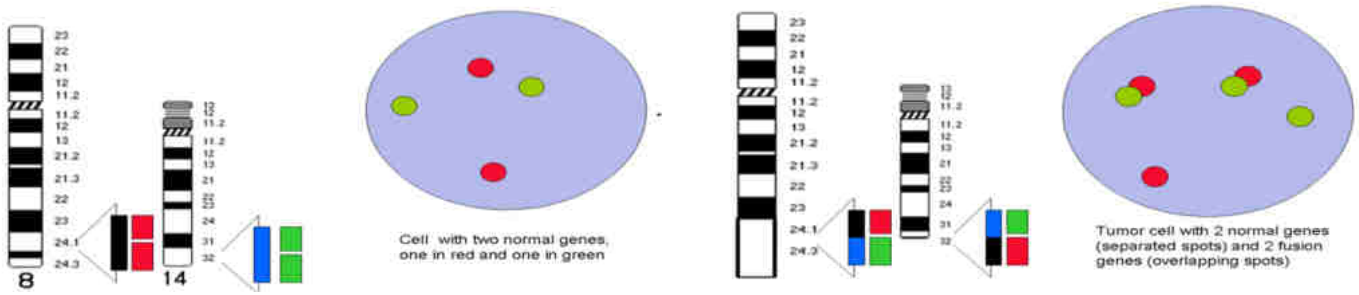
- Comparer ses résultats à ceux de la littérature et aux résultats nationaux
  - HERFRANCE

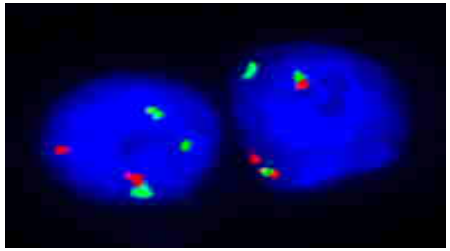
Application à la détection d'un réarrangement du gène *ALK* dans le cancer du poumon

- Les cas sont testés en IHC en première intention
- si l'on utilise le clone 4A5:
  - Sont testés tous les cas montrant une IHC positive (quelle que soit l'intensité)
- Si l'on utilise le clone D5F3
  - selon les recommandations de l'AFAQAP, les cas montrant une intensité forte peuvent être considérés réarrangés sans contrôle par FISH, les cas avec intensité modérée doivent être testés
- Dans tous les cas:
  - Les patients jeunes
  - Les patients avec un type histologique évocateur

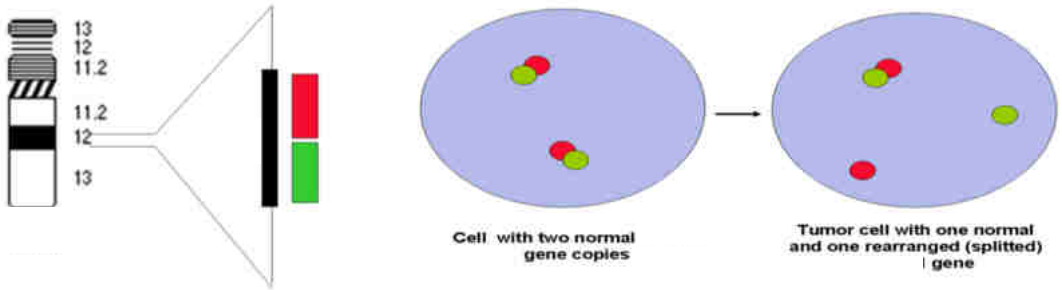
Application à la détection d'un réarrangement du gène *ALK* dans le cancer du poumon

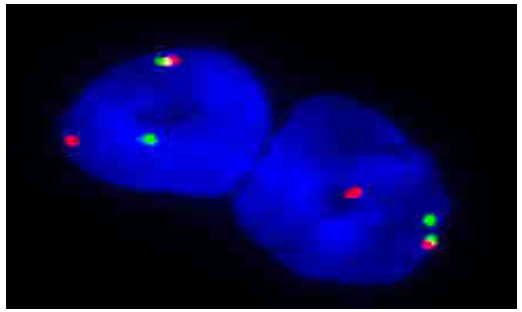
Détection des réarrangements par sondes de fusion:





Détection des réarrangements par sondes de dissociation (break-apart):

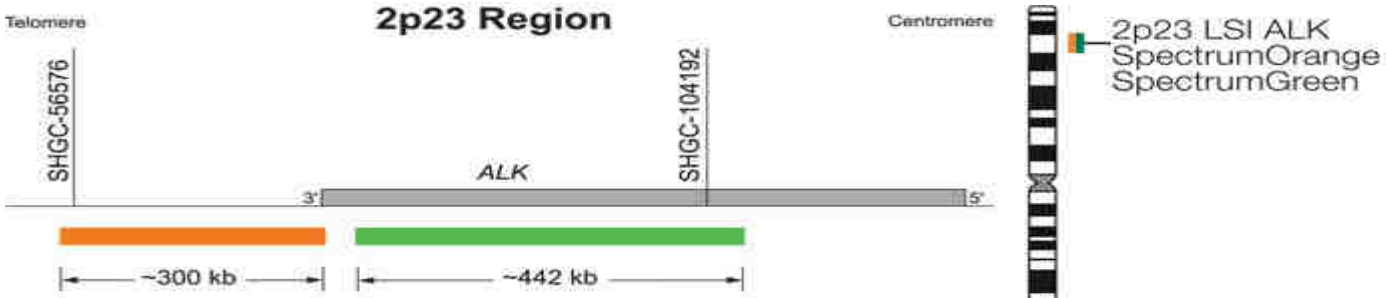


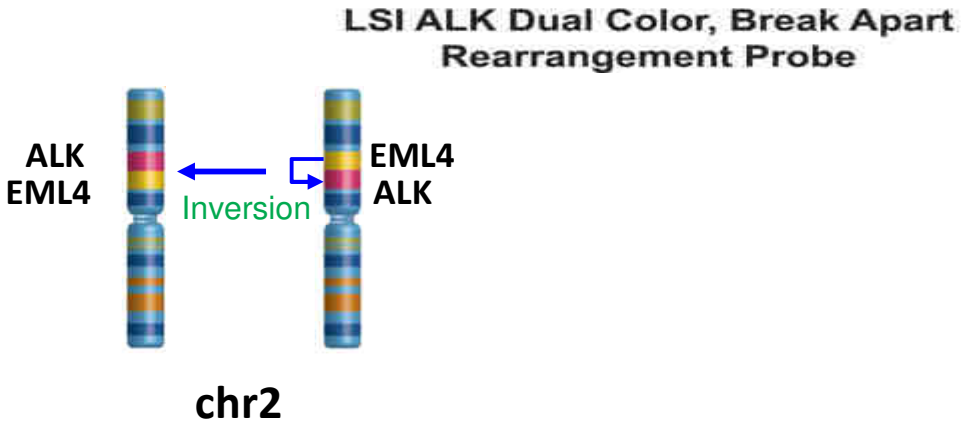


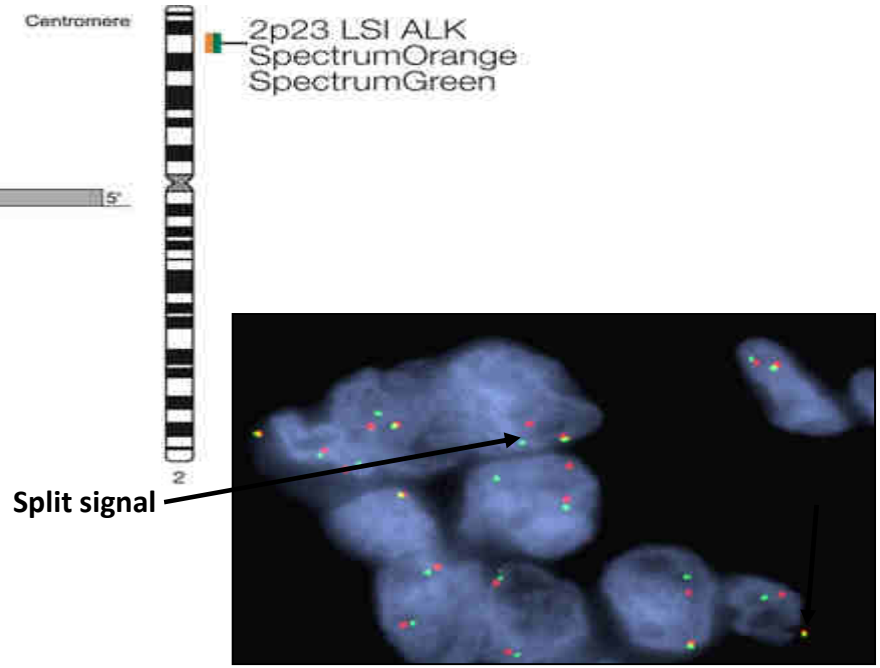
Source: Livre G.Kocian Diagnostic Cytopathology Essentials, 2013 _ Chapitre: A.Valent: Molecular Methods

Application à la détection d'un réarrangement du gène *ALK* dans le cancer du poumon

CJP: Sonde LSI ALK Dual color, Break Apart rearrangement probe Vysis Abbott





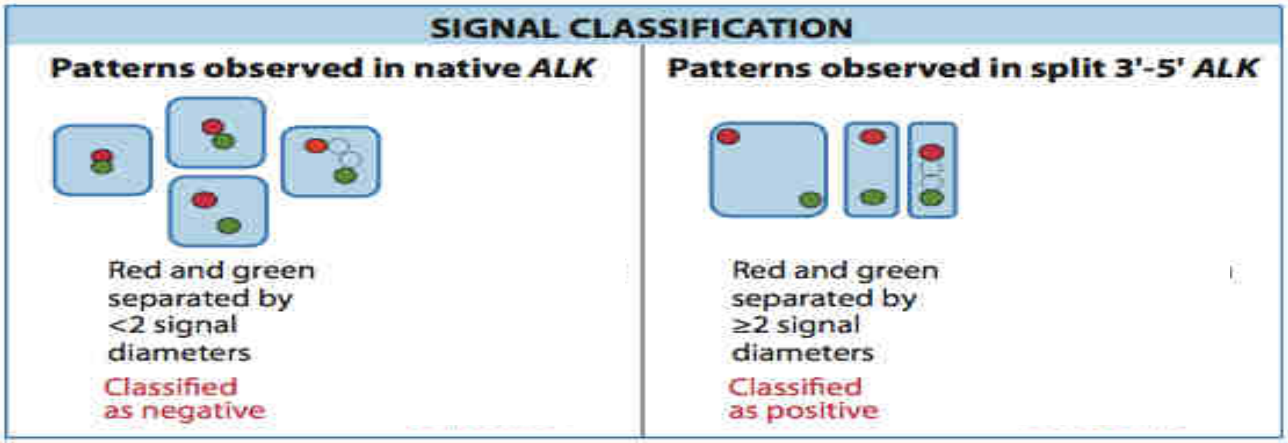


[1]Shaw AT et al. J Clin Oncol 2009;27:4247–4253

Application à la détection d'un réarrangement du gène *ALK* dans le cancer du poumon

- Regarder la lame HPS et IHC avec un médecin pour cibler les zones à compter
- Repérer une zone de carcinome invasif à l'objectif X10
- Lecture directe ou lecture avec scanner
- Compter les signaux pairs, rouges isolés, verts isolés par noyau à l'objectif X60 ou X100 au filtre double rouge_vert (FITC_Texas Red) dans 50 noyaux dans diverses zones de la lame
- Appliquer les recommandations en vigueur pour conclure sur le statut du gène *ALK*

Evaluation du score ALK : poumon



IASLC

Conquering Thoracic Cancers Worldwide

EDITED BY
MING SOUND TSAO, MD, FRCPC
FRED R. HIRSCH, MD, PHD
YASUSHI YATABE, MD, PHD

IASLC ATLAS OF
ALK TESTING IN LUNG CANCER

Evaluation du score ALK : poumon

ALK	
Positif	≥ 15% de cellules avec dissociation de plus de 2 diamètres d'un signal ou un signal rouge solitaire
Négatif	< 15% de cellules avec dissociation

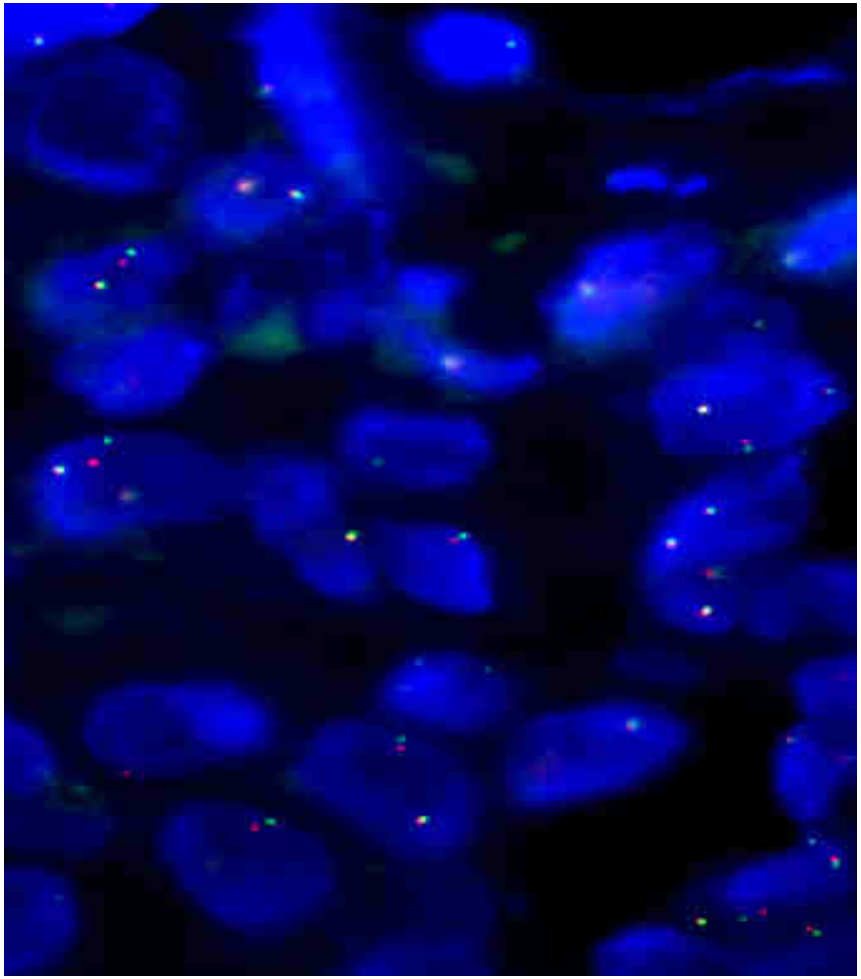
Virchows Arch (2012) 461:245–257
DOI 10.1007/s00428-012-1281-4

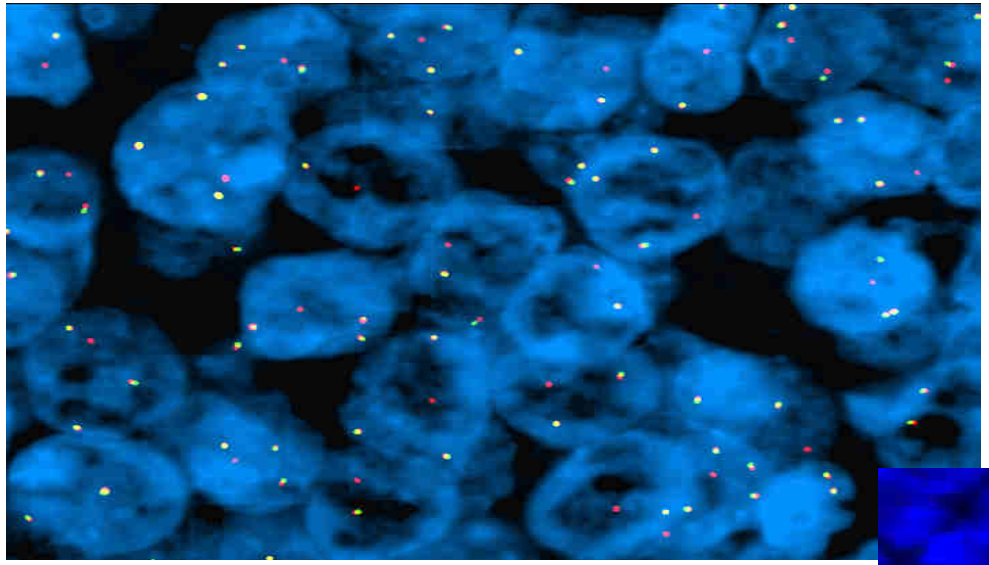
REVIEW AND PERSPECTIVES

EML4-ALK testing in non-small cell carcinomas of the lung: a review with recommendations

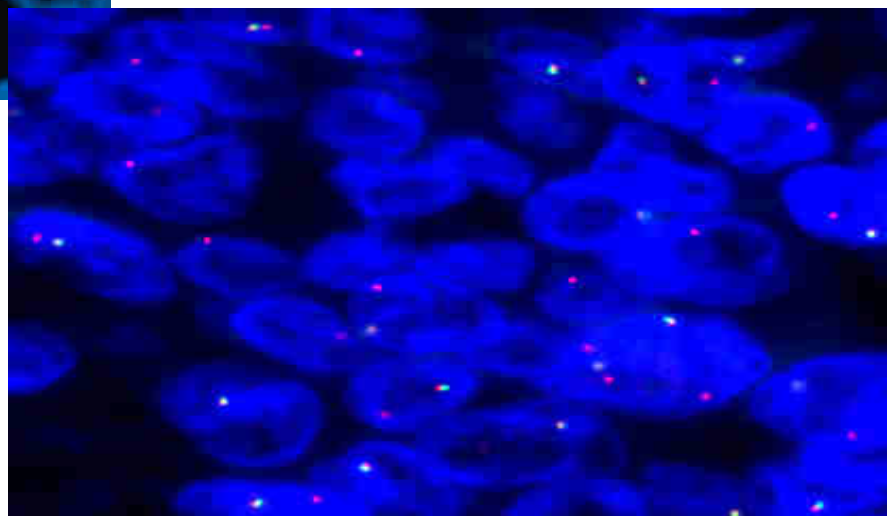
Erik Thunnissen · Lukas Bubendorf · Manfred Dietel · Göran Elmberger · Keith Kerr · Fernando Lopez-Rios · Holger Moch · Wlodzimierz Olszewski · Patrick Pauwels · Frédérique Penault-Llorca ·

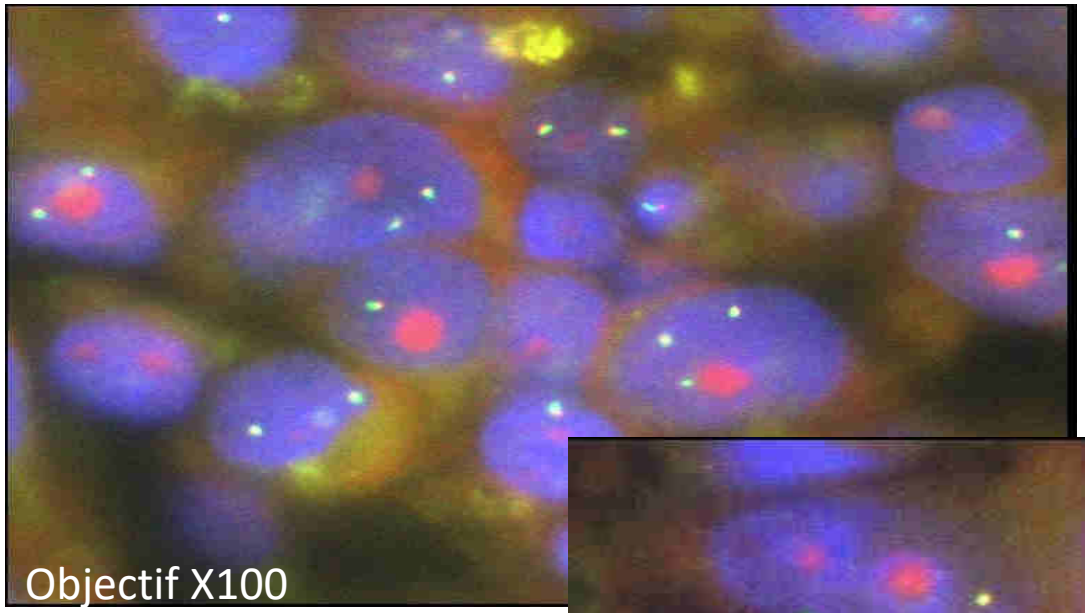
ALK: dissociation de la sonde
par inversion: les spots rouges
et verts sont séparés mais restent
en proximité





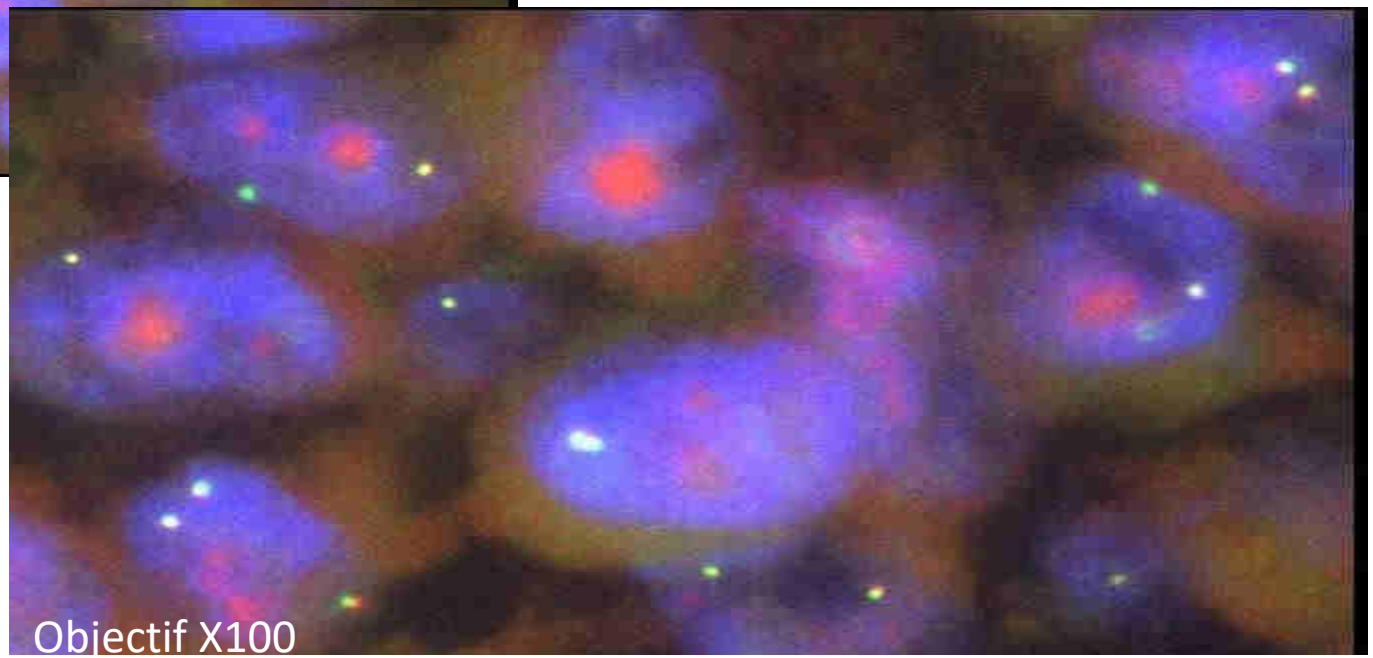
ALK: dissociation suivie
par une délétion:
Spot solitaire rouge



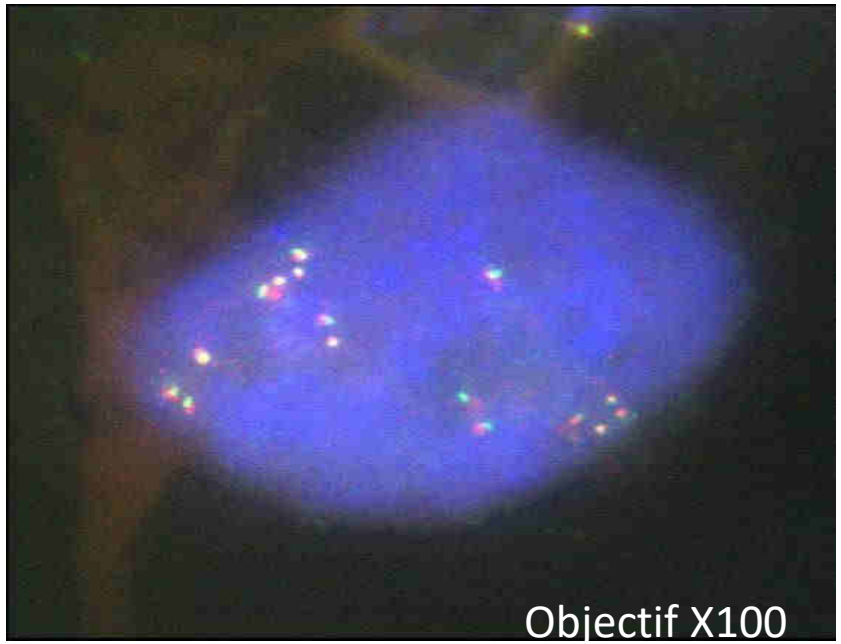


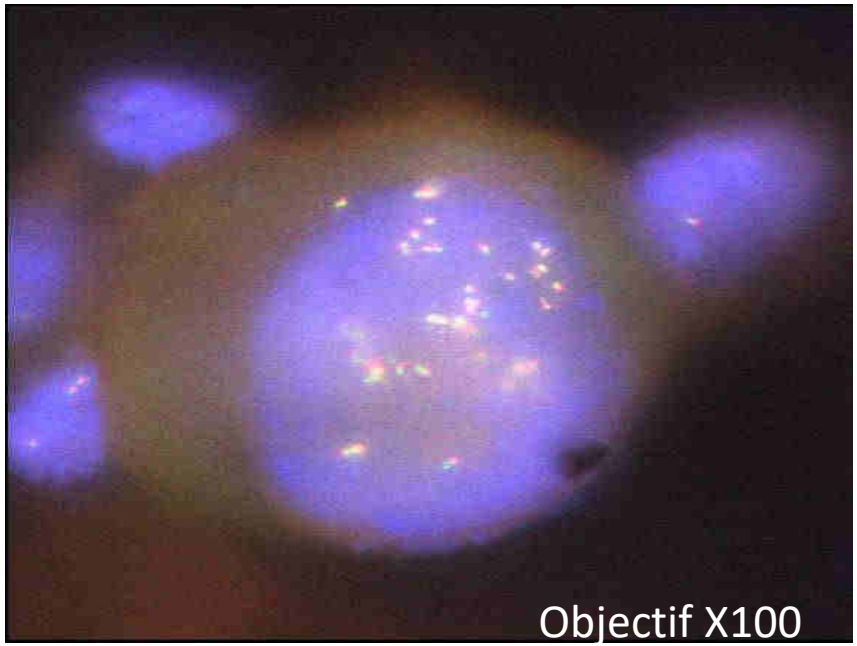
Absence de réarrangement

CJP: Sonde LSI ALK Dual color, Break Apart rearrangement probe Vysis Abbott



CJP: Sonde LSI ALK Dual color, Break Apart rearrangement probe Vysis Abbott





Amplification du gène ALK sans translocation

Evaluation du score ALK ou d'autres gènes de dissociation

NE PAS EVALUER UNE DISSOCIATION DANS LES CAS DE POLYSOMIE ELEVEE ou dans les cas d'AMPLIFICATION du gène

Application à la détection d'un réarrangement du gène *ALK* dans le cancer du poumon

- Contrôle qualité organisé depuis 6 ans par l'ESP
  - Cas à techniquer et interpréter en IHC et FISH, plus des cas numérisés à interpréter
  - Évaluation de la lecture, de la technique et des CRs

The Relevance of External Quality Assessment for Molecular Testing for *ALK* Positive Non-Small Cell Lung Cancer: Results from Two Pilot Rounds Show Room for Optimization

Lien Tembuyser[1], Véronique Tack[1], Karen Zwaenepoel[2], Patrick Pauwels[2], Keith Miller[3], Lukas Bubendorf[4], Keith Kerr[5], Ed Schuuring[6], Erik Thunnissen[7], Elisabeth M. C. Dequeker[1*]

1 Department of Public Health and Primary Care, Biomedical Quality Assurance Research Unit, KU Leuven – University of Leuven, Leuven, Belgium, 2 Department of Pathology, Antwerp University Hospital, Edegem, Belgium, 3 UK NEQAS ICC & ISH, London, United Kingdom, 4 Institute for Pathology, Basel University Hospital, Basel, Switzerland, 5 Department of Pathology, Aberdeen Royal Infirmary, Aberdeen, United Kingdom, 6 Department of Pathology and Medical Biology, University of Groningen, Groningen, the Netherlands, 7 Department of Pathology, VU University Medical Center, Amsterdam, The Netherlands

PLOS ONE November 2014 | Volume 9 | Issue 11 | e112159

Règles d'interprétation générales

- Bien connaitre ses sondes
  - Exp: HER2 Abbott: HER2 en rouge et CEP 17 en vert
  - HER2 Zytovision: HER2 en vert et CEP17 en rouge
  - Profil positif pour ALK Abbott: séparation (3' rouge)_(5' vert) ou (3' rouge) isolé
  - Profil positif pour ROS1 break-Apart Zytovision: séparation (3' vert)_ (5' rouge) ou (3' vert) isolé
- Effectuer annuellement un volume minimal de tests
  - 250 IHC_100 HIS
- Participer aux EEQ
  - AFAQAP, UKNEQAS, EQA de l'ESP
- Comparer ses résultats à ceux de la littérature et aux résultats nationaux
  - Exp: HERFRANCE, rapports INCa

Question Anne CAYRE

Quelles sont les affirmations justes?

a. Les biomarqueurs étudiés par HIS dans le cancer du sein sont RE, RP et HER2
b. Les biomarqueurs étudiés par HIS dans le cancer du poumon sont ALK, ROS1et PDL1
c. Les anomalies détectées par HIS peuvent être des amplifications et des réarrangements
d. Les sondes break-apart détectent les délétions
e. L'étape la plus critique de la technique d'HIS est la digestion à la protéase

Question Anne CAYRE

Quelles sont les affirmations justes?

a. Les biomarqueurs étudiés par HIS dans le cancer du sein sont RE, RP et HER2

b. Les biomarqueurs étudiés par HIS dans le cancer du poumon sont ALK, ROS1et PDL1

c. Les anomalies détectées par HIS peuvent être des amplifications et des réarrangements

d. Les sondes break-apart détectent les délétions

e. L'étape la plus critique de la technique d'HIS est la digestion à la protéase

Question Anne CAYRE

Quelles sont les affirmations justes?

a. Les techniques d'HIS peuvent être révélées par fluorescence
b. Une amplification du gène *ERBB2* en HIS est répondue lorsque le ratio *ERBB2*/CEP17 est ≤2
c. Un réarrangement du gène *ALK* est répondu en HIS lorsque le nombre de cellules réarrangées est ≥15%
d. Un réarrangement du gène *ALK* est répondu en HIS lorsque le nombre de copie du gène *ALK* est ≥15
e. Un réarrangement du gène *ALK* est répondu en HIS lorsque le nombre de cellules réarrangées est ≥6

Question Anne CAYRE

Quelles sont les affirmations justes?

a. Les techniques d'HIS peuvent être révélées par fluorescence
b. Une amplification du gène *ERBB2* en HIS est répondue lorsque le ratio *ERBB2*/CEP17 est ≤2
c. Un réarrangement du gène *ALK* est répondu en HIS lorsque le nombre de cellules réarrangées est ≥15%
d. Un réarrangement du gène *ALK* est répondu en HIS lorsque le nombre de copie du gène *ALK* est ≥15
e. Un réarrangement du gène *ALK* est répondu en HIS lorsque le nombre de cellules réarrangées est ≥6