



# Leica Bond Oracle™ HER2 IHC System

Guide d'interprétation - Tissu mammaire

# Leica Bond Oracle™ HER2 IHC System

## Guide d'interprétation

Destiné au système de marquage Immunohistochimie Leica BOND de Leica Biosystems, entièrement automatisé.

Ce produit (Code de produit TA9145) est conçu pour la réalisation de 60 tests (150 lames) :

60 lames test avec l'anticorps primaire HER2

60 lames test avec le contrôle négatif HER2

15 lames de contrôle HER2 avec l'anticorps primaire HER2

15 contrôles tissulaires positifs en interne avec l'anticorps primaire HER2



**Pour plus d'informations interactives et exercices d'apprentissage, connectez-vous à :**  
[www.LeicaBiosystems.com/TA9145-elearning](http://www.LeicaBiosystems.com/TA9145-elearning)

# Table des matières

<b>Introduction</b> .....	<b>2</b>
Kit Leica Bond Oracle HER2 IHC System .....	2
Données de concordance .....	2
Guide d'interprétation du kit Leica Bond Oracle HER2 IHC System .....	2
<b>Aperçu de l'HER2</b> .....	<b>3</b>
Algorithme de test HER2 .....	4
Expression de l'oncoprotéine HER2 déterminée par immunohistochimie .....	5
Statut du gène HER2 déterminé par hybridation in situ .....	5
<b>Composants du kit Leica Bond Oracle HER2 IHC System</b> .....	<b>6</b>
<b>Lames de Contrôles Oracle HER2</b> .....	<b>7</b>
Profils des Lames de Contrôles Oracle HER2 .....	7
Reproductibilité exceptionnelle lames de contrôle .....	8
Données de caractérisation des lignées cellulaires .....	8
<b>Contrôles tissulaires en interne</b> .....	<b>9</b>
Contrôle tissulaire positif en interne .....	9
Contrôle tissulaire négatif en interne .....	9
<b>Considérations techniques et recommandations</b> .....	<b>10</b>
Manipulation des échantillons .....	10
Fixation, traitement et inclusion .....	10
Préparation des coupes de tissus .....	10
Paramètres par défaut du protocole .....	10
<b>Interprétation du marquage Oracle HER2 IHC</b> .....	<b>12</b>
Directives de notation du Leica Bond Oracle HER2 IHC .....	12
Concernant les directives ASCO/CAP .....	12
Expression de HER2 dans des tissus normaux .....	13
<b>Atlas des marquages Leica Bond Oracle HER2 IHC</b> .....	<b>14</b>
Oracle HER2 Profiling dans des tumeurs .....	14
Profils des tumeurs – Marquage à ne pas rapporter .....	15
Profils des tumeurs - Marquage à rapporter .....	16
Artefacts de marquage .....	20
Système de suivi des données .....	23
<b>Kit Leica Bond Oracle HER2 IHC System - Liste de contrôle</b> .....	<b>24</b>

# Introduction

## Kit Leica Bond Oracle HER2 IHC System

Le kit Leica Bond Oracle HER2 IHC System est un dosage semi-quantitatif immunohistochimique qui permet de déterminer le statut des oncoprotéines HER2 (récepteur 2 du facteur de croissance épidermique humain) dans les tissus de cancer du sein humain préparés pour une évaluation histologique. Le kit Leica Bond Oracle HER2 IHC System est indiqué comme aide à l'évaluation des patients pour lesquels un traitement à l'Herceptin® (trastuzumab) est envisagé (voir la notice de l'Herceptin). Les décisions relatives au traitement à l'Herceptin® doivent être prises dans le contexte des antécédents cliniques du patient.

Le kit Leica Bond Oracle HER2 IHC System contient les composants nécessaires à la réalisation d'une procédure de marquage immunohistochimique pour des tissus fixés au formol et inclus dans de la paraffine. Selon l'incubation avec l'anticorps primaire HER2 (clone CB11), ce système applique la technologie Compact Polymer™ prête à l'emploi. La conversion enzymatique du chromogène ajouté par la suite la formation d'un produit de réaction visible sur le site antigénique. Les coupes de tissus sont contre-colorées, déshydratées, lavées et montées. Les résultats sont interprétés en utilisant la microscopie à fond clair. Des lames de contrôle comprenant quatre lignées cellulaires de cancer du sein humain, fixées au formol et incluses dans de la paraffine, sont fournies pour valider les marquages. Les quatre lignées cellulaires montrent l'expression de l'oncoprotéine HER2 aux intensités 0, 1+, 2+ et 3+. L'intensité de marquage de ces lignées cellulaires a été corrélée à la fois à la charge du récepteur de l'oncoprotéine HER2 par cellule et au statut du gène du HER2.

## Données de concordance

Des données cliniques fiables, cohérentes et semi-quantitatives du HER2 nécessitent un dosage hautement reproductible réalisé avec précision et qui forme un système complet. L'évaluation de la qualité en externe au niveau de l'immunohistochimie du HER2 confirme les avantages de l'utilisation d'un système standardisé sur une alternative d'analyse développée en interne. De nombreux tests durant les cycles, entre les processus, entre laboratoires et entre observateurs ont montré des taux exceptionnellement élevés de reproductibilité pour le kit Leica Bond Oracle HER2 IHC System. La fabrication complète des composants associée à l'automatisation complète Bond Leica a permis l'amélioration des normes d'uniformité de fabrication de lot à lot et la précision des dosages (voir le mode d'emploi du kit Leica Bond Oracle HER2 IHC System pour une utilisation des données de précision et de reproductibilité à des fins cliniques).

## À quoi comparer Oracle ?

Automates comparés	Dako HercepTest	Kit Leica Bond Oracle HER2 IHC System (CB11)	Ventana Pathway (CB11)	Ventana Pathway (4B5)
Produits utilisés	Dosage d'essai clinique à l'Herceptin	Dako HercepTest	Dako HercepTest	Ventana Pathway (CB11)
Taille des échantillons	548	431	450	321
Concordance 2x2*	78,6 %	92,3 %	92,4 %	89,4 %
Concordance 3x3 <sup>#</sup>	69,2 %	86,5 %	88,4 %	80,7 %

Les caractéristiques de performance \* 2x2 : 0 et 1+ = négatif, 2+ et 3+ = positif #3x3 : 0 et 1+ = négatif, 2+ = équivoque; 3+ = positif

## Guide d'interprétation du kit Leica Bond Oracle HER2 IHC System

Ce document est fourni à titre indicatif pour aider les scientifiques et les pathologistes à obtenir des résultats précis, cohérents et reproductibles.

Le Guide d'interprétation vous familiarisera avec les exigences concernant les notations des carcinomes mammaires marqués avec le kit Leica Bond Oracle HER2 IHC System et l'interprétation des lames contrôles Oracle HER2.

Le Guide d'interprétation comprend :

- Des conseils techniques pour garantir la haute qualité de marquage HER2 et un débit efficace dans votre laboratoire
- Un synopsis du mode d'emploi du kit Leica Bond Oracle HER2 IHC System
- Des directives pour l'interprétation des lames contrôles Oracle HER2
- Des exemples des divers niveaux d'expression de la protéine HER2 dans les cancers du sein humains

Une consultation et un examen continu du Guide d'interprétation du kit Leica Bond Oracle HER2 IHC System procurent une base solide pour évaluer les lames marquées au moyen du kit Leica Bond Oracle HER2 IHC System.

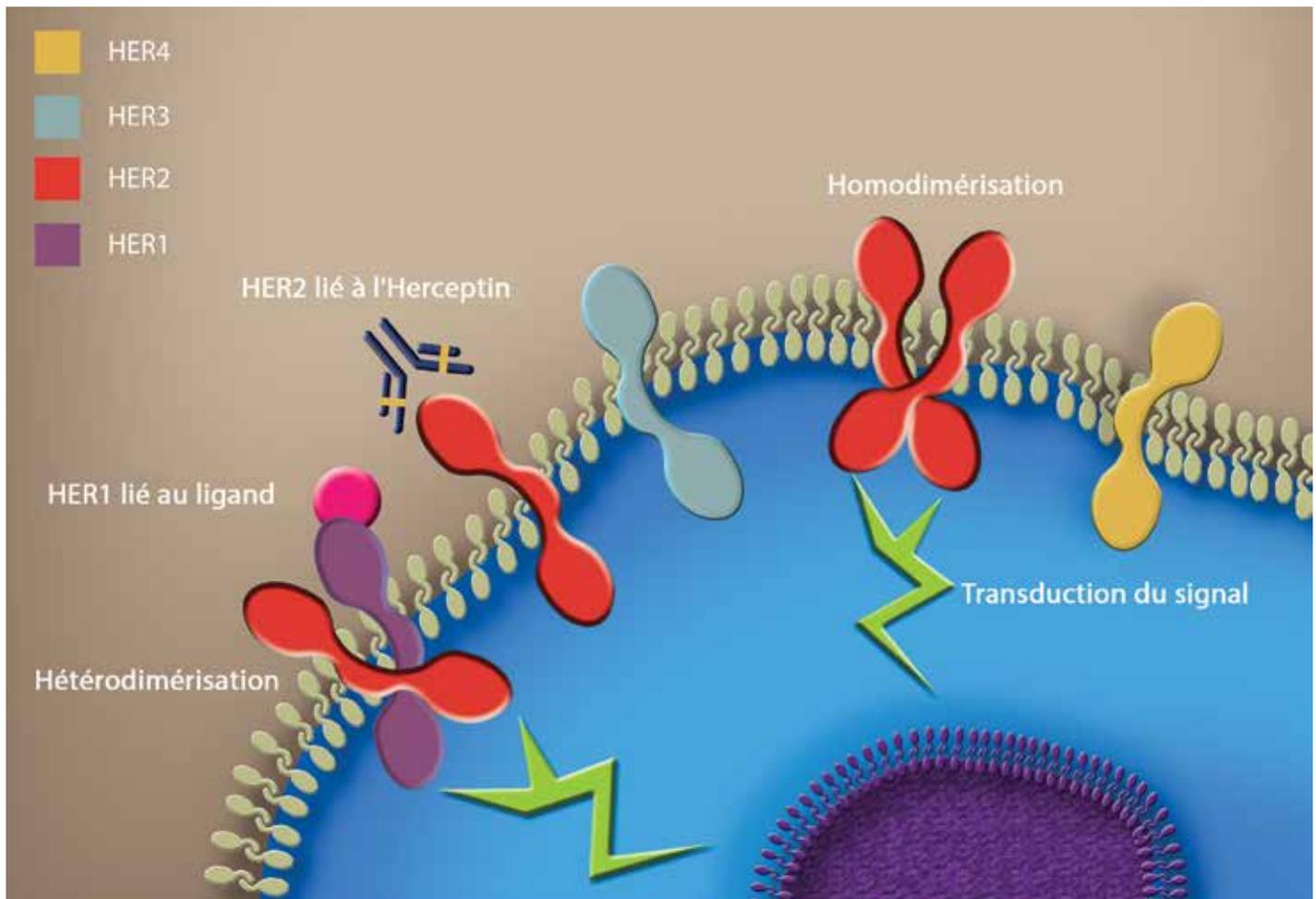
Herceptin est une marque déposée de Genentech, Inc.

# ■ Présentation de la protéine HER2

La protéine HER2, codée par le gène *c-erb-B2*, est l'une des quatre oncoprotéines appartenant à la famille des récepteurs humains du facteur de croissance épidermique (HER1-4) des tyrosines kinases et est surexprimée dans 10 à 20 % des cas de cancers du sein invasifs<sup>1,2,3</sup>. Les membres de la famille HER des récepteurs forment des homo- et hétéro-dimères par l'intermédiaire de ligands, dont HER2 est le partenaire privilégié pour la dimérisation<sup>4</sup>.

La dimérisation des récepteurs de la famille HER initie des cascades d'autophosphorylation qui activent à leur tour plusieurs voies de signalisation cellulaire, y compris les cascades Ras/Raf/MAPK et P13K/Akt<sup>5</sup>. Il a été démontré que la modification des voies de transcription des gènes qui en résulte affecte des processus aussi divers que la division, l'angiogenèse, la motilité et l'adhésion cellulaires<sup>5</sup>.

La surexpression de la protéine HER2 conduit à une activation excessive de ces voies et peut contribuer à une croissance plus agressive associée à ces cellules tumorales<sup>6</sup>. Une surexpression de la protéine HER2 est associée à un mauvais pronostic, dont la réduction de la survie sans maladie et la résistance à certains agents chimiothérapeutiques<sup>7</sup>.



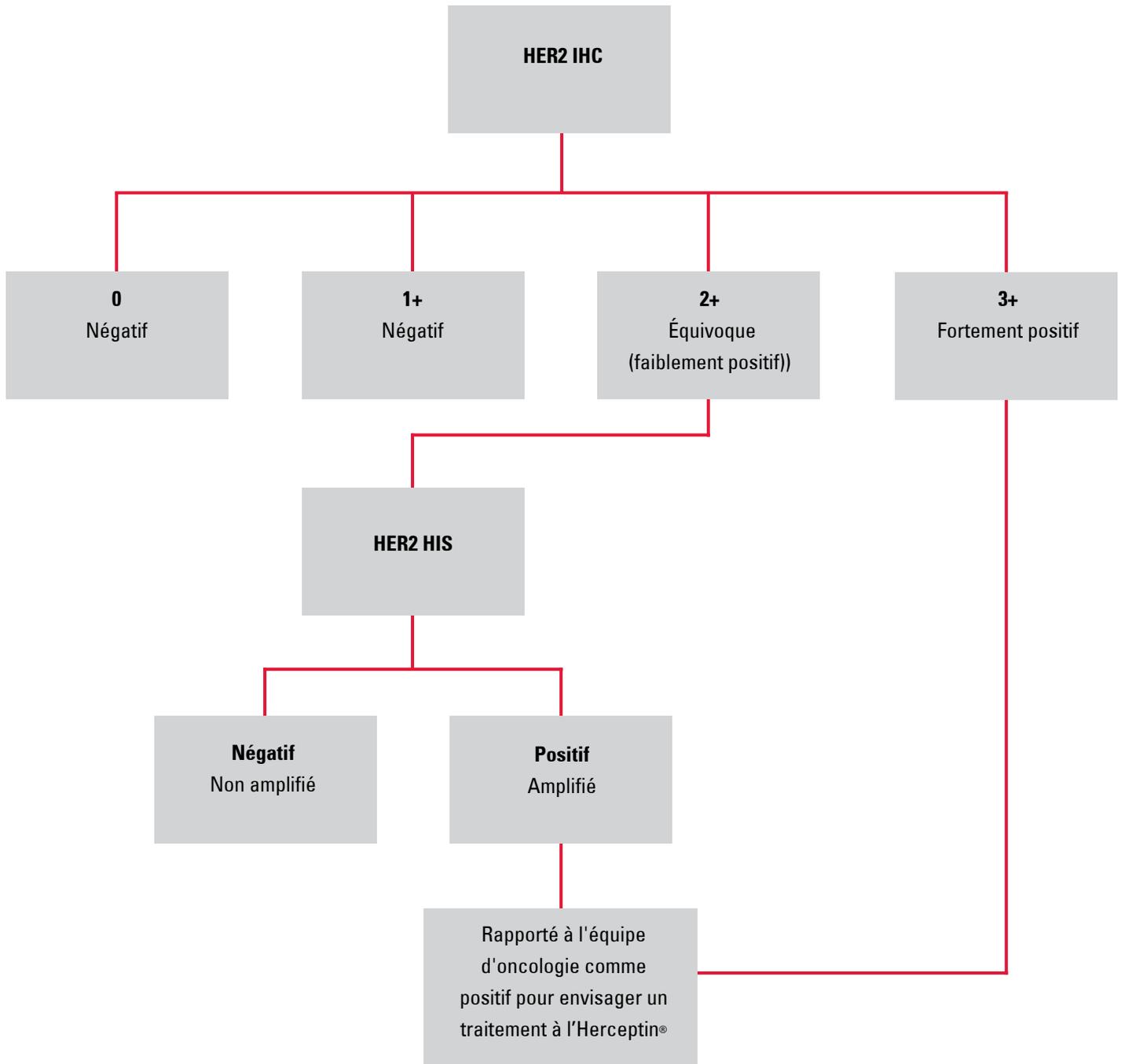
## Références

- 1 Pawlowski V, Revillion F, Hebbar M, et al. Prognostic value of the Type I growth factor receptors in a large series of human primary breast cancers quantified with a real-time reverse transcription-polymerase chain reaction assay. *ClinCancer Res*. 2000 Nov(6): 4217-4225.
- 2 Lonardo F, Di Marco E, King CR, et al. The normal *erbB-2* product is an atypical receptor-like tyrosinase kinase with constitutive activity in the absence of a ligand. *New Biologist*. 1990; 2:992-1003.
- 3 Walker RA, Bartlett JMS, Dowssett M, Ellis IO, Hanby AN, Jasani B, Miller K and Pinder SE. HER2 Testing in the UK- Further Update To Recommendations. *Journal of Clinical Pathology* 2008
- 4 Piccart-Gebhart MJ, Procter M, Leyland-Jones B et al. Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med*. 2005 Oct 20; 353(16): 1652-4.
- 5 Yarden Y, Sliwkowski MX Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2001 Feb; 2 (2): 127-37.
- 6 Graus-Porta D, Beerli RR, Daly JM, Hynes NE. ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signalling. *EMBO J*. 1997 Apr 1; 16(7): 1647-55.
- 7 Perez EA, Suman VJ, Davidson NE, et al. HER2 testing by local, central, and reference laboratories in specimens from the North Central Cancer Treatment Group N9831 intergroup adjuvant trial. *J Clin Oncol*. 2006 Jul 1;24(19): 3032-8.

## Algorithme de test du HER2

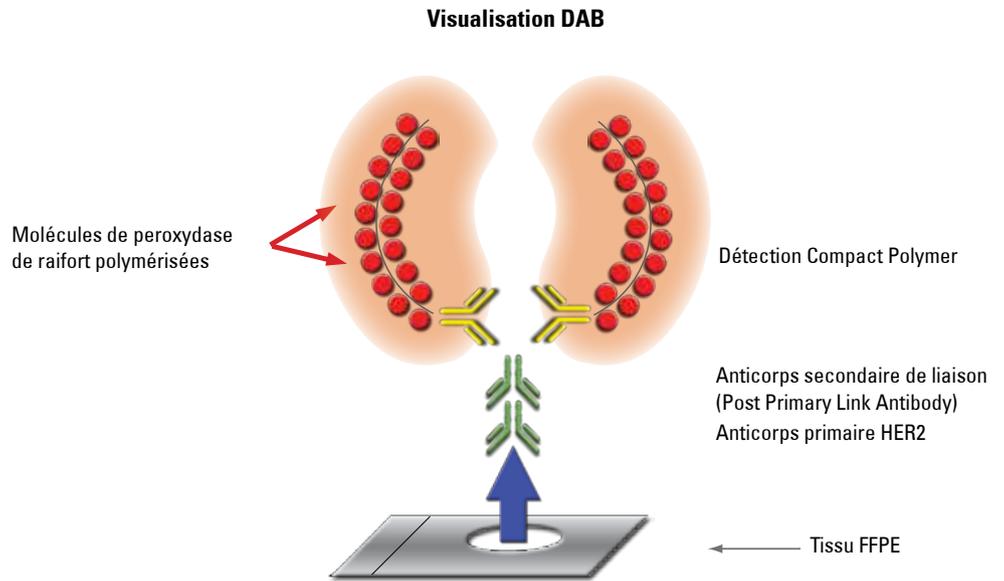
L'évaluation de première ligne des échantillons de patients au moyen du kit Leica Bond Oracle HER2 IHC System est utilisée pour déterminer les niveaux d'expression de l'oncoprotéine HER2 par l'intermédiaire de l'intensité de marquage immunopathologique (IHC) 0, 1+, 2+ et 3+. Les cas présentant des marquages faiblement positifs (2+) peuvent être considérés comme équivoques et renvoyés à un test d'hybridation in situ (HIS).

### Interprétation des résultats



## Expression de l'oncoprotéine HER2 déterminée par immunohistochimie

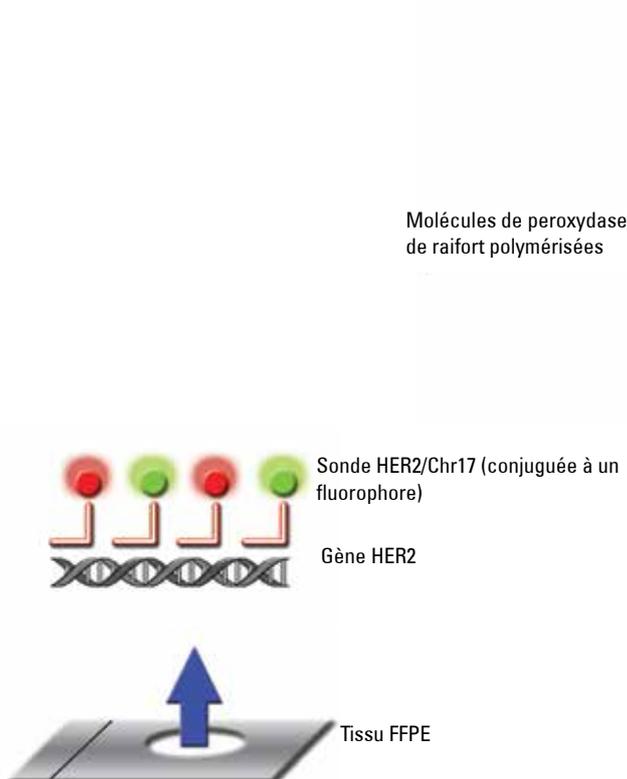
Les tests HER2 utilisant l'IHC ciblent l'oncoprotéine HER2 située sur la membrane cellulaire. Le kit Leica Bond Oracle HER2 IHC System utilise un anticorps primaire spécifique de la cible pour marquer la protéine HER2. Cet anticorps est ensuite visualisé à l'aide d'un système de détection Compact Polymer en plusieurs étapes.



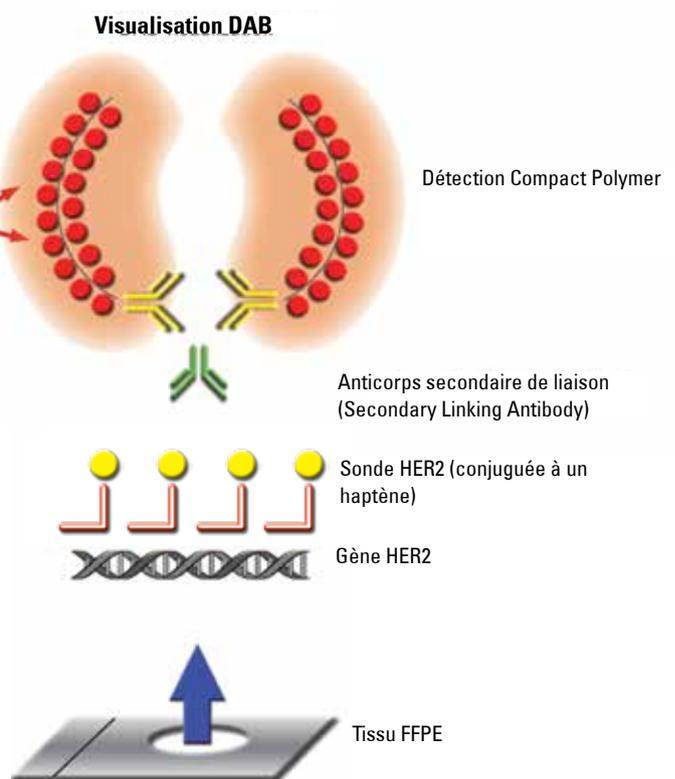
## Statut du gène HER2 déterminé par hybridation *in situ*

Les cas jugés équivoques (2+, faiblement positif) par le kit Leica Bond Oracle HER2 IHC System peuvent encore être évalués pour le statut du gène HER2 par hybridation *in situ* (HIS). Les techniques d'HIS utilisent des sondes HER2 marquées, détectées par fluorescence ou grâce à une visualisation chromogène, pour évaluer le statut d'amplification génique. Une énumération des signaux du chromosome 17 pour permettre un rapport du gène HER2 est également réalisée en utilisant ces techniques de marquage.

### à base de fluorescence



### à base de chromogène



# Composants du kit Leica Bond Oracle HER2 IHC System

## Blocage au peroxyde

Un blocage au peroxyde est utilisé dans les techniques IHC pour bloquer les peroxydases endogènes présentes au sein des tissu sur la coupe. Ceci est important car les peroxydases endogènes peuvent provoquer un bruit de fond non spécifique par l'association de la peroxydase de raifort (HRP) avec des composants polymères du système de détection.

## Contrôle négatif d'HER2

Le kit Leica Bond Oracle HER2 IHC System contient une IgG de souris prête à l'emploi à la même concentration que l'anticorps primaire HER2.

Il est important d'utiliser un anticorps de contrôle négatif pour chaque patient afin de confirmer l'absence de réactivité croisée du système de détection avec des cellules/composants cellulaires spécifiquement ciblés.

## Anticorps Primaire HER2

Le kit Leica Bond Oracle HER2 IHC System contient l'anticorps monoclonal de souris anti-HER2, clone CB11 purifié par affinité, sous un format entièrement optimisé et prêt à l'emploi. Le Clone CB11, développé à l'origine par Corbett et al., fabriqué exclusivement par Leica Biosystems Newcastle Ltd, est dirigé contre le domaine interne de l'oncoprotéine HER2.

Le suivi des performances du kit Leica Bond Oracle HER2 IHC System dans un essai clinique conforme à la FDA a montré un degré élevé de concordance avec le kit Dako HercepTest, en utilisant les directives d'interprétation commerciales recommandées.

Résultat de l'Oracle 2x2	Résultat du Dako 2x2		
	Négatif	Positif	Total
Négatif	269	23 *	292
Positif	10	129	139
Total	279	152	431

\* La concordance du kit Leica Bond Oracle HER2 IHC System pour le statut d'amplification génique de l'HER2, tel qu'évalué par hybridation fluorescente in situ (Vysis PathVysion), a montré une concordance à 100 % avec le FISH pour des cas dans la population critique de positifs à négatifs mis en surbrillance. AUCUN cas de gène amplifié n'a été identifié dans ce sous-groupe.

## Technologie Compact Polymer

Le système de détection Compact Polymer™ utilisé dans le kit Leica Bond Oracle HER2 IHC System fait partie d'une famille de nouvelles technologies de polymérisation contrôlée qui ont été spécifiquement développées pour préparer des conjugués polymères d'anticorps liés à HRP. Comme la gamme de produits Oracle intègre cette technologie polymère, le problème de marquage à la biotine endogène non spécifique constaté avec les systèmes de détection à la streptavidine/ biotine, n'apparaît pas ici.

## Visualisation DAB

Chromogène et tampon de substrat se combinent dans une réaction catalysée par les enzymes polymérisées pour produire un précipité brun qui est visualisé par microscopie a fond clair.

## Hématoxyline

La contre-coloration nucléaire à l'hématoxyline pour l'évaluation IHC de l'expression de HER2 doit être légère ; une contre-coloration excessive peut masquer les résultats de marquage et rendre l'interprétation difficile.

## Lames Contrôles HER2

Une des pierres angulaires du kit Leica Bond Oracle HER2 IHC System, les Oracle HER2 lames de contrôles, contiennent quatre lignées cellulaires de cancer du sein fixées au formol et incluses dans de la paraffine et exprimant l'oncoprotéine HER2 à des intensités de marquage de 0, 1+, 2+ et 3+. Les cellules sont habituellement traitées au moyen de la technologie de traitement Leica Peloris™ pour garantir une fabrication constante d'un lot à l'autre.

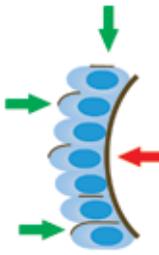
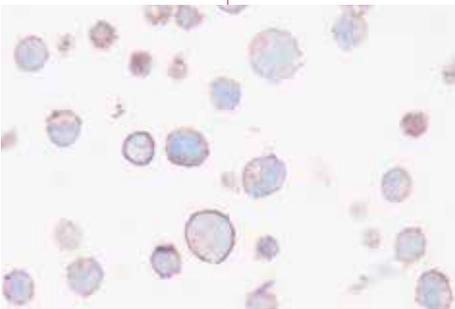
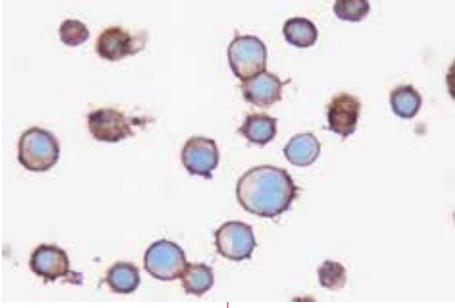
Les lignées cellulaires témoins HER2 ont été conçues comme contrôles de la procédure, pour confirmer la fiabilité de la procédure du kit Leica Bond Oracle HER2 IHC System. Elles valident :

- L'optimisation des réactifs et la performance du dosage
- L'application correcte du protocole
- Les performances de l'Instrument Leica BOND

# Oracle Lames de Contrôles HER2

## Oracle profils des Lames Contrôles HER2

Les niveaux d'expression de la protéine HER2 et leurs intensité de marquage associés pour les lignées cellulaires de contrôle HER2 sont représentés ci-dessous. La lignée cellulaire MDA-MB-231 (0) représente le niveau équivalent de l'expression trouvée dans l'épithélium canalaire normal.

<b>0</b>			Aucun marquage dans la lignée cellulaire MDA-MB-231 (0)
<b>1+</b>			Présence d'un marquage faible/à peine perceptible, brun, incomplet de la membrane cellulaire dans la lignée cellulaire MDA-MB-175
<b>2+</b>			Présence d'un marquage faible à modéré, brun, complet de la membrane cellulaire dans la lignée cellulaire MDA-MB-453 (2+)
<b>3+</b>			Présence d'un marquage de forte intensité brun, complet de la membrane cellulaire dans la lignée cellulaire SK-BR-3 (3+)

**Remarque importante :** l'une des caractéristiques de la lignée cellulaire MDA-MB-175 (1+) est un modèle de croissance distinct dans lequel les cellules forment des groupes.

-  Ces groupes donnent lieu à une région à aspect de bordure en brosse luminale continue à travers l'amas de cellules. Le marquage de cette bordure en brosse est plus fort que pour le reste de la membrane cellulaire.
-  C'est le marquage faible à peine perceptible incomplet de la membrane cellulaire qui est le motif de marquage correct pour l'oncoprotéine HER2 (1+).

## Lames de contrôle exceptionnellement reproductibles

Les lames contrôles Oracle HER2 fournissent une méthode complète de contrôle pour évaluer la cohérence de la performance des dosages en utilisant un système unique de quatre lignées cellulaires.

L'ajout d'une lignée cellulaire 2+ procure une confiance supplémentaire, par un contrôle plus proche du potentiel de variation du test.

Chaque lames contrôles Oracle HER2 fait l'objet d'un test de CQ non destructif utilisant un système breveté d'interférométrie en lumière blanche<sup>1</sup>. Ce processus unique signifie qu'une épaisseur de coupe précise est maintenue et contrôle le marquage des lames de façon cohérente. Ce niveau de contrôle est essentiel à la réalisation d'une validation précise du test HER2 et de la performance continue des lots.

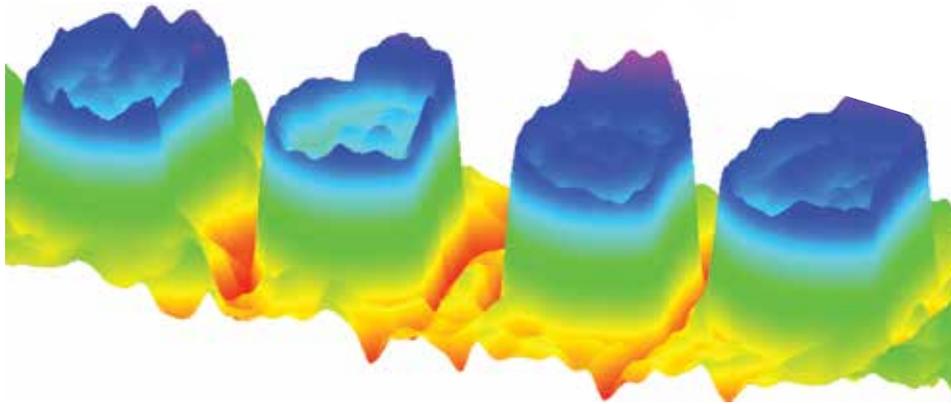


Image 3D de taches de lignée cellulaire de contrôle Oracle HER2 sur une lame de verre, générée par interférométrie en lumière blanche<sup>1</sup>. Cette technique procure une méthode précise pour lames de contrôles Oracle HER2 cohérentes qui se colorent de façon reproductible.

## Données de caractérisation des lignées cellulaires

Les lignées cellulaires de contrôle Oracle HER2 ont été entièrement caractérisées pour un profil immunohistochimique, le statut du gène HER2 et la charge en récepteur HER2.

Lignée cellulaire	Kit Leica Bond Oracle HER2 IHC System Profile	Charge du récepteur HER2 par cellule*	Statut d'amplification génique HER2 <sup>+</sup>	
			Nombre de copies HER2	Proportion génique HER2:Chr17
SK-BR-3	3+	4,3 x 10 <sup>5</sup>	13,35	3,55
MDA-MB-453	2+	1,4 x 10 <sup>5</sup>	5,73	2,05
MDA-MB-175	1+	6,3 x 10 <sup>4</sup>	3,33	1,20
MDA-MB-231	0	9,3 x 10 <sup>3</sup>	3,15	1,13

\* Analyse de la charge en récepteur HER2 évaluée par cytométrie en flux.

+Statut d'amplification génique HER2 évalué par sonde double (HER2 et chromosome 17) FISH (Vysis PathVysion).

### Références :

1. Barker C, et al. Non-destructive quality control of HER2 control cell line sections: the use of interferometry for measuring section thickness and implications for HER2 interpretation on breast tissue. Accepté pour publication le 27 fév. 2009; AIMM

# ■ Contrôles tissulaires en interne :

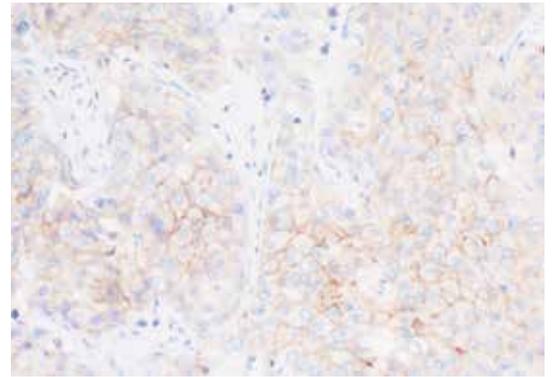
Les contrôles tissulaires en interne doivent être :

- Inclus dans chaque cycle de marquage
- Une biopsie ou des échantillons chirurgicaux de statut HER2 connu, fixés, traités et inclus de la même façon que les échantillons de patients

## Contrôle tissulaire positif en interne

Valide la préparation correcte des tissus et la techniques de marquages de ces derniers. Une coupe de contrôle positif idéale doit faire apparaître un faible marquage afin de pouvoir définir les changements subtils de la sensibilité de l'anticorps primaire.

Les composants tissulaires du contrôle positif connus ne doivent être utilisés que pour le contrôle de performance correct des tissus traités avec les réactifs du test, et NON comme une aide pour formuler une interprétation spécifique des échantillons du patient. Si le tissu de contrôle positif ne parvient pas à faire apparaître un marquage approprié, les résultats obtenus avec les échantillons du patient doivent être considérés comme non valides.

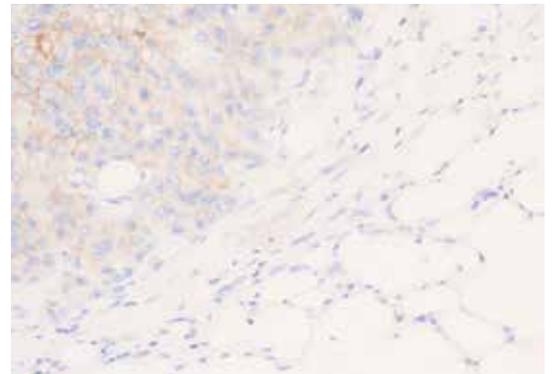


Grossissement x20

Le contrôle positif en interne illustré est une tumeur mammaire invasive équivoque (2+).

## Contrôle tissulaire négatif en interne

Valide la spécificité de l'anticorps primaires et renseigne sur le marquage non spécifique dit bruit de fonds. La variété des différents types de cellules présents dans la plupart des coupes tissulaires offre des sites de contrôles négatifs internes (à vérifier par l'utilisateur). Les canaux galactophores normaux n'étant pas associés à une tumeur peuvent constituer une référence pour la validité du test. En cas de marquage spécifique dans le tissu de contrôle négatif interne, les résultats des échantillons du patient doivent être considérés comme non valides.



Grossissement x20

Le composant de contrôle négatif en interne utilisé dans ce cas est adipeux avec des cellules stromales adjacentes à la tumeur mammaire invasive. Les cellules adipeuses et les cellules stromales ne sont pas marquées, démontrant l'absence de réactivité croisée avec ces composants cellulaires normaux.

Un bloc de contrôle multitissulaire contenant des tumeurs et représentant les quatre degrés de HER2 peut également être utilisé de façon efficace comme un matériel de contrôle interne approprié.

# ■ Considérations techniques et recommandations

## Manipulation des échantillons

Des écarts des procédures relatives à la manipulation des échantillons et au traitement peuvent compromettre les performances du dosage HER2. Les variables qui peuvent altérer les performances du dosage sont les suivantes :

- Séchage des spécimens avant la fixation
- Type de fixateur
- Température, âge, stockage et pH du fixateur
- Durée de la fixation, taille de l'échantillon par rapport au volume de fixateur, taille de l'échantillon lui-même
- Temps passé dans l'alcool après la fixation primaire
- Temps de traitement, température, pression et produits chimiques utilisés
- Stockage des blocs de paraffine
- Stockage des sections coupées

## Fixation, traitement et inclusion

Il est recommandé de préparer les tissus dans des fixateurs à base de formol, de les traiter en routine et de les inclure dans de la paraffine. Par exemple, les spécimens d'exérèse doivent être bloqués dans une épaisseur de 3 à 4 mm et fixés pendant 18 à 24 heures dans 10 % de formol tamponné neutre. Les tissus doivent ensuite être déshydratés dans une série d'alcools, puis éclaircis au xylène, et enfin imprégnés de paraffine liquide et maintenus à une température ne dépassant pas 60 °C.

## Préparation des coupes de tissus

Une préparation appropriée des tissus est essentielle pour une performance uniforme du kit Leica Bond Oracle HER2 IHC System.

Les spécimens de tissus inclus doivent être coupés à une épaisseur comprise entre 3 et 5 µm. Un réchauffement excessif des tissus pendant l'inclusion ou les coupes durant le séchage peut être préjudiciable à l'immunohistochimie et doit donc être évité.

Les lames nécessaires pour la vérification des tumeurs (H&E) et l'évaluation de l'oncoprotéine HER2 (Leica Bond Oracle HER2 IHC System) doivent être préparées en même temps. Afin de préserver l'antigénicité, les coupes tissulaires disposées sur les lames (Leica Biosystems Plus Slides – réf.S21.2113) doivent être colorées dans un délai de 4 à 6 semaines après la coupe et stockées à température ambiante (20 à 25 °C). Après avoir effectué les coupes, les lames doivent être incubées pendant 12 à 18 heures (une nuit) à 37 °C. Les coupes qui requièrent davantage d'adhérence peuvent être incubées à 60 °C pendant une heure de plus.

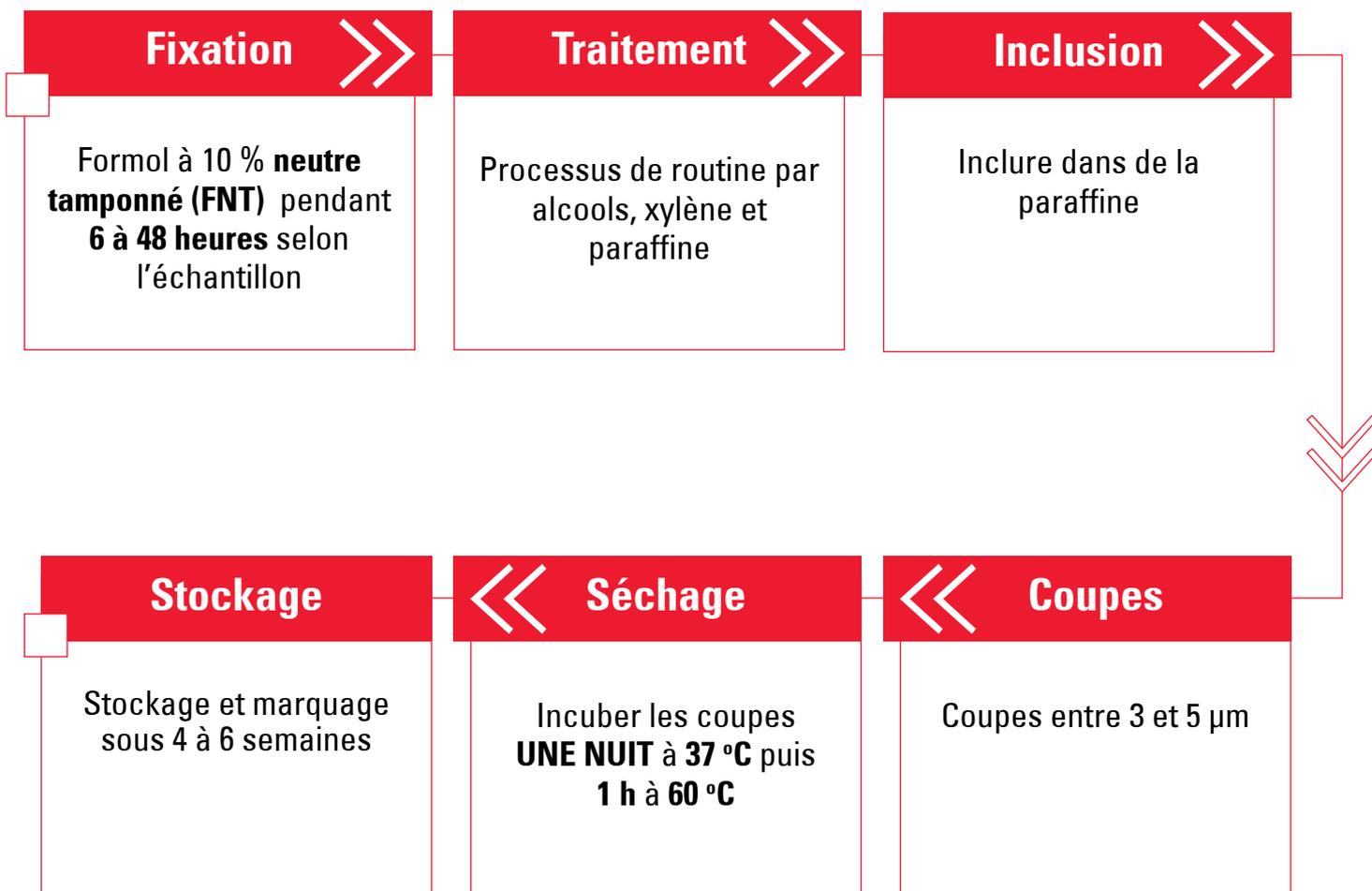
## Paramètres par défaut du protocole

Le kit Leica Bond Oracle HER2 IHC System et le système entièrement automatisé de marquage Bond Leica fournissent un démasquage d'épitopes régulière et cohérente, et des incubations contrôlées de réactifs permettant des résultats reproductibles.

Les paramètres par défaut suivants sont utilisés avec le kit Leica Bond Oracle HER2 IHC System :

- Déparaffinage à bord - \*Dewax
- Démasquage d'épitopes avec régulation - \*HIER 25 min avec ER1 (97)
- Incubations de réactifs contrôlés - \*IHC Protocol H

Pour plus de détails sur le protocole du kit Leica Bond Oracle HER2 IHC System veuillez consulter le document **du mode d'emploi**



## Utiliser un nouveau Covertile Leica BOND Universal™ pour chaque lame\*

L'utilisation d'un nouveau Covertile Leica BOND Universal (code de produit S21.2001.110) à chaque fois aidera à assurer la cohérence de ce test semi-quantitatif. Le système Covertile permet une application douce et un débit uniforme de réactif à travers les coupes pour un traitement inégalé des tissus.

\*L'utilisation de covertsiles Leica BOND Universal qui ont été précédemment utilisés soit pour le marquage immunohistochimique ou l'hybridation in situ n'a pas été validée pour ce test.

# ■ Interprétation du marquage avec le Kit Oracle HER2

Pour la détermination de la surexpression de l'oncoprotéine HER2, seul le motif de marquage de la membrane et l'intensité doivent être évalués. Un pathologiste doit effectuer l'évaluation de la lame à l'aide d'un microscope à lumière vive. Pour l'évaluation du marquage immunohistochimique et la notation, un objectif de grossissement x10 est adéquat. Un objectif de grossissement x20-x40 doit être utilisé pour confirmer le résultat. Le marquage cytoplasmique doit être considéré comme non spécifique et ne doit pas être inclus dans l'évaluation de l'intensité de marquage de la membrane. Pour aider à la différenciation entre les marquages de 0, 1+, 2+ et 3+, reportez-vous l'Atlas du Kit Leica Bond HER2 IHC Staining pour des images représentatives des intensités de marquage. Seuls les échantillons provenant de patientes atteintes de cancer du sein invasif doivent être notés. Dans les cas de carcinome *in situ* et de carcinome invasifs trouvés dans le même échantillon, seule la composante invasive doit être notée.

## Directives de notation du Leica Oracle HER2 IHC

Intensité de marquage immunohistochimique	Score	Évaluation
Aucun marquage n'est observé ou un marquage de la membrane est observé dans moins de 10% des cellules tumorales.	0	Négatif
Un marquage faible/à peine perceptible de la membrane est détecté dans plus de 10 % des cellules tumorales. Les cellules ne sont marquées que sur une partie de leur membrane.	1+	Négatif
Un marquage de faible à modéré de toute la membrane est observé dans plus de 10 % des cellules tumorales	2+	Équivoque (faible positif)
Un marquage de forte intensité de la membrane est observée dans plus de 10 % des cellules tumorales.	3+	Fortement positif

Le kit Leica Bond Oracle HER2 IHC System n'est pas conçu pour fournir des pronostics au patient ou au médecin, et n'a pas été validé pour cette fonction.

Pour chaque évaluation de marquage, les lames doivent être examinées dans l'ordre présenté ci-dessous afin de déterminer la validité du processus de marquage et de permettre une évaluation semi-quantitative de l'intensité de marquage du tissu de l'échantillon.

1. Lames de Contrôles HER2
2. Contrôle positif en interne
3. Contrôle négatif en interne
4. Tissu du patient - contrôle négatif HER2
5. Tissu du patient – Anticorps primaire HER2

## Expression de HER2 dans les tissus normaux

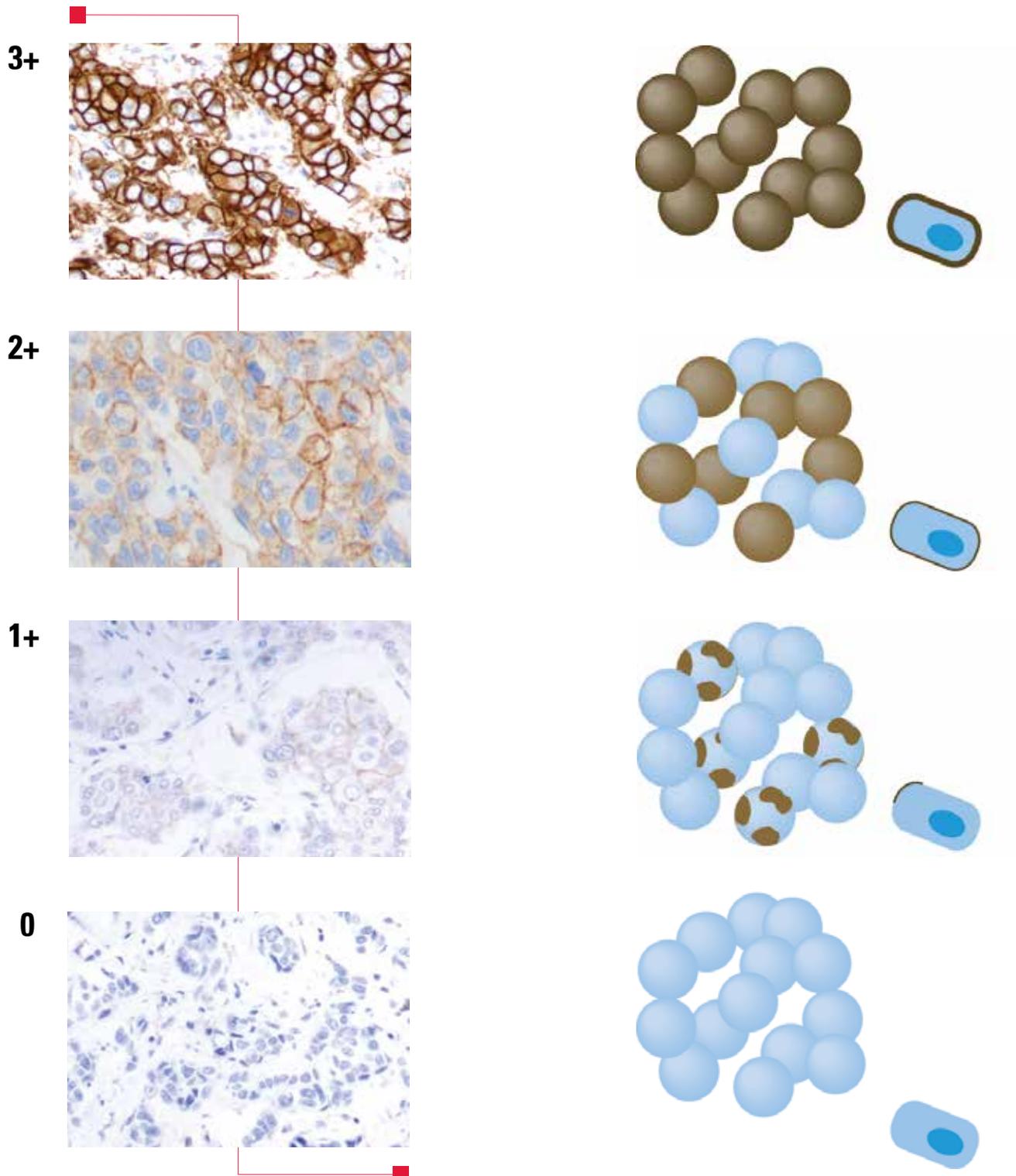
Tissu de type normal	Motif de marquage	
	Anticorps Primaire HER2	Contrôle négatif d'HER2
Surrénale	Négatif	Négatif
Encéphale, cervelet	Négatif	Négatif
Encéphale, cerveau	Négatif	Négatif
Sein	Négatif	Négatif
Moelle osseuse	Négatif	Négatif
Côlon	Négatif	Négatif
Œsophage	Négatif	Négatif
Œil	Négatif	Négatif
Cœur	Négatif	Négatif
Hypophyse	Marquage cytoplasmique modéré observé dans des cellules hypophysaires (1/3)	Négatif
Rein	Négatif	Négatif
Larynx	Négatif	Négatif
Foie	Négatif	Négatif
Poumon	Négatif	Négatif
Mésothélium	Négatif	Négatif
Ovaire	Négatif	Négatif
Pancréas	Négatif	Négatif
Parathyroïde	Négatif	Négatif
Nerf périphérique	Négatif	Négatif
Prostate	Négatif	Négatif
Glande salivaire	Négatif	Négatif
Peau	Négatif	Négatif
Intestin grêle	Négatif	Négatif
Rate	Négatif	Négatif
Estomac	Marquage faible cytoplasmique observé dans les glandes gastriques (2/3)	Négatif
Muscle strié	Négatif	Négatif
Testicule	Négatif	Négatif
Thymus	Négatif	Négatif
Thyroïde	Négatif	Négatif
Amygdale	Négatif	Négatif
Col de l'utérus	Négatif	Négatif
Utérus	Négatif	Négatif

# ■ ATLAS d'interprétation du kit Leica Bond Oracle HER2 IHC

## Profil HER2 du Kit Oracle dans les tumeurs

Les niveaux d'expression de HER2 et l'intensité de marquages associés dans des cellules tumorales sont représentés ci-dessous.

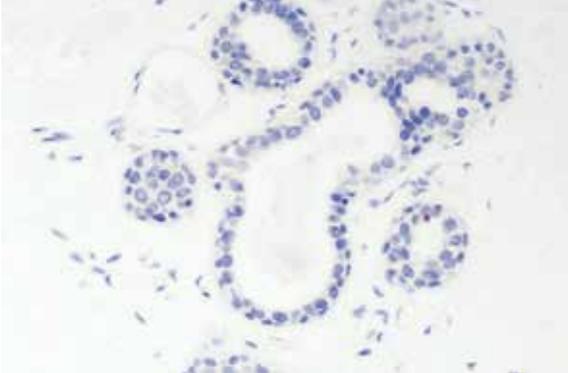
L'épithélium canalaire bénin normal fournit un niveau de référence (0) de contrôle interne de l'oncoprotéine HER2 dans le tissu tumoral. Les tumeurs qui ne surexpriment pas l'oncoprotéine HER2 auront un niveau similaire d'expression de HER2.



## Profils des tumeurs – Marquage à ne pas interpréter

### Épithélium non néoplasique

#### ■ Cas n°1



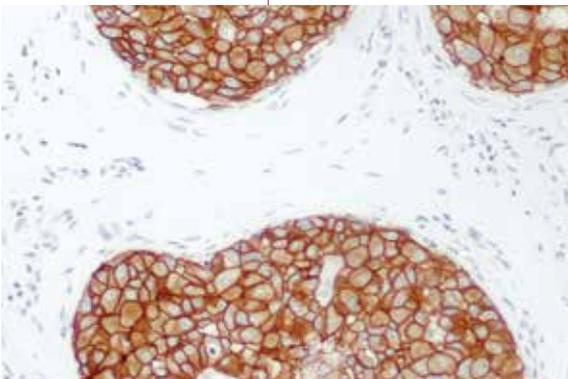
Grossissement x20.  
Épithélium mammaire normal

Un épithélium bénin normal non associé exprime rarement HER2. Cependant, un marquage occasionnel d'un épithélium canalaire normal peut être observé.

- La sensibilité du kit Leica Bond Oracle HER2 IHC System a été optimisée pour marquer les épithéliums canaux normaux à une intensité de 0/1+
- Si l'épithélium canalaire normal montre un marquage >1+, le dosage doit être répété
- Les cellules qui subissent des changements en colonne peuvent exprimer HER2 à un niveau élevé

### Carcinome canalaire in situ (CCIS)

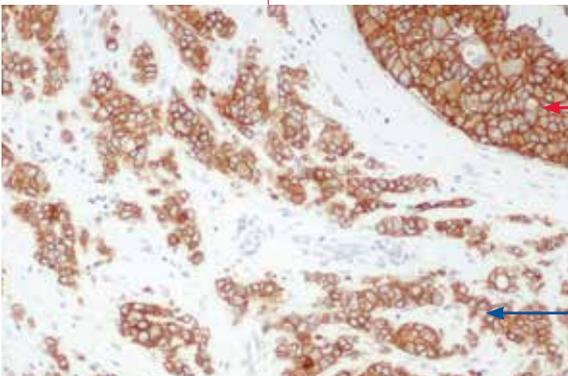
#### ■ Cas n°2



Grossissement x10  
Tumeur mammaire CCIS

L'évaluation initiale des carcinomes invasifs versus CCIS par H&E est une étape essentielle dans un dosage efficace d'HER2. Malgré un pourcentage élevé de cas de marquages CCIS positive pour HER2, ils ne doivent pas être rapportés pour l'immunothérapie avec Herceptin®.

#### ■ Cas n°3



Grossissement x10  
Tumeur mammaire avec  
CCIS et composants  
invasifs

Pour les cas qui contiennent à la fois des composants CCIS et invasifs, seul le composant invasif doit être interprété et rapporté pour l'immunothérapie avec Herceptin®.

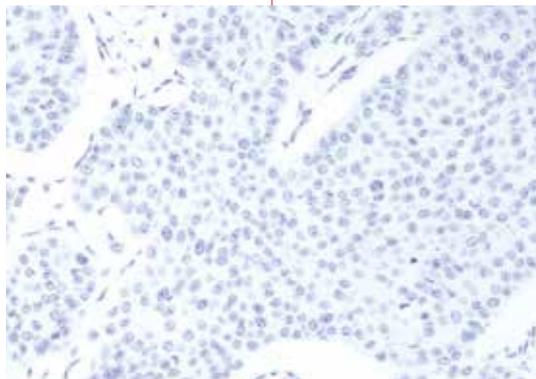
CCIS avec composants invasifs.

## Profils des tumeurs - Marquage à interpréter

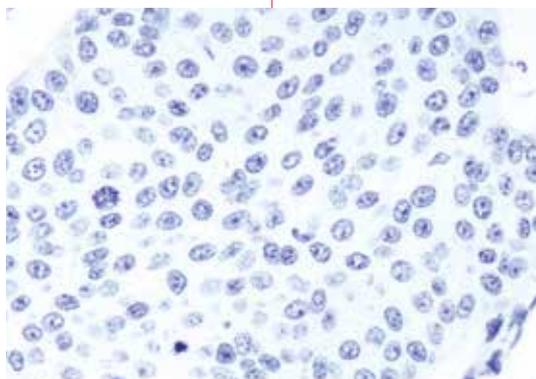
### Carcinome mammaire invasif (0)

Aucun marquage n'est observé ou un marquage de la membrane est observé dans moins de 10 % des cellules tumorales.

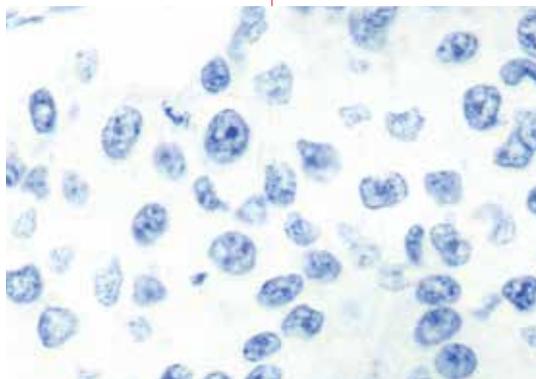
#### ■ Cas n°1



Grossissement x10

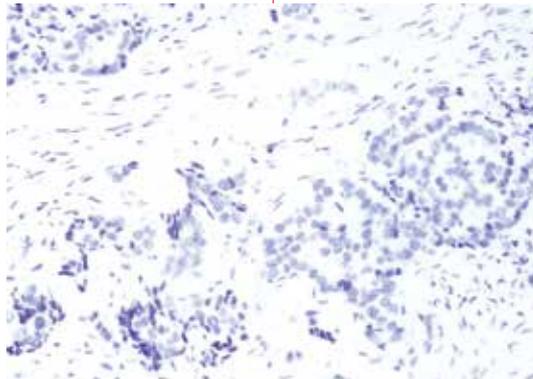


Grossissement x20

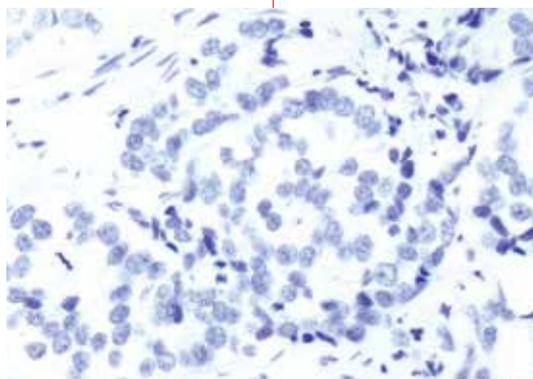


Grossissement x40

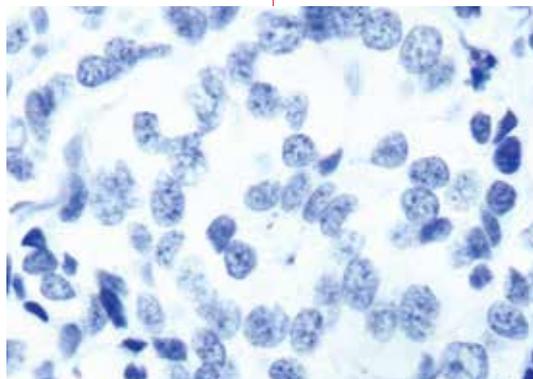
#### ■ Cas n°2



Grossissement x10



Grossissement x20

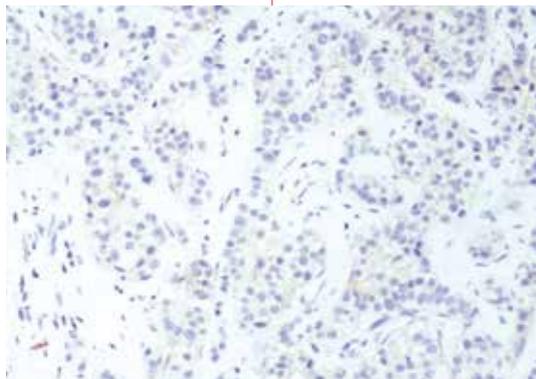


Grossissement x40

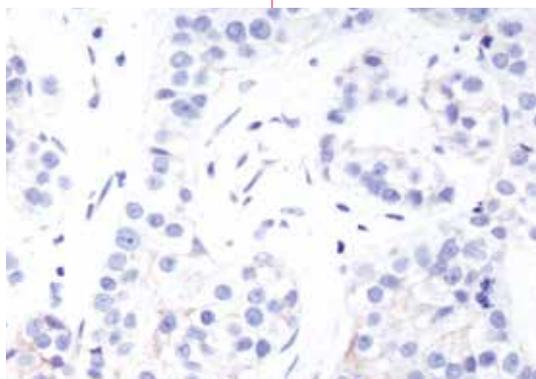
## Carcinome mammaire invasif (1+)

Un marquage faible/à peine perceptible de la membrane est détecté dans plus de 10 % des cellules tumorales.  
Les cellules ne sont marquées que sur une partie de leur membrane.

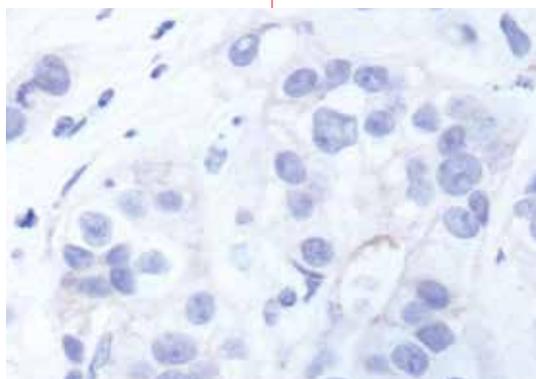
■ Cas n°3



Grossissement x10

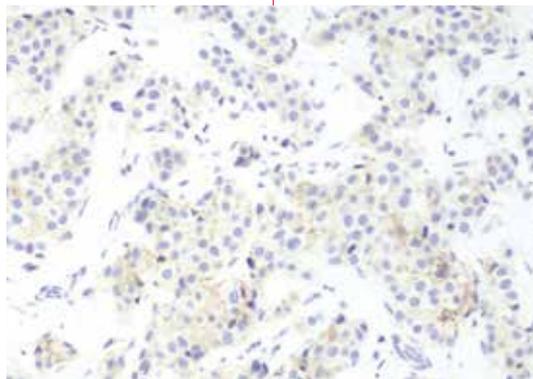


Grossissement x20

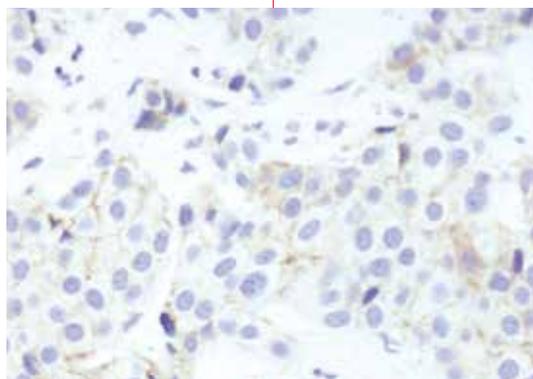


Grossissement x40

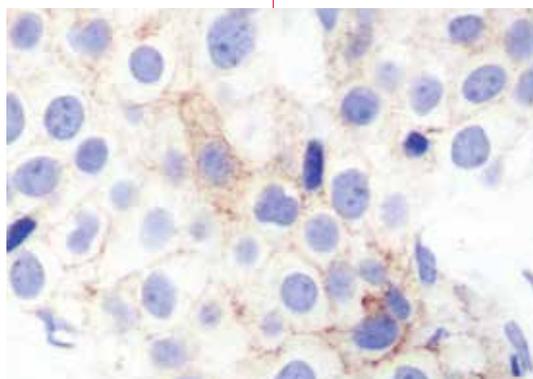
■ Cas n°4



Grossissement x10



Grossissement x20

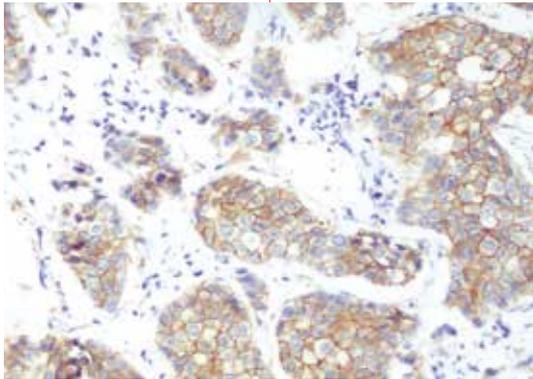


Grossissement x40

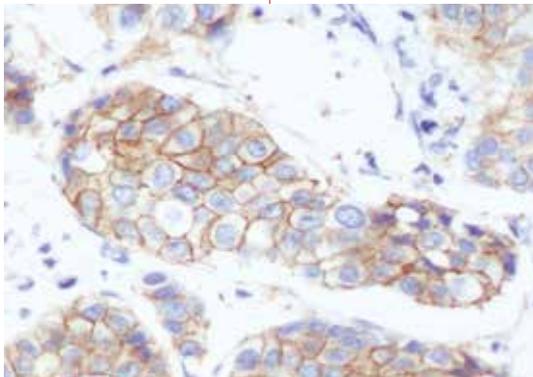
## Carcinome mammaire invasif (2+)

Un marquage faible à modéré de toute la membrane est observé dans plus de 10 % des cellules tumorales

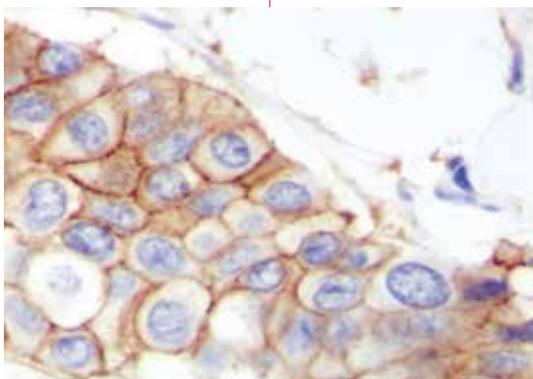
### ■ Cas n°5



Grossissement x10

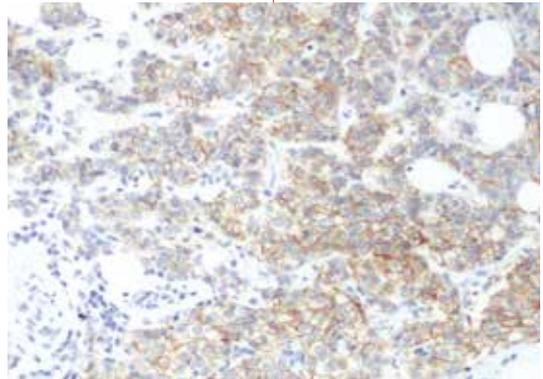


Grossissement x20

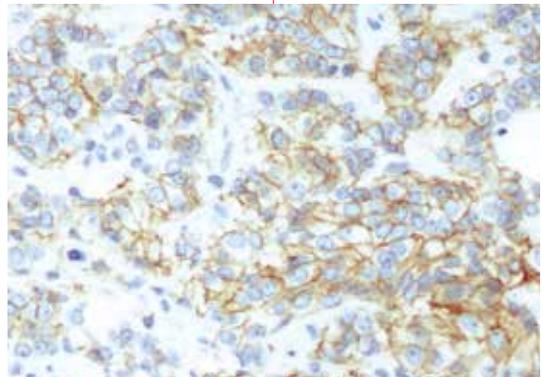


Grossissement x40

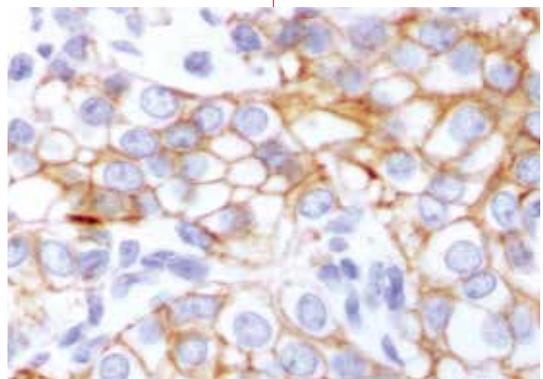
### ■ Cas n°6



Grossissement x10



Grossissement x20

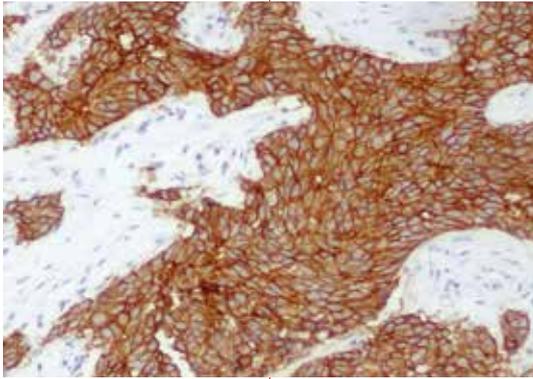


Grossissement x40

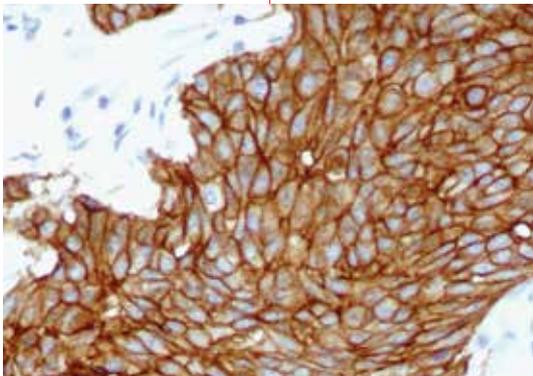
## Carcinome mammaire invasif (3+)

Un fort marquage complet de la membrane est observé dans plus de 10 % des cellules tumorales.

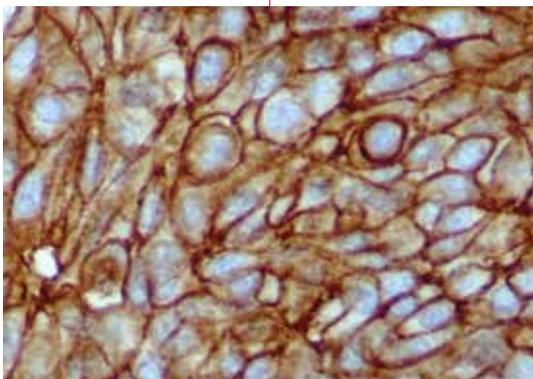
### ■ Cas n°7



Grossissement x10

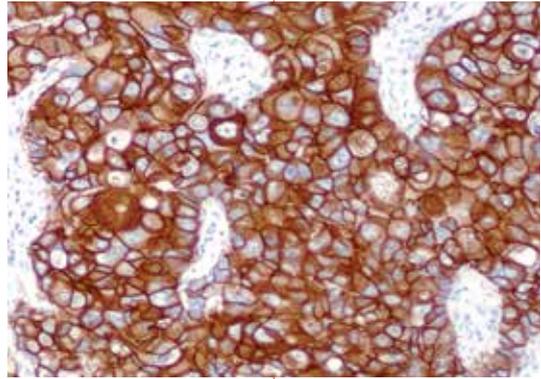


Grossissement x20

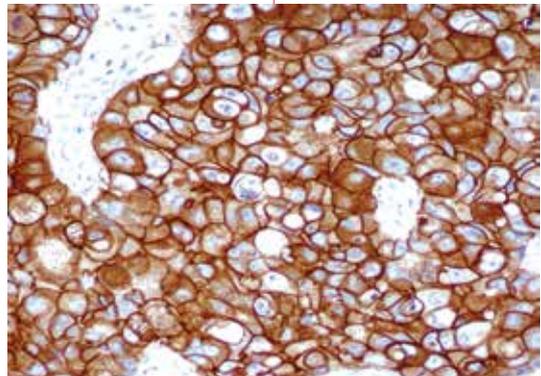


Grossissement x40

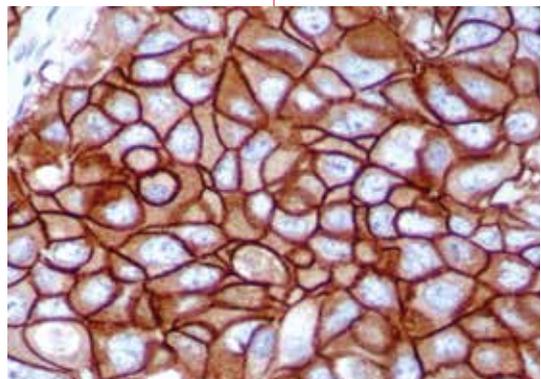
### ■ Cas n°8



Grossissement x10



Grossissement x20



Grossissement x40

# ■ Artefacts de marquage

## Artefacts de bord

### Artefact de bord en rapport avec la fixation

Marquage augmenté au niveau du bord du tissu ou marquage diminué observée dans des régions tumorales plus centrales.

#### Causes

Souvent causé par une fixation inadéquate des échantillons au cours de la phase pré-analytique, cet artefact peut s'observer dans des préparations H&E et IHC. La fixation et/ou le traitement inadéquats d'échantillons mal préparés peuvent se manifester par un marquage sous-optimal dans les parties centrales du tissu par rapport à la périphérie. Le marquage sous-optimal, zonal, insuffisamment traités peut être interprété comme un faux négatif.

#### Conseils pour l'interprétation

Un marquage accrue sur les bords d'un échantillon peut être du à une dessiccation avant la fixation. Un marquage limité à, ou une amplification de signal seulement à la périphérie de l'échantillon doivent être interprétés avec prudence.

Un marquage diminué dans des endroits centraux peut être du à une mauvaise fixation. Des zones appropriées pour l'interprétation doivent être évaluées en conjonction avec une coupe correspondante colorée à H&E.

### Artefact de bord en rapport avec la manipulation

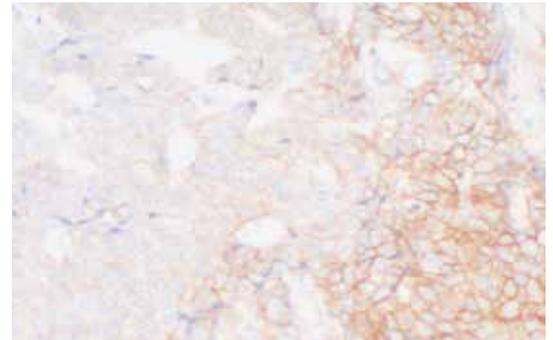
Une mauvaise morphologie cellulaire au bord des tissus produit des motifs de marquage qui sont difficiles à interpréter.

#### Causes

Souvent causé par une mauvaise manipulation des échantillons au cours de la phase pré-analytique, ce qui est le plus fréquent lors des microbiopsies stéréotaxiques au trocart, cet artefact peut être observé à la fois dans des préparations à H&E et IHC.

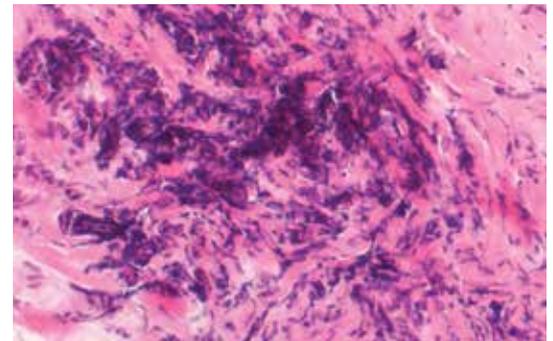
#### Conseils pour l'interprétation

S'assurer que l'interprétation et l'évaluation sont effectuées sur les régions tumorales montrant une morphologie optimale. Éviter les zones qui présentent des noyaux écrasés et des dommages cellulaires.



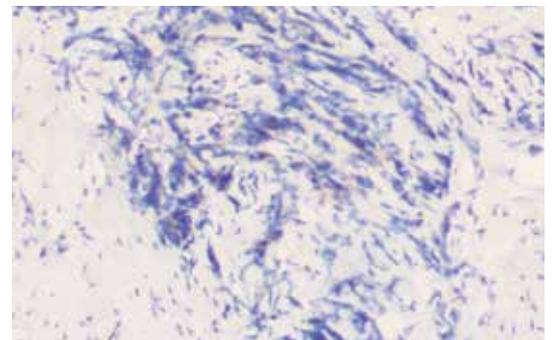
Grossissement x20. Tumeur mammaire

Si un spécimen montre un profil HER2 IHC augmenté dans des régions tumorales à proximité de la périphérie de l'échantillon, il est probable que cela soit dû à une diffusion insuffisante du fixateur aux régions centrales de la tumeur résultant en une fixation sous-optimale des protéines. Cet artefact doit être interprété avec prudence, car une perte d'expression HER2 au centre de la tumeur peut également être associée à une régulation cellulaire négative de l'oncoprotéine HER2 associée à la croissance tumorale.



Grossissement x20. Tumeur mammaire

Artefacts de bord liés à la manipulation – Coupe marquée à H&E illustrant des noyaux écrasés et une morphologie endommagée du tissu conjonctif. Noter le dépôt intense d'hématoxiline dans des noyaux se chevauchant suite à l'écrasement des tissus.



Grossissement x20. Tumeur mammaire

Artefacts de bord liés à la manipulation – Coupe marquée à HER2 IHC illustrant des noyaux écrasés et une morphologie endommagée du tissu conjonctif. Noter un certain piégeage de DAB dans des noyaux se chevauchant suite à l'écrasement des tissus.

## Marquage cytoplasmique ou artefact en points

Marquage spécifique du cytoplasme.

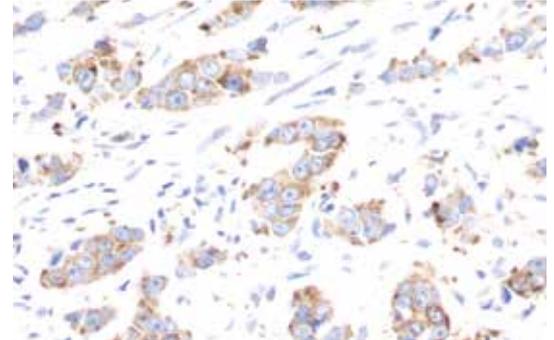
### Causes

Des éléments de marquage cytoplasmique HER2 peuvent être observés lorsque :

- Le spécimen montre des niveaux élevés d'expression de l'oncoprotéine HER2. Un marquage cytoplasmique faible est couramment observé lorsque l'intensité de la membrane est 3+.
- Des cas de marquage cytoplasmique spécifique ou un marquage en points peuvent s'observer. Ce motif de marquage peut être présent en l'absence de marquage de la membrane.

### Conseil pour l'interprétation

Une corrélation entre une réponse de marquage cytoplasmique et un traitement à l'Herceptin n'a pas été déterminée. Seul le composant membranaire du marquage immunohistochimique d'HER2 doit être interprété. Les zones appropriées pour l'interprétation doivent être évaluées en conjonction avec une coupe correspondante colorée à H&E.



Grossissement x20. Tumeur mammaire

Lame marquée avec le kit Oracle HER2 IHC illustrant un marquage cytoplasmique spécifique en l'absence de marquage de la membrane : Score HER2 de 0.

## Artefact thermique

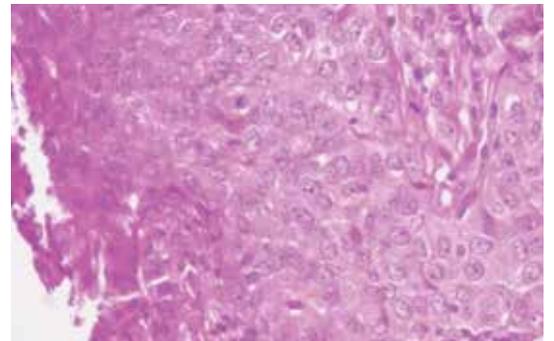
Sur la dissection des tissus cet artefact se présente sous forme de tissu dur, souvent dans les marges périphériques du spécimen réséqué.

### Causes

Un artefact thermique peut être considéré comme le résultat de l'utilisation de techniques basées sur de hautes températures/laser au cours d'une série de procédures chirurgicales et histologiques.

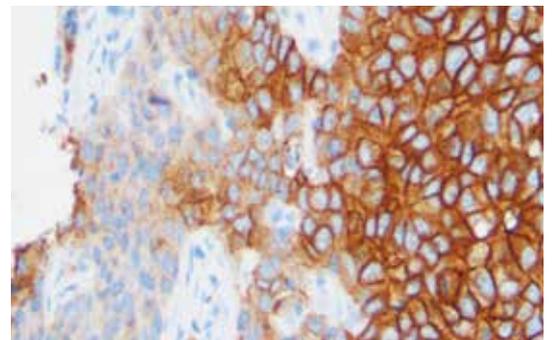
### Conseils pour l'interprétation

Des dommages cellulaires induits par la chaleur peuvent être observés en cours d'évaluation H&E et se présentent sous forme d'un marquage condensé et acidophile avec une perte des détails cellulaires. L'interprétation du marquage immunohistochimique dans ces zones doit être évitée.



Grossissement x20. Tumeur mammaire

Le spécimen montre un marquage acidophile accentué en périphérie produisant un marquage augmenté avec le colorant acide éosine. Le spécimen montre également une faible affinité pour l'hématoxyline avec peu ou pas de détails nucléaires visibles.



Grossissement x20. Tumeur mammaire

Le spécimen montre des dommages thermiques de l'oncoprotéine HER2 à la périphérie de l'échantillon (cette zone de la tumeur ne doit pas être interprétée). Le reste de la tumeur montre une bonne conservation de la protéine HER2 et est interprété comme 3+.

## Artefact de rétraction

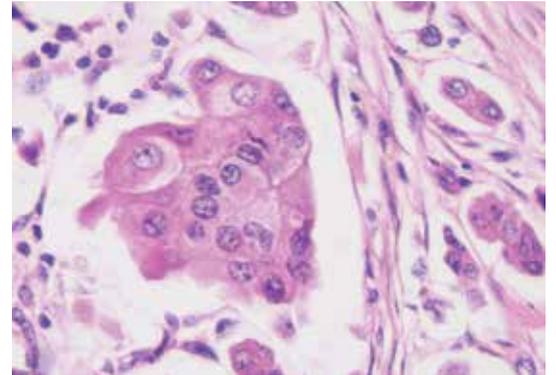
Un artefact de rétraction est la séparation des îlots tumoraux du tissu stromal environnant, ce qui entraîne l'agrégation ou la liaison non spécifique du chromogène aux surfaces cellulaires détachées.

### Causes

Un artefact de rétraction est généralement causé par une fixation et un traitement inappropriés de l'échantillon de tissu. Toutefois, cet artefact doit être interprété avec prudence. Dans des cas particuliers, une perte d'adhérence cellulaire due à une pathologie sous-jacente, par exemple, la perte ou la régulation négative des molécules d'adhésion cellulaire, peut entraîner la séparation de la tumeur des structures environnantes, imitant cet artefact.

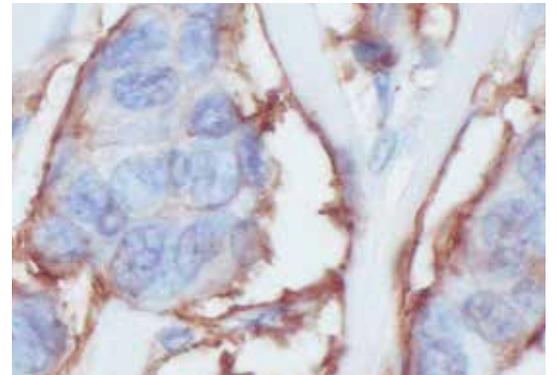
### Conseil pour l'interprétation

Dans les coupes colorées par IHC, les artefacts de rétraction se présentent souvent comme de grands dépôts diffus adhérent aux surfaces des cellules stromales et tumorales adjacentes.



Grossissement 40x. Tumeur mammaire

Coupe colorée à H&E montrant des artefacts de rétraction, noter le détachement des cellules tumorales des surfaces stromales environnantes

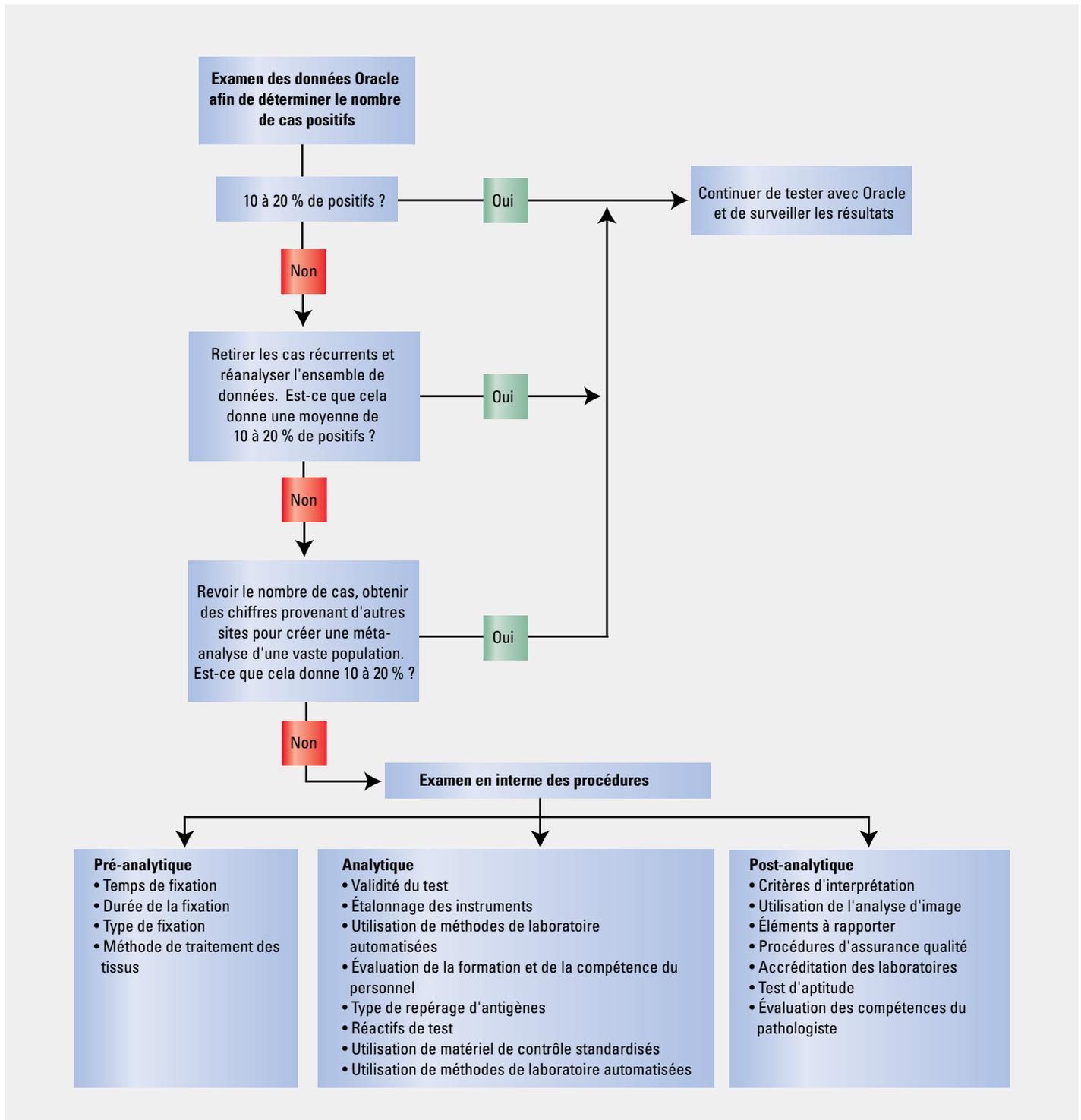


Grossissement 40x. Tumeur mammaire

Marquage Kit Oracle HER2 IHC montrant une agrégation non spécifique de DAB entre les surfaces rétractées.

# ■ Système de suivi des données

Chaque laboratoire effectuant des tests avec le kit Leica Bond Oracle™ HER2 IHC System doit surveiller son taux de positivité. Si le taux de positivité est en dehors de la plage de 10 à 20 %, un examen des procédures et techniques d'interprétation doit être entrepris.



# Kit Leica Bond Oracle™ HER2 IHC System - Liste de contrôle

**Nom du Stagiaire :** \_\_\_\_\_ **Institution** \_\_\_\_\_

## Équipement de formation

- Leica Bond Oracle HER2 IHC System
- Réactifs auxiliaires et consommables Leica BOND
  - Leica BOND ER1
  - Leica BOND Wash
  - Leica BOND Dewax
  - Leica BOND Universal Covertiles
- Mode d'emploi du Leica Bond Oracle HER2 IHC System
- Guide d'interprétation du Leica Bond Oracle HER2 IHC System
- Directives de notation du Leica Bond Oracle HER2 IHC System  
Ceux-ci peuvent être téléchargés à partir du site Web : [www.LeicaBiosystems.com/TA9145-IFU](http://www.LeicaBiosystems.com/TA9145-IFU)
- Quantité suffisante de tissu de statut HER2 connu pour la formation à la procédure et à l'interprétation

## Avant la formation

- Le stagiaire aura achevé le module d'e-Learning du Leica Bond Oracle HER2 IHC System  
[www.LeicaBiosystems.com/TA9145-elearning](http://www.LeicaBiosystems.com/TA9145-elearning) Numéro du certificat : \_\_\_\_\_
- Version du logiciel de l'instrument Leica BOND : \_\_\_\_\_
- Date de la dernière MP de l'instrument Leica BOND : \_\_\_\_\_
- L'instrument Leica BOND est équipé d'une sonde FTP propre/nouvelle
- Un programme de nettoyage existe pour l'instrument Leica BOND

## Stockage des réactifs

- Stockage du Leica Bond Oracle HER2 IHC System à 2-8 °C
- Vérifiez le stockage des réactifs en vrac
  - ER1 à 2-8 °C
  - Leica BOND Wash à 2-8 °C
  - Dewax à 2-26 °C
- Le labo utilise H<sub>2</sub>O désionisée

## Manipulation, fixation et traitement des tissus

- Calendrier appropriée de fixation au formol et de traitement (voir IFU)
- Coupes de 3 à 5 µm
- Séchage et adhérence suffisants

## Procédure

- Vérifier les réactifs en vrac, les déchets dangereux et non dangereux
- Enregistrer les composants du Leica Bond Oracle HER2 IHC System sur Leica BOND
- Configurer les profils d'étiquettes
- Configurer un cas
- Configuration optimale des lames et de la disposition pour l'utilisation la plus efficace du système de référence : Tableau 3 Leica Bond Oracle IHC System IFU

## Contrôle de la qualité

- L'importance des composants de contrôle positifs et négatifs
- L'importance des contrôles de tissus en interne
- L'importance de l'utilisation de lignées cellulaires de contrôle (soulignant les lignées cellulaires 1+ et 2+)
- L'importance de toujours utiliser des nouveaux Covertiles Leica BOND Universal

## Interprétation – Utiliser des lames colorées dans le cycle de formation (sur un ensemble pré-coloré)

- Justification de l'ordre d'interprétation des lames - l'ordre dans lequel les lames doivent être interprétées (voir IFU)
- Examen du tableau 4 : (IFU) « Interprétation du marquage HER2 »
- Que peut-on attendre des lames des cellules de contrôle du Leica Bond Oracle HER2 IHC System?
  - Attention particulière à marquage de la bordure en brosse de la lignée cellulaire de contrôle 1+
- Interprétation des lames de test :
  1. Invasif ou CCIS ?
  2. Quel pourcentage de marquage tumoraux ?
  3. Quelle est l'intensité ?
  4. Des artefacts ?

Voir mode d'emploi, guide d'interprétation et Guide de notation

### Signé au nom de Leica Biosystems (Formateur) :

.....(Signature)  
.....(Nom et titre)  
.....(Date)

### Signé par l'utilisateur final (Stagiaire) :

.....(Signature)  
.....(Nom et titre)  
.....(Date)

**Veuillez garder une copie de cette liste de contrôle et le certificat d'e-Learning pour chaque stagiaire dans vos dossiers de formation**



## SOLUTIONS COMPLÈTES DE RÉACTIFS

### Kit Leica HER2 FISH System pour Leica BOND

Le kit Leica HER2 FISH System automatise entièrement les sondes PathVysion\* Dual HER2 FISH, permettant une évaluation facile, efficace et précise du statut HER2 dans le cancer du sein.

- Facilité - Réduction des erreurs et diminution des repasses
- Efficacité - Flux de travail optimisé pour une productivité maximale et un coût minimal
- Précision - Permet une fiabilité du diagnostic

### Novocastra™ Reference Range™

Reference Range est un groupe de produits de qualité supérieure sélectionnés et organisés pour aider les pathologistes et les scientifiques dans le choix des anticorps idéaux pour un marquage optimal des tissus. Les marqueurs mammaires Reference Range comprennent :

- Cytokératine 20 (clone RW31)
- Récepteur des œstrogènes (clone 6F11)
- Antigène Ki67 (clone MM1)
- Protéine P53 (DO-7) (clone DO-7)
- Protéine P63 (clone 7JUL)

## LEICA BIOSYSTEMS

Leader mondial de solutions de gestion du flux de travail, Leica Biosystems offre aux laboratoires et instituts de recherche spécialisés en histopathologie une gamme complète de produits performants dans le domaine de l'anatomo-pathologie. Avec des systèmes d'histologie complets intégrant des solutions d'automatisation innovantes, les réactifs Novocastra™ et les consommables Surgipath®, Leica Biosystems propose pour chaque tâche spécifique en histopathologie le produit adéquat et, pour l'ensemble du laboratoire, des solutions de gestion de flux de travail hautement productives.

Leica Biosystems - une société internationale dotée d'un solide réseau de service après-vente dans le monde entier :

### Assistance commerciale et clientèle Amérique du Nord

Amérique du Nord 800 248 0123

### Assistance commerciale et clientèle Asie/Pacifique

Australie	1800 625 286
Chine	+85 2 2564 6699
Japon	+81 3 5421 2804
Corée su Sud	+82 2 514 65 43
Nouvelle Zélande	0800 400 589
Singapour	+65 6779 7823

### Assistance commerciale et clientèle en Europe

Pour obtenir les coordonnées détaillées sur les bureaux de vente ou distributeurs européens veuillez visitez notre site Web.

**Leica Biosystems  
fournit à la fois les  
produits, la qualité et le  
support, offrant ainsi une solution complète  
qui vous permet d'obtenir des flux de travail  
avancés, des diagnostics plus clairs et  
surtout le plus important : un meilleur suivi  
des patients.**



\* PathVysion est une marque déposée d'Abbott Molecular Inc. Tous droits réservés.

Utilisation sous licence.

Ce produit n'est pas destiné à la vente aux États-Unis