



## FlexISH

### ROS1/BCL6 DistinguISH Probe

**REF** Z-2203-50  5 (0,05 ml)

**REF** Z-2203-200  20 (0,2 ml)

Pour la détection qualitative des translocations impliquant le gène humain ALK en 2p23.1-p23.2 et le gène humain ROS1 en 6q22.1 par hybridation *in situ* en fluorescence (FISH)



Dispositif médical de diagnostic *in vitro*  
En accord avec la directive européenne 98/79/CE

## 1. Utilisation prévue

FlexISH ALK/ROS1 DistinguISH Probe (PL161) est prévu pour être utilisé pour la détection qualitative des translocations impliquant le gène humain ALK en 2p23.1-p23.2 et le gène humain ROS1 en 6q22.1 dans des échantillons fixés au formol et inclus en paraffine tels que des tissus de cancer du poumon non à petites cellules (CPNPC) par hybridation *in situ* en fluorescence (FISH). La sonde est prévue pour être utilisée avec le kit d'implémentation FlexISH-Tissue Implementation Kit (Prod. No. Z-2182-5/-20)

L'interprétation des résultats doit être effectuée dans le contexte de l'histoire clinique du patient par rapport à d'autres données cliniques et pathologiques du patient par un pathologiste qualifié.

## 2. Pertinence clinique

Les gènes ALK et ROS1 codent tous les deux pour un récepteur transmembranaire à activité tyrosine kinase. Des réarrangements affectant le locus du gène ALK ou du gène ROS1 sont souvent observés dans les cancers du poumon non à petites cellules (CPNPC). Le réarrangement du gène ALK le plus fréquent dans le CPNPC se caractérise par une inversion des gènes ALK et EML4, tous les deux situés sur le chromosome 2 [inv(2)(p21p23)]. Ce réarrangement entraîne une protéine de fusion qui est activée de manière constitutive par l'autophosphorylation, et qui modifie ensuite la transformation en cellule maligne en activant les effecteurs en aval. Dans les CPNPC, de nombreux partenaires de translocation ROS1 ont été détectés, tous entraînant la fusion de formes tronquées de manière variable par exemple de TPM3, SDC4, SLC34A2, CD74, EZR, ou LRIG3 au domaine kinase de ROS1. Il a aussi été observé une fusion de GOPC avec ROS1 dans les CPNPC. Les fusions GOPC-ROS1 sont causées par une suppression interstitielle d'approximativement 240 kb en 6q22.1. Le gène ROS1 évolutif est étroitement lié à la famille ALK qui fait partie de la base scientifique consistant à utiliser des inhibiteurs d'ALK comme inhibiteurs de ROS1. Un traitement ciblant la tyrosine kinase, tel que le crizotinib, est bénéfique aux patients atteints de CPNPC positifs au réarrangement des gènes ALK et ROS1. Ainsi, la détection des réarrangements ALK et ROS1 par hybridation *in situ* en fluorescence peut avoir un intérêt thérapeutique.

## 3. Principe du test

L'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH) permet la détection et la visualisation de séquences d'acide nucléique spécifiques dans une préparation cellulaire. Les fragments d'ADN marqués par fluorescence, appelés sondes FISH, et leurs brins d'ADN complémentaires dans les échantillons sont dénaturés puis ré-appariés pendant l'hybridation. Par la suite, les fragments de sonde non spécifiques et non hybridés sont éliminés par des étapes de lavage stringent. Après une contre coloration de l'ADN avec du DAPI, les fragments de sondes hybridés sont visualisés au moyen d'un microscope à fluorescence équipé de filtres d'excitation et d'émission spécifiques aux fluorochromes avec lesquels les fragments de sondes FISH ont été marqués.

## 4. Réactifs fournis

FlexISH ROS1/BCL6 DistinguISH Probe est composé de :

- Polynucléotides marqués au ZyGreen (excitation 503 nm/émission 528 nm) (~10,0 ng/μl), qui ciblent une séquence de 2p23.1-p23.2\* (chr2:29,460,144-30,095,822) proximale de la région des points de rupture de ALK et de 6q22.1\* (chr6:116,912,298-117,627,255) proximale de la région des points de rupture de ROS1 (voir figures 1 et 2).
- Polynucléotides marqués au ZyOrange (excitation 547 nm/émission 572 nm) (~2,5 ng/μl), qui ciblent une séquence de 2p23.2\* (chr2:29,174,204-29,383,335) distale de la région des points de rupture de ALK et de 6q22.1\* (chr6:117,659,135-117,871,701) distale de la région des points de rupture de ROS1 (voir figures 1 et 2).
- Polynucléotides marqués au ZyBlue (excitation 418 nm/émission 467 nm) (~70,0 ng/μl), qui ciblent une séquence de 6q22.1\* (chr6:116,671,642-117,260,761) proximale de la région des points de rupture de rupture de ROS1 colocalisant avec les polynucléotides ROS1 marqués au ZyGreen, et une séquence de 6q22.1-q22.2\* (chr6:117,765,211-118,444,005) distale de la région des points de rupture de ROS1 colocalisant avec les polynucléotides ROS1 marqués au ZyOrange (voir figure 2).

- Tampon d'hybridation à base de formol

\* selon Human Genome Assembly GRCh37/hg19

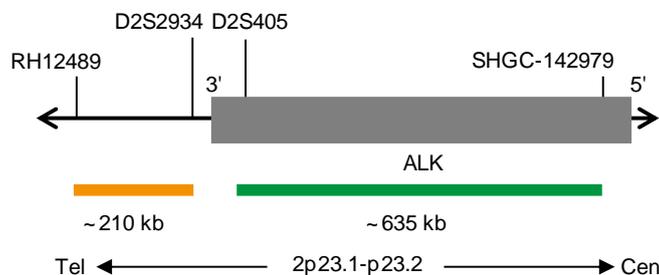


Fig. 1 : Carte de la sonde ALK (pas à l'échelle)

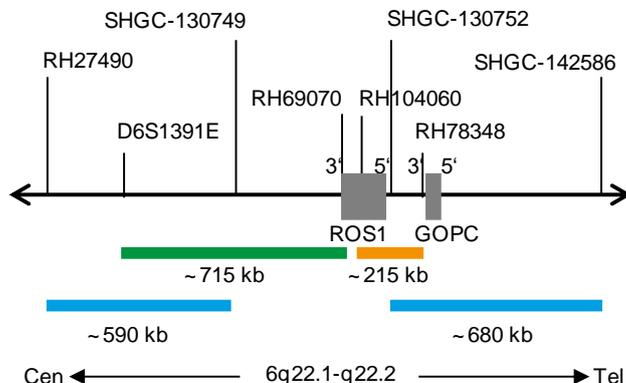


Fig. 2 : Carte de la sonde ROS1 (pas à l'échelle)

FlexISH ALK/ROS1 DistinguISH Probe est disponible en deux tailles :

- Z-2203-50 : 0,05 ml (5 réactions de 10 µl chacune)
- Z-2203-200 : 0,2 ml (20 réactions de 10 µl chacune)

## 5. Matériel requis mais non fourni

- FlexISH-Tissue Implementation Kit (Prod. No. Z-2182-5/-20)
- Echantillons pour les contrôles positifs et négatifs
- Lames pour microscope, chargées positivement
- Bain-marie (37 °C, 98 °C)
- Plaque chauffante ou système d'hybridation
- Système d'hybridation ou chambre humide dans un four à hybridation
- Pipettes ajustables (10 µl, 25 µl)
- Pots ou bacs de coloration
- Chronomètre
- Thermomètre calibré
- Ethanol ou réactif à l'alcool
- Xylène
- Eau distillée ou déminéralisée
- Lamelles (22 mm x 22 mm, 24 mm x 60 mm)
- Ciment caoutchouc, par exemple : Fixogum Rubber Cement (Prod. N° E-4005-50/-125) ou similaire
- Microscope à fluorescence adéquatement entretenu (400-1000x)
- Huile à immersion compatible avec la microscopie à fluorescence
- Sets de filtres appropriés

## 6. Stockage et manipulation

Conserver entre 2 et 8 °C dans une position verticale et à l'abri de la lumière.

Utiliser à l'abri de la lumière. Remettre dans les conditions de stockage immédiatement après utilisation. Ne pas utiliser les réactifs après leur date de péremption indiquée sur l'étiquette. Le produit est stable jusqu'à sa date de péremption indiquée sur l'étiquette lorsqu'il est utilisé dans les bonnes conditions.

## 7. Avertissements et précautions

- La sonde ne doit pas être exposée à la lumière, en particulier à une lumière intense, pendant une longue période ; chaque étape doit être faite, si possible, dans l'obscurité et/ou en utilisant des récipients opaques.
- Lire les instructions avant utilisation !
- Ne pas utiliser les réactifs après la date de péremption.
- Ce produit contient des substances (en faibles concentrations et volumes) nocifs pour la santé et potentiellement infectieux. Eviter le contact direct avec ces réactifs. Prenez les mesures de protection appropriées (utilisez des gants jetables, des lunettes de protection et des vêtements de laboratoire).
- Si les réactifs entrent en contact avec la peau, rincer immédiatement avec beaucoup d'eau.
- Une fiche signalétique de sécurité à l'usage de l'utilisateur professionnel est disponible sur demande.
- Ne pas réutiliser les réactifs.
- Éviter la contamination croisée des échantillons car cela peut entraîner des résultats erronés.

## Mentions de danger et conseils de prudence :

Le composant dangereux déterminant est le formol.



**Danger**

H319	Provoque une sévère irritation des yeux.
H351	Susceptible de provoquer le cancer.
H360FD	Peut nuire à la fertilité. Peut nuire au fœtus.
H373	Risque présumé d'effets graves pour les organes à la suite d'expositions répétées ou d'une exposition prolongée.
P201	Se procurer les instructions spéciales avant utilisation.
P260	Ne pas respirer les poussières/fumées/gaz/brouillards/vapeurs/aérosols.
P280	Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/du visage.
P305+P351+P338	EN CAS DE CONTACT AVEC LES YEUX : Rincer avec précaution à l'eau pendant plusieurs minutes. Enlever les lentilles de contact si la victime en porte et si elles peuvent être facilement enlevées. Continuer à rincer.
P308+P313	EN CAS d'exposition prouvée ou suspectée : consulter un médecin.
P337+P313	Si l'irritation oculaire persiste : consulter un médecin.

## 8. Restrictions

- Destiné à une utilisation en diagnostic *in vitro*.
- Destiné à un usage professionnel uniquement.
- L'interprétation clinique de la présence ou de l'absence de marquage doit être faite en tenant compte du contexte Clinique, de la morphologie, et d'autres critères histo-pathologiques ainsi que d'autres tests diagnostiques. Il incombe à un pathologiste qualifié de connaître les sondes FISH, les réactifs, les tableaux de diagnostic et les méthodes utilisées pour produire la préparation colorée. La coloration doit être effectuée dans un laboratoire certifié et sous licence sous la supervision d'un pathologiste ayant la responsabilité d'examiner les lames colorées et d'assurer l'adéquation des contrôles positifs et négatifs.
- La coloration de l'échantillon, en particulier l'intensité du signal et le bruit de fond, dépend de la manipulation et de la préparation de l'échantillon avant marquage. Une mauvaise fixation, congélation, décongélation, un mauvais lavage, séchage, chauffage, de mauvaises coupes, ou une contamination avec d'autres échantillons ou fluides peut produire des artefacts et de faux résultats. Des résultats incohérents peuvent résulter des variations des méthodes de fixation et d'inclusion, ainsi que des irrégularités inhérentes à l'échantillon.
- La sonde doit être utilisée uniquement pour la détection du locus décrit au paragraphe 4, « Réactifs fournis ».
- Les performances ont été validées en utilisant les instructions décrites dans cette notice. Les modifications de ces procédures peuvent altérer les performances et doivent être validées par l'utilisateur.

## 9. Substances interférentes

Les globules rouges présents dans l'échantillon peuvent présenter une auto fluorescence qui entrave la reconnaissance du signal.

Les fixateurs suivants sont incompatibles avec la FISH :

- Fixateur de Bouin
- Fixateur B5
- Fixateurs acides comme l'acide picrique
- Fixateur de Zenker
- Alcools (lorsqu'ils sont utilisés seuls)
- Chlorure de mercure
- Fixateur formaldéhyde/zinc
- Fixateur de Hollande
- Formol non tamponné

## 10. Préparation des échantillons

Préparer les échantillons en suivant les instructions d'utilisation du FlexISH-Tissue Implementation Kit.

## 11. Traitement préparatoire du produit

Le produit est prêt à l'emploi. Il n'est pas nécessaire de le reconstituer, le mélanger ou le diluer. Mettre la sonde à température ambiante (18 à 25 °C) avant utilisation, à l'abri de la lumière. Avant d'ouvrir le tube, mélanger à l'aide d'un vortexeur et centrifuger brièvement.

## 12. Protocole

### Prétraitement de l'échantillon

Effectuer le prétraitement de l'échantillon (déparaffinage et protéolyse) selon les instructions d'utilisation du FlexISH-Tissue Implementation Kit.

### Dénaturation et hybridation

1. Mettre 10 µl de sonde sur chaque échantillon prétraité
  2. Couvrir les échantillons avec des lamelles de 22 mm x 22 mm (en évitant les bulles) et sceller les lamelles.
- Nous recommandons d'utiliser un ciment caoutchouc (par exemple le Fixogum) pour sceller.*
3. Placer les lames sur une plaque chauffante ou dans un système d'hybridation pour dénaturer les échantillons pendant 10 min à 75 °C.
  4. Procéder à l'hybridation pendant 2 à 16 heures (toute la nuit) à 37 °C, soit en transférant les lames dans un système d'hybridation soit dans une chambre humide et dans un four à hybridation.

*Il est essentiel que les échantillons ne sèchent pas pendant l'étape d'hybridation.*

### Post-hybridation

Effectuer l'étape de post-hybridation (lavage, contre-coloration et visualisation au microscope à fluorescence) en suivant les instructions d'utilisation du FlexISH-Tissue Implementation Kit.

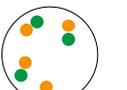
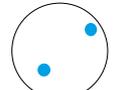
## 13. Interprétation des résultats

En utilisant les sets de filtres appropriés, les signaux d'hybridation de la sonde apparaissent en vert (en position proximale de la région des points de rupture de ALK et ROS1), en orange (en position distale de la région des points de rupture de ALK et ROS1) et en bleu (en position proximale et distale de la région des points de rupture de ROS1).

**Situation normale :** Dans les interphases de cellules normales ou de cellules sans réarrangement ALK ou la région du gène ROS1, quatre signaux de fusion verts et quatre signaux de fusion orange apparaissent en utilisant un set de filtres à bande double approprié, et deux signaux bleus apparaissent en utilisant un set de filtres à bande unique (voir figure 3).

**Situation aberrante :** Une région du gène ALK affectée par une translocation est indiquée par un signal vert séparé et un signal orange séparé ne se colocalisant pas avec les signaux bleus. La perte d'un signal vert entraînant un signal orange isolé est due à une suppression de séquences 5'-ALK. Une région du gène ROS1 affectée par une translocation est indiquée par un signal vert séparé et un signal orange séparé, chacun se colocalisant avec un signal bleu. La perte d'un signal orange entraînant un signal vert isolé colocalisant avec un signal bleu est due à une suppression distale de la région des points de rupture de ROS1 ou à une translocation déséquilibrée affectant cette région chromosomique (voir figure 3).

*Des signaux verts et orange se chevauchant peuvent apparaître comme étant des signaux jaunes.*

	Set de filtres à bande double verts/orange	Set de filtres à bande unique bleus	Image combinée ou set de filtres à bande triple
Cellules normales			
Réarrangement ALK	 	 	 
Réarrangement ROS1	 	 	 

**Fig. 3 : Résultats attendus dans les noyaux en interphase normale et présentant une aberration**

Des aberrations génomiques en raison de petites suppressions, duplications ou inversions pourraient entraîner des motifs de signaux imperceptibles.

Une autre distribution de signal peut être observée dans certains échantillons anormaux qui pourraient entraîner un motif de signal différent de celui décrit ci-dessus, ce qui indique des variations de réarrangements. Les modèles de signaux inattendus devraient être étudiés de manière plus approfondie.

### Veillez noter :

- En raison de la chromatine décondensée, les signaux FISH simples peuvent apparaître comme de petits groupes de signaux. Ainsi, deux ou trois signaux de même taille, séparés par une distance  $\leq 1$  au diamètre de signal, doivent être comptés comme un seul signal.
- Ne pas prendre en compte les chevauchements de noyaux.
- Ne pas compter les noyaux trop digérés (reconnaissables par des zones noires visibles dans le noyau).
- Ne pas compter des noyaux ayant une forte auto-fluorescence, ce qui entrave la reconnaissance du signal.
- Un résultat négatif ou équivoque peut être causé par différents facteurs (voir chapitre 17).
- Afin d'interpréter correctement les résultats, l'utilisateur doit valider ce produit avant de l'utiliser dans des procédures de diagnostic conformément aux directives nationales et/ou internationales.

## 14. Procédures de contrôle qualité recommandées

Afin de surveiller les performances correctes des spécimens traités et des réactifs d'essai, chaque dosage doit être accompagné de contrôles internes et externes. Si les contrôles internes et/ou externes n'indiquent pas une coloration appropriée, les résultats avec les échantillons de patients doivent être considérés comme invalides.

**Contrôle interne :** Cellules non néoplasiques dans l'échantillon qui présentent un motif de signal normal, par exemple des fibroblastes.

**Contrôle externe :** Échantillons contrôles négatifs et positifs validés.

## 15. Caractéristiques de performances

**Précision :** La localisation de l'hybridation de la sonde a été évaluée sur des étalements de métaphase d'hommes normaux du point de vue du caryotype. Dans tous les échantillons testés, la sonde s'est hybridée uniquement aux loci attendus. Il n'a été observé aucun signal supplémentaire et aucune hybridation croisée supplémentaire. Par conséquent, l'exactitude calculée était de 100 %.

**Sensibilité analytique** : Pour l'évaluation de la sensibilité analytique, la sonde a été évaluée sur des étalements de métaphase d'hommes normaux du point de vue du caryotype. Tous les noyaux ont présenté un modèle de signaux normaux attendus dans tous les échantillons testés. Par conséquent, la sensibilité analytique calculée était de 100 %.

**Spécificité analytique** : Pour l'évaluation de la spécificité analytique, la sonde a été évaluée sur des étalements de métaphase d'hommes normaux du point de vue du caryotype. Dans tous les échantillons testés, tous les signaux se sont hybridés uniquement aux loci cibles attendus et pas d'autres loci. Par conséquent, la spécificité analytique calculée était de 100 %.

## 16. Elimination

L'élimination des réactifs doit être effectuée conformément à la réglementation locale.

## 17. Assistance

Tout écart par rapport au mode d'emploi peut conduire à des résultats de coloration inférieurs ou à aucune coloration du tout.

### Faible signal ou aucun signal

Cause possible	Action
Pas de séquence cible disponible	Utiliser les contrôles appropriés
L'échantillon n'a pas été correctement fixé	Modifier le temps de fixation et le fixateur
Le prétraitement à la chaleur, la protéolyse, la dénaturation, l'hybridation ou le lavage stringent ont été faits à une mauvaise température	Vérifier la température de tous vos instruments utilisés, en utilisant un thermomètre calibré
Le prétraitement protéolytique n'est pas effectué correctement	Optimiser le temps d'incubation de la pepsine, l'augmenter ou le diminuer si nécessaire
Evaporation de la sonde	Lors de l'utilisation d'un système d'hybridation, l'utilisation des bandes humides/réservoirs remplis d'eau est obligatoire. Lors de l'utilisation d'un four à hybridation, il faut utiliser une chambre humide. En outre, la lamelle doit être complètement scellée, par exemple avec du Fixogum, afin d'empêcher le séchage de l'échantillon lors de l'hybridation.
Le tampon de lavage stringent a une concentration trop basse	Vérifier la concentration du tampon de lavage stringent
Anciennes solutions de déshydratation	Préparer des nouvelles solutions de déshydratation
Microscope à fluorescence mal réglé	Régler correctement
Mauvais sets de filtres utilisés	Utiliser les sets de filtres appropriés aux fluorochromes de la sonde. <i>Les sets de filtres à bande triple offrent moins de luminosité par rapport aux sets de filtres à bande unique ou double bande. Par conséquent, les signaux peuvent sembler plus faibles en utilisant les sets de filtres à bande triple.</i>
Sondes/fluorochromes endommagés par la lumière	Effectuer les étapes d'hybridation et de lavage dans l'obscurité.

### Signaux d'hybridation croisée ; bruit de fond

Cause possible	Action
Déparaffinage incomplet	Utiliser de nouvelles ; vérifier le temps de déparaffinage
Prétraitement protéolytique trop fort	Modifier le temps d'incubation de la pepsine
Volume de sonde par zone trop important	Réduire le volume de sonde par coupe/zone, distribuer la sonde en gouttelettes pour éviter la concentration locale
Les lames sont refroidies à température ambiante avant l'hybridation	Transférer les lames rapidement à 37 °C
Concentration du tampon de lavage stringent trop élevée	Vérifier la concentration du tampon de lavage stringent
Température de l'étape de lavage suivant l'hybridation trop basse	Vérifier la température et l'augmenter si nécessaire
Déshydratation des coupes entre les différentes étapes d'incubation	Éviter la déshydratation en scellant les lames et en effectuant les étapes d'incubation dans un environnement humide

### Noyaux chevauchants

Cause possible	Action
Épaisseur inappropriée des coupes	Préparer des coupes au microtome de 2-4 µm d'épaisseur

### Morphologie tissulaire dégradée

Cause possible	Action
L'échantillon n'a pas été correctement fixé	Modifier le temps de fixation et le fixateur
Le prétraitement protéolytique n'est pas effectué correctement	Modifier le temps d'incubation de la pepsine
Séchage insuffisant avant l'application de la sonde	Prolonger le séchage à l'air

### Echantillon glissant sur la lame

Cause possible	Action
Revêtement antidérapant inadéquat	Utiliser des lames pour microscope chargées positivement
Prétraitement protéolytique trop fort	Réduire le temps d'incubation de la pepsine

### Contre coloration faible

Cause possible	Action
Solution DAPI faiblement concentrée	Utiliser à la place le produit <u>DAPI/DuraTect-Solution (ultra)</u> (Prod. N° MT-0008-0.8)
Temps d'incubation avec le DAPI trop court	Ajuster le temps d'incubation avec le DAPI

## 18. Bibliographie

- Bergethon K, et al. (2012) *J Clin Oncol* 30 : 863-70.
- Birchmeier C, et al. (1987) *Proc Natl Acad Sci* 84 : 9270-74
- Bos M, et al. (2013) *Lung Cancer* 81 : 142-3.
- Brockhoff G, et al. (2016) *Histopathology* 69 : 635-46.
- Kievits T, et al. (1990) *Cytogenet Cell Genet* 53 : 134-6.
- Koivunen JP, et al. (2008) *Clin Cancer Res* 14 : 4275-83.
- Martelli MP, et al. (2009) *Am J Pathol* 174 : 661-70.
- Morris SW, et al. (1994) *Science* 263 : 1281-4.
- Ou SH, et al. (2012) *Exp Rev Anticancer Ther* 12 : 447-56.
- Palmer RH, et al. (2009) *Biochem J* 420 : 345-61.
- Sasaki T, et al. (2010) *Eur J Cancer* 46 : 1773-80.
- Selinger CI, et al. (2017) *Histopathology* 70 : 402-411.
- Shaw AT, et al. (2014) *N Engl J Med* 371 : 1963-71.
- Wilkinson DG : *In Situ Hybridization, A Practical Approach*, Oxford University Press (1992) ISBN 0 19 963327 4.

Nos experts sont disponibles pour répondre à vos questions.  
Merci de nous contacter à [help@zytovision.com](mailto:help@zytovision.com)



ZytoVision GmbH  
Fischkai 1  
27572 Bremerhaven/Allemagne  
Téléphone : +49 471 4832-300  
Fax : +49 471 4832-509  
[www.zytovision.com](http://www.zytovision.com)  
Courriel : [info@zytovision.com](mailto:info@zytovision.com)

### Marques déposées :

ZytoVision® et F/exlSH® sont des marques déposées de ZytoVision GmbH.