

Notice

**Prosigna® Breast Cancer Prognostic Gene Signature Assay
(Dosage pour l'identification de la signature d'expression
génique pronostique du cancer du sein)**



Version 02, créée en juillet 2023



1-10 tests

Conditions de conservation

| | |
|--|---|
|  -20 °C Conserver à -20 °C ou moins | Cartridges pour dosage pour l'identification de la signature d'expression génique pronostique du cancer du sein Prosigna |
|  -80 °C Conserver à -80 °C ou moins | CodeSet pour dosage pour l'identification de la signature d'expression génique pronostique du cancer du sein Prosigna |
|  +25 °C Conserver à température ambiante +15 °C | Prep Pack pour dosage pour l'identification de la signature d'expression génique pronostique du cancer du sein Prosigna |
|  +8 °C Conserver à +4 +2 °C | Prep Plates pour dosage pour l'identification de la signature d'expression génique pronostique du cancer du sein Prosigna |

TABLE DES MATIÈRES

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 1 | UTILISATION/OBJET | 1 |
| 2 | PRÉSENTATION SOMMAIRE DU SYSTÈME DE TEST | 1 |
| 2.1 | Principes du système d'analyse nCounter | 2 |
| 2.2 | Principes de l'algorithme Prosigna régissant le calcul du résultat | 2 |
| 3 | RÉACTIFS ET ÉQUIPEMENT FOURNIS | 2 |
| 3.1 | Présentation du kit Prosigna | 2 |
| 3.2 | Prosigna Kit Contents de 1, 2, 3, 4, ou 10 tests | 3 |
| 4 | AVERTISSEMENTS ET PRÉCAUTIONS..... | 3 |
| 5 | CONSIDÉRATIONS GÉNÉRALES RELATIVES AU DOSAGE..... | 3 |
| 5.1 | Traitement des tissus | 3 |
| 5.2 | Exécution du Dosage Prosigna | 4 |
| 6 | INFORMATIONS SUR LA FORMATION | 4 |
| 7 | GESTION DES DÉCHETS..... | 4 |
| 8 | CONSERVATION ET MANIPULATION (RÉACTIFS)..... | 4 |
| 9 | INSTRUMENTS REQUIS POUR PROSIGNA..... | 4 |
| 10 | RÉACTIFS ET ÉQUIPEMENT REQUIS MAIS NON FOURNIS | 4 |
| 10.1 | Matériel..... | 4 |
| 10.2 | Équipement..... | 4 |
| 10.3 | Spécifications des équipements..... | 4 |
| 11 | PRÉLÈVEMENT ET TRAITEMENT DES ÉCHANTILLONS..... | 5 |
| 11.1 | Exigences relatives aux échantillons de tissu et examen pathologique..... | 5 |
| 11.2 | Prélèvement et conservation des échantillons..... | 5 |
| 11.3 | Préparation des lames..... | 5 |
| 11.4 | Traitement des lames..... | 5 |
| 11.5 | Isolation de l'ARN..... | 6 |
| 11.6 | Mesure de la concentration et de la qualité de l'ARN | 6 |
| 11.7 | Procédure de dosage..... | 7 |
| 12 | DÉPANNAGE ET ÉCHECS DE TESTS..... | 9 |
| 13 | RÉSULTATS DU DOSAGE | 9 |
| 13.1 | Sous-types intrinsèques | 9 |
| 13.2 | Score RDR | 10 |
| 13.3 | Probabilité de récurrence à distance à 10 ans | 10 |
| 13.4 | Classification du risque..... | 10 |
| 13.5 | Contrôle de qualité | 10 |
| 14 | LIMITES DES PROCÉDURES | 10 |
| 15 | VALEURS ATTENDUES | 10 |
| 15.1 | Plage RDR par sous-type | 11 |
| 15.2 | Fréquence du score RDR par état ganglionnaire | 11 |
| 15.3 | Survie sans récurrence à distance par catégorie de risque..... | 11 |

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 16 | CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCE..... | 12 |
| 16.1 | Précision et reproductibilité des analyses | 12 |
| 16.2 | Sensibilité/Incorporation d'ARN..... | 13 |
| 16.3 | Tests d'interférence | 13 |
| 16.4 | Performances cliniques..... | 14 |
| 17 | BIBLIOGRAPHE..... | 25 |
| 18 | SYMBOLES ET DÉFINITIONS..... | 26 |
| 19 | COORDONNÉES | 26 |

1 UTILISATION/OBJET

Le dosage pour l'identification de la signature d'expression génique pronostique du cancer du sein Prosigna® est un dosage de diagnostic *in vitro* qui utilise le profil d'expression génique des cellules présentes dans les tissus mammaires cancéreux pour évaluer le risque de récurrence à distance des patientes. Ce dosage mesure le profil d'expression génique à partir de l'ARN extrait des tissus tumoraux mammaires fixés au formol et inclus en paraffine (FFIP). Les données d'expression génique sont pondérées ensemble avec des variables cliniques afin de générer un sous-type (luminal A, luminal B, HER2 enrichi ou basal-like (type basaloïde)) et un score indiquant la probabilité de récurrence à distance du cancer. Le dosage est réalisé sur le système d'analyse nCounter®. Il utilise les tissus tumoraux mammaires FFIP précédemment diagnostiqués comme présentant un carcinome invasif du sein.

Le dosage pour l'identification de la signature d'expression génique pronostique du cancer du sein Prosigna est indiqué chez les patientes souffrant d'un cancer du sein qui ont subi une mastectomie ou ont suivi un traitement conservateur du sein conjointement avec un traitement loco-régional conformément à la norme de soins, en tant que :

- a. Indicateur pronostique de survie sans récurrence à distance à 10 ans chez les femmes post-ménopausées souffrant d'un cancer du sein à récepteurs hormonaux positifs (HR+), à ganglions lymphatiques négatifs, de Stade I ou II à traiter avec une endocrinothérapie adjuvante en monothérapie, en cas d'utilisation conjointe avec d'autres facteurs clinopathologiques.
- b. Indicateur pronostique de survie sans récurrence à distance à 10 ans chez les femmes post-ménopausées souffrant d'un cancer du sein à récepteurs hormonaux positifs (HR+), à ganglions lymphatiques positifs (1 à 3 ganglions positifs ou au moins 4 ganglions positifs), de Stade II ou IIIA à traiter avec une endocrinothérapie adjuvante en monothérapie, en cas d'utilisation conjointe avec d'autres facteurs clinopathologiques.

2 PRÉSENTATION SOMMAIRE DU SYSTÈME DE TEST

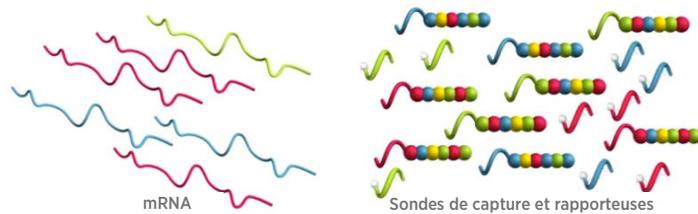
Le système d'analyse nCounter fournit des mesures directes et multiplexes de l'expression génique par le biais de relevés numériques de l'abondance relative des transcrits d'ARNm en procédant comme suit : 1) hybridation de l'ARN au moyen de sondes de capture et rapporteuses fluorescentes, 2) purification des complexes cible/sonde à l'aide de plaques de préparation nCounter contenant les réactifs nécessaires au traitement post-hybridation et à l'immobilisation sur la cartouche nCounter sur la station de préparation nCounter, et 3) analyse de la cartouche nCounter sur l'analyseur numérique nCounter en vue d'obtenir le résultat du test!. Les sondes de capture et rapporteuses comprennent toutes des séquences de sonde d'ADN uniques destinées à l'hybridation et la purification des cibles. Les sondes de capture et rapporteuses sont combinées avec les contrôles positifs et négatifs pour former le CodeSet. Prosigna mesure simultanément les niveaux d'expression de 50 gènes utilisés par l'algorithme de classification des sous-types intrinsèques², 8 gènes domestiques utilisés pour la normalisation des signaux, 6 contrôles positifs et 8 contrôles négatifs dans une réaction d'hybridation unique utilisant des sondes d'acide nucléique conçues spécialement pour ces gènes. Le kit Prosigna comprend également un échantillon de référence composé de cibles d'ARN transcrites *in vitro* pour chacun des 58 gènes. L'échantillon de référence est testé avec chaque lot d'échantillons d'ARN de patiente pour qualifier la série et normaliser le signal de chaque gène.

Le Dosage Prosigna est effectué sur l'ARN isolé à partir des tissus tumoraux mammaires FFIP. Un anatomopathologiste examine une lame colorée à l'hématoxyline et à l'éosine (H&E), et identifie (et marque) la zone du carcinome invasif du sein convenant au test. L'anatomopathologiste mesure également la superficie de la tumeur, qui détermine le nombre de lames non colorées requises pour le test, ainsi que la cellularité de la tumeur pour s'assurer de disposer d'une quantité de tissus tumoraux suffisante pour le test. Un technicien de laboratoire expérimenté procède à la macrodissection de la zone sur les lames non colorées correspondant à la superficie tumorale marquée sur la lame colorée à l'hématoxyline et à l'éosine, puis isole l'ARN des tissus. L'ARN isolé est ensuite testé sur le système d'analyse nCounter en vue d'obtenir les résultats du test, notamment le sous-type intrinsèque, le score RDR (risque de récurrence) et la catégorie de risque.

2.1 Principes du système d'analyse nCounter

Le système d'analyse nCounter utilise des paires de sondes spécifiques des gènes (figure 1) qui s'hybrident directement avec l'échantillon d'ARNm en solution, éliminant les réactions enzymatiques susceptibles d'introduire un biais dans les résultats. Pendant la première étape du dosage, les sondes d'ADN se hybrident directement avec une région comportant 70 à 100 paires de base de l'échantillon d'ARN en solution. La sonde rapporteuse fluorescente consiste en une séquence de 35 à 50 sondes de base, complémentaire de la cible ARNm et d'une séquence ADN squelette unique qui s'hybride avec six segments d'ARN marqués avec l'un des quatre colorants fluorescents : rouge (R), jaune (Y pour « yellow » en anglais), bleu (B) ou vert (G pour « green » en anglais). Les segments fluorescents créent un « code couleur » fluorescent à six positions/quadrichrome unique pour chaque cible. Une sonde de capture distincte consiste en une séquence de 35 à 50 sondes de base complémentaire de la cible ARNm et de la biotine, qui sert à l'immobilisation sur une lame recouverte de streptavidine.

Figure 1 : Hybridation du CodeSet avec l'ARNm



Après l'hybridation, toutes les étapes de purification de l'échantillon sont automatisées sur la station de préparation nCounter. Dans un premier temps, les sondes de capture et rapporteuses en excès sont éliminées (figure 2) à l'aide d'étapes successives de capture de billes magnétiques, suivies de la liaison des complexes sonde-cible à des emplacements aléatoires sur la surface de la cartouche nCounter via une liaison streptavidine-biotine (figure 3). Enfin, les complexes sonde-cible sont alignés et immobilisés (figure 4) dans la cartouche nCounter.

Figure 2 : Élimination des sondes rapporteuses en excès

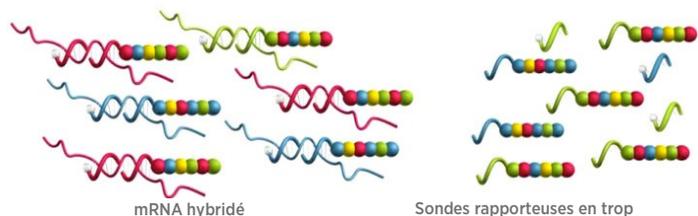


Figure 3 : Liaison des sondes rapporteuses hybridées à la surface de la cartouche

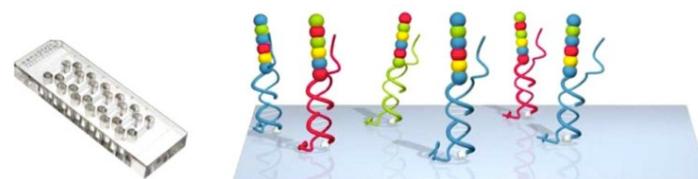
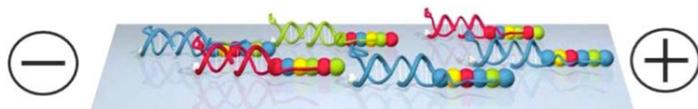


Figure 4 : Alignement et immobilisation des sondes rapporteuses hybridées



Une fois le traitement de l'échantillon terminé, la cartouche est placée dans l'analyseur numérique nCounter en vue de la collecte des données. Chaque molécule cible d'intérêt est identifiée par le « code couleur » généré par six spots fluorescents ordonnés présents sur la sonde rapporteuse correspondante. Les sondes rapporteuses qui se trouvent sur la surface de la cartouche sont ensuite dénombrées et compilées pour chaque molécule cible, et traitées avec l'algorithme (figure 5).

Figure 5 : Collecte des données

| Code | Gène | Nombre |
|------|------|--------|
| | x | 3 |
| | y | 1 |
| | z | 2 |

2.2 Principes de l'algorithme Prosigna régissant le calcul du résultat

Le test repose sur l'algorithme de classification des 50 gènes détectés initialement dénommé PAM50². Il est effectué sur le système d'analyse nCounter à l'aide de l'ARN extrait des échantillons de tissus tumoraux mammaires fixés au formol et inclus en paraffine (FFIP). L'algorithme se base sur un profil de 50 expressions géniques pour affecter le cancer du sein à l'une des quatre classes moléculaires, ou sous-types intrinsèques : Luminal A, Luminal B, HER2 enrichi ou Basal-like². Les profils d'expression génique types (p. ex., centroïde) des quatre sous-types intrinsèques ont été retraités sur le système d'analyse nCounter en utilisant des échantillons de tumeurs mammaires FFIP prélevés sur plusieurs sites cliniques en Amérique du Nord. Après le dosage de l'échantillon de test d'une patiente, un algorithme de calcul basé sur une corrélation de Pearson compare le profil de 50 expressions géniques normalisé de l'échantillon de test de la patiente aux profils d'expressions types des quatre sous-types intrinsèques du cancer du sein. Le sous-type présentant la corrélation de Pearson la plus élevée est affecté à l'échantillon de test de la patiente.

L'algorithme renvoie un score RDR (risque de récurrence) sur une échelle allant de 0 à 100³, qui est corrélé avec la probabilité de récurrence à distance à 10 ans pour les femmes post-ménopausées souffrant d'un cancer du sein précoce à récepteurs hormonaux positifs⁴. Le rapport indique aussi une catégorie de risque (faible, intermédiaire ou élevé). Le score RDR est calculé au moyen de coefficients extraits d'un modèle de Cox, qui inclut la corrélation de Pearson dans un sous-ensemble comprenant 46 gènes des 50 gènes pour chaque centroïde de sous-type intrinsèque, un score de prolifération et la taille brute des tumeurs. Les variables du test sont multipliées par les coefficients correspondants extraits du modèle de Cox pour obtenir le score, qui est ensuite ajusté sur une échelle allant de 0 à 100, sur la base des coefficients générés par l'ensemble d'essai des échantillons de tumeurs mammaires FFIP. Les catégories de risque sont également indiquées sur la base des valeurs de seuil de RDR déterminées dans le cadre d'une étude de validation clinique.

3 RÉACTIFS ET ÉQUIPEMENT FOURNIS

3.1 Présentation du kit Prosigna

Le kit Prosigna contient suffisamment de réactifs pour traiter 1, 2, 3, 4, ou 10 échantillons de patientes, selon le produit commandé. Voir les informations de commande ci-dessous. Le kit Prosigna contient un CodeSet, un tube d'échantillon de référence pour chaque ensemble de un à dix tests et des consommables, qui sont testés ensemble afin de vérifier leur bon fonctionnement avant la commercialisation.

| Référence catalogue | Nombre de tests dans le kit | Tubes d'échantillon de référence inclus |
|---------------------|-----------------------------|---|
| PROSIGNA-001 | 1 | 2 |
| PROSIGNA-002 | 2 | 2 |
| PROSIGNA-003 | 3 | 2 |
| PROSIGNA-004 | 4 | 2 |
| PROSIGNA-010 | 10 | 2 |

Recommandé pour une utilisation en association avec le kit d'isolation d'ARN Roche FFPE (Roche-FFPET-025) ou le kit d'extraction d'ARN FFIP Veracety (550100). Les deux kits d'extraction sont disponibles uniquement auprès de Veracety.

3.2 Prosigna Kit Contents de 1, 2, 3, 4, ou 10 tests

| Number of Tests | 1 | 2 | 3 | 4 | 10 |
|-----------------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| Prosigna CodeSet Box | | | | | |
| Prosigna Reporter CodeSet | 1 x 65 µL |
| Prosigna Capture ProbeSet | 1 x 70 µL |
| Prosigna RNA Reference Sample | 1 x 30 µL |
| CodeSet Barcode Sticker | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Test Configuration Code | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Prosigna Prep Plate Box | | | | | |
| Prep Plates | 1 | 1 | 1 | 1 | 2 |
| Prosigna Cartridge Box | | | | | |
| nCounter Cartridges | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Prosigna Prep Pack Box | | | | | |
| nCounter Prep Station Tips | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| nCounter Cartridge Adhesive Cover | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| nCounter Tip Sheaths | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| nCounter Hybridization Buffer | 1 x 580 µL |
| 12-Well Notched Strip Tubes | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 |
| 12-Well Notched Strip Tube Lids | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 |

Contents Description

Prosigna CodeSet

| | |
|-------------------------------|--|
| Prosigna Reporter CodeSet | <i>buffer, nucleic acids with fluorescent dyes</i> |
| Prosigna Capture ProbeSet | <i>buffer, nucleic acids</i> |
| Prosigna RNA Reference Sample | <i>buffer, nucleic acids</i> |
| CodeSet Barcode Sticker | <i>sticker sheet</i> |
| Test Configuration Code | <i>card with sticker</i> |

Prosigna Prep Plates

| | |
|-------------|--|
| Prep Plates | <i>superparamagnetic beads, buffer, salts, oligonucleotides, polystyrene beads containing fluorescent dyes</i> |
|-------------|--|

Prosigna Cartridges

| | |
|-----------------------|----------------------------|
| nCounter Cartridge(s) | <i>sample cartridge(s)</i> |
|-----------------------|----------------------------|

Prosigna Prep Pack

| | |
|-----------------------------------|---|
| nCounter Hybridization Buffer | <i>buffer, salts</i> |
| 12-Well Notched Strip Tubes | <i>plastic strips</i> |
| 12-Well Notched Strip Tube Lids | <i>plastic lids</i> |
| nCounter Prep Station Tips | <i>2 racks of 90 tips + 6 piercers nCounter</i> |
| nCounter Cartridge Adhesive Cover | <i>adhesive films</i> |
| nCounter Tip Sheaths | <i>6-well tip holders</i> |

4 AVERTISSEMENTS ET PRÉCAUTIONS

- Réservé au diagnostic *in vitro*.
- Conformément aux réglementations locales, ce dosage ne peut être effectué que par des opérateurs formés aux techniques de biologie moléculaire très complexes.
- Ne pas mélanger les composants de kits provenant de différents lots Prosigna. La fonctionnalité des composants ne peut être garantie que si les lots de kits Prosigna sont utilisés comme fournis, car c'est ainsi qu'ils sont qualifiés lors de la fabrication.
- Ne pas réutiliser le moindre résidu de réactif dans le Dosage Prosigna.
- Éliminer toute réaction dont les températures ou les délais d'hybridation auraient été compromis.
- Il est important de maintenir l'intégrité de la chaîne de possession des échantillons (tissus à ARN à dosage) pour garantir l'association de l'ID d'échantillon de la patiente au résultat de test correspondant.
- Si les réactifs ne sont pas conservés dans les conditions stipulées sur l'étiquette, les performances du dosage risquent d'être altérées.
- Toujours porter des gants lors de la manipulation des réactifs et des échantillons.
- Éviter toute contamination par RNase, car celle-ci peut altérer la qualité des résultats.

- Toutes les substances et tous les échantillons biologiques doivent être manipulés comme s'ils présentaient un risque potentiel de transmission d'agents infectieux. Ils doivent être éliminés conformément aux réglementations en vigueur aux niveaux communautaire, national et local.
- Ne jamais effectuer le pipetage avec la bouche.
- Éviter tout contact des réactifs avec les yeux, la peau et les membranes muqueuses.
- Mettre en œuvre les meilleures pratiques applicables dans un laboratoire de biologie moléculaire afin d'éviter les contaminations croisées entre les échantillons à tester ou les fortes concentrations d'acides nucléiques cibles (synthétiques ou amplifiés par PCR), car celles-ci pourraient altérer la qualité des résultats.
- Dans la mesure où de très faibles niveaux d'azoture de sodium (<0,1%) sont présents après traitement dans les plaques de préparation Prosigna et les cartouches nCounter, il est recommandé d'utiliser des récipients à déchets en plastique, et non métalliques, pour la mise au rebut des déchets. Bien que ce soit très improbable avec Prosigna, l'accumulation d'azotures de sodium sur le métal est connue pour entraîner des risques d'explosion.
- Des informations supplémentaires sur la mise au rebut spécifiques de chaque instrument sont disponibles dans le manuel d'utilisation du système d'analyse nCounter et dans le manuel d'entretien de la station de préparation et de l'analyseur numérique.
- Les fiches de données de sécurité du Reporter CodeSet, du Capture ProbeSet, du tampon d'hybridation et des plaques de préparation sont disponibles sur le site www.prosigna.com.
- Toutes les substances dangereuses doivent être éliminées conformément aux directives de l'établissement relatives à la mise au rebut des produits dangereux.
- Tout CodeSet non utilisé doit être mis au rebut.
- Si la catégorie de taille de la tumeur de la patiente est saisie incorrectement dans le logiciel, le score RDR et la classification du risque peuvent en être affectés (p. ex., altération du score RDR et/ou erreur de classification).
- Si l'état ganglionnaire d'une patiente est saisi incorrectement dans le logiciel, les résultats du test de la patiente peuvent être rapportés incorrectement (p. ex., classification du risque erronée).
- Ne pas utiliser un ARN dont la qualité ou la quantité est insuffisante ou des échantillons de tumeur dont la superficie ou la cellularité tumorale est insuffisante pour le Dosage Prosigna. Il est possible que le Dosage Prosigna ne puisse pas donner un résultat valide et se conclue à la place par un échec.

5 CONSIDÉRATIONS GÉNÉRALES RELATIVES AU DOSAGE

- Ce dosage est exclusivement réservé aux échantillons de tissus mammaires cancéreux fixés au formol et inclus en paraffine (FFIP) prélevés par résection chirurgicale. Il ne doit pas être utilisé avec des tissus cancéreux non mammaires, fraîchement prélevés ou congelés.
- La taille brute de la tumeur primaire et l'état ganglionnaire de la patiente sont nécessaires pour effectuer le dosage.
- Utiliser des embouts de micropipette jetables stériles pour éviter les contaminations microbiennes et par nucléases des réactifs ou des échantillons pendant le traitement.
- Conserver les échantillons d'ARN isolé sur de la glace humide quand ils ne sont pas manipulés activement.
- Des thermomètres étalonnés sont requis pour les blocs chauffants.
- Ne pas utiliser les composants du kit si ceux-ci sont reçus endommagés.
- Il est recommandé de développer des contrôles cliniques (par exemple pour les catégories de risque) qui serviront aux laboratoires utilisant Prosigna pour vérifier l'exactitude des résultats au fil du temps dans le cadre des procédures de contrôle de qualité standard en laboratoire.

5.1 Traitement des tissus

- Si les tissus non tumoraux/normaux voisins ne sont pas correctement retirés par macrodissection pendant le traitement des tissus, cela pourrait entraîner une sous-estimation du risque en raison de la communication d'un score RDR inférieur au médecin.
- Si l'ADN génomique humain n'est pas correctement retiré pendant l'isolation de l'ARN, cela peut entraîner un taux d'échec supérieur en raison de la faiblesse de signal du dosage, ou une surestimation du risque due à la communication au médecin d'un score RDR supérieur.
- Toutes les coupes de tissus non colorées doivent être montées sur des lames pour microscope chargées positivement afin d'éviter leur détachement pendant le traitement des tissus.
- Si les échantillons requièrent plusieurs lames, elles doivent toutes être traitées ensemble.
- Les coupes de tissus montées sur des lames peuvent se détériorer si elles sont conservées pendant plus de 9 mois dans un environnement déshydraté.

6. Afin d'éviter toute contamination, remplacer la solution de travail à 3 % de glycérol chaque semaine ou quand elle devient trouble.
7. Afin de ne pas compromettre la qualité des tissus, changer le contenu du premier récipient de lavage au D-Limonène après le traitement de 4 ensembles de lames, et le contenu du récipient d'éthanol (EtOH) et du deuxième bac à coloration au D-Limonène après le traitement de 8 ensembles de lames.
8. Faire preuve de vigilance lors de la délimitation de la région tumorale sur la lame non colorée et l'élimination des tissus non tumoraux afin de ne pas troubler les tissus tumoraux.
9. Manipuler les instruments tranchants avec précautions pendant la macrodissection.
10. Utiliser une lame de rasoir neuve pour chaque échantillon de tissu traité.
11. La solution de SDS à 10 % forme fréquemment un précipité à température ambiante et doit être réchauffée à 37 °C jusqu'à la dissolution du précipité.*
12. Les nouveaux lots de kits d'isolation d'ARN doivent être testés au regard des spécifications des kits d'isolation en vue de qualifier ces nouveaux lots pour les tests des patientes (voir la section 11.5 pour plus d'informations).

* Solution de SDS à 10 % requise mais non fournie pour le kit d'isolation d'ARN Roche FFPE.

5.2 Exécution du Dosage Prosigna

1. Vérifier que la taille catégorielle des tumeurs primaires brutes de la patiente est correctement saisie dans le logiciel.
2. Vérifier que l'état ganglionnaire catégoriel de la patiente est correctement saisi dans le logiciel.
3. Vérifier que le bloc chauffant (et son couvercle chauffant) requis pour l'hybridation est conforme aux spécifications et régulièrement étalonné.
4. N'utiliser que les consommables fournis avec le kit Prosigna. Ils sont spécialement conçus pour la station de préparation nCounter et l'analyseur numérique nCounter.
5. Si le tampon d'hybridation a été conservé à de basses températures et si un précipité est observé, chauffer les tubes à 37 °C jusqu'à la dissolution des sels.
6. Ne pas vortexer vigoureusement les composants du dosage pour les mélanger, car cela pourrait endommager les réactifs. Le mélange doit être réalisé au moyen d'une pipette.
7. Ne pas centrifuger le Reporter CodeSet à une vitesse supérieure à 3 000 x g pendant plus de 10 secondes. Ne pas utiliser l'option « impulsion » pour centrifuger, sous peine de précipiter le CodeSet.
8. Maintenir les réactions d'hybridation à 65 °C jusqu'à ce qu'elles soient prêtes à être transférées sur la station de préparation. Régler le bloc chauffant de sorte qu'il baisse à 4 °C ou placer les échantillons sur de la glace à la fin de l'hybridation pourrait entraîner une hybridation croisée, qui est à son tour susceptible de compromettre les résultats du dosage.
9. Si les tubes à bande ne sont pas placés à 65 °C dans les 15 minutes suivant l'ajout du Capture ProbeSet, il pourrait en résulter une hybridation croisée, qui à son tour pourrait compromettre les résultats du dosage.
10. Si le traitement de la station de préparation n'est pas lancé dans les 15 minutes suivant le retrait des échantillons de l'environnement à 65 °C, il pourrait en résulter une hybridation croisée, qui à son tour pourrait compromettre les résultats du dosage.
11. S'assurer que les tubes à bande sont bien bouchés avant l'hybridation dans le bloc chauffant afin d'éviter toute évaporation, ce qui pourrait compromettre les résultats du dosage.

6 INFORMATIONS SUR LA FORMATION

Ce dosage est réservé aux opérateurs professionnels formés aux techniques de biologie moléculaire très complexes, conformément aux réglementations locales. Pour plus d'informations sur la formation spécifique à l'exécution du Dosage Prosigna, contacter Veracyte.

7 GESTION DES DÉCHETS

Voir le manuel d'utilisation du système d'analyse nCounter pour plus d'informations sur la gestion des déchets spécifique des réactifs et des instruments à utiliser dans le cadre des DIV.

Voir le mode d'emploi du kit d'extraction d'ARN choisi pour plus d'informations sur la gestion des déchets spécifique des réactifs d'extraction d'ARN.

8 CONSERVATION ET MANIPULATION (RÉACTIFS)

La date de péremption de tous les composants du kit de dosage est indiquée sur l'étiquette à code-barres fournie avec la boîte du CodeSet, ainsi que sur l'étiquette de l'emballage extérieur de tous les composants Prosigna.

- Les composants de la boîte du CodeSet Prosigna (Prosigna Reporter CodeSet, Prosigna Capture ProbeSet et Prosigna RNA Reference Sample) doivent être conservés à -80 °C ou moins.
- Les cartouches nCounter doivent être conservées à une température inférieure ou égale à -20 °C.
- Les plaques de préparation nCounter doivent être conservées à 4 °C (2-8 °C).
- Les composants du kit de préparation nCounter doivent être conservés à température ambiante (15 à 25 °C).

9 INSTRUMENTS REQUIS POUR PROSIGNA

- Système d'analyse nCounter (réf. catalogue NCT-SYST-DX) (inclut les deux instruments ci-dessous)
 - o Station de préparation nCounter 5s (réf. catalogue NCT-PREP-STATION-FLEX)
 - o Analyseur numérique nCounter 5s (réf. catalogue NCT-DIGITAL-ANALYZER-FLEX)

Voir le manuel d'utilisation du système d'analyse nCounter pour plus d'informations.

10 RÉACTIFS ET ÉQUIPEMENT REQUIS MAIS NON FOURNIS

10.1 Matériel

1. Kit d'isolation d'ARN FFIP (si un produit autre que le kit d'isolation d'ARN Roche FFPE ou le kit d'extraction d'ARN FFIP Veracyte acheté auprès de Veracyte est utilisé, voir la Section 11.5 afin de connaître les caractéristiques requises pour le kit d'isolation)
2. Hématoxyline et éosine (H&E)
3. Lames pour microscope en verre chargées positivement
4. Agent de rinçage au D-Limonène (qualité histologique)
5. 100 % éthanol (absolu), qualité ACS ou équivalente (pas moins de 99,5 %)
6. Glycérol, qualité biologie moléculaire
7. Eau sans nucléase, qualité biologie moléculaire¹⁻²
8. Solution de SDS à 10 %, qualité biologie moléculaire¹
9. Isopropanol 100 %²
10. Tube conique de 50 ml²
11. Lames de rasoir (ou scalpels jetables)
12. Lames de microtome jetables
13. Tubes de microcentrifugation exempts de RNase, modèles de 0,5 ml avec bouchon à vis¹, de 1,5 et de 1,7 ml anti-adhérents
14. Embouts de micropipette exempts de RNase-free avec filtre barrière aux aérosols

¹ Matériel requis mais non fourni pour l'extraction d'ARN à l'aide du kit d'isolation d'ARN Roche FFPE.

² Matériel requis mais non fourni pour l'extraction d'ARN à l'aide du kit d'extraction d'ARN FFIP Veracyte et également indiqué dans le mode d'emploi du kit Veracyte.

10.2 Équipement

1. Microtome
2. Bain d'eau (40 °C)
3. Réchauffeur de lames (45 °C)
4. Séchoir de lames pour microscope
5. Micropipettes ; 2 µl, 20 µl, 200 µl et 1 000 µl
6. Mini-centrifugeuse avec un rotor à tubes à bande de 0,2 ml et un rotor à tubes de microcentrifugation standard de 1,5/2,0 ml
7. Microcentrifugeuse de table standard dotée d'un rotor à angle fixe, qui reçoit des tubes de centrifugation de 1,5 ml
8. Bacs à coloration en verre rectangulaire dotés de couvercles (dimensions intérieures approximatives de 3,6 x 2,8 x 2,4" (91 x 71 x 60 mm) ; 3 bacs sont requis
9. Portoir de lames (jusqu'à 10 lames en verre de 3" x 1" [75 x 25 mm])
10. Bloc chauffant à sec, fixe*
11. Vortexeur de table pour tubes de microcentrifugation
12. Cylindre gradué (taille suggérée : 100-250 ml)
13. Aiguille à dissection dotée d'une pince pour lames (angulée, sans dents)
14. Thermomètres étalonnés (couvrant la plage allant de 55 à 80 °C)
15. Spectrophotomètre UV/Vis micro-volume (voir les spécifications ci-dessous)
16. Bloc chauffant doté d'un couvercle chauffant (voir les spécifications ci-dessous)
17. Centrifugeuse dotée d'un adaptateur plaque/microplaque (voir les spécifications ci-dessous)
18. Cuve de Coplin

* Équipement requis pour l'extraction d'ARN à l'aide du kit d'isolation d'ARN Roche FFPE et du kit d'extraction d'ARN FFIP Veracyte.

10.3 Spécifications des équipements

Tableau 1 : Spectrophotomètre UV/Vis micro-volume à spectre complet pour la quantification des acides nucléiques

| Conception | Spécifications |
|---|-----------------------------|
| Plage de volumes d'échantillon | 1-2 µl |
| Longueur du trajet | 1 mm |
| Plage de longueurs d'onde | 260-280 nm |
| Erreur ou précision de la longueur d'ondes | ± 1 nm |
| Résolution spectrale ou bande passante | Inférieure ou égale à 4 nm |
| Précision de l'absorbance ou erreur photométrique aléatoire | 0,003 (trajectoire de 1 mm) |
| Limite de détection | 5 ng/µl d'ARN |
| Concentration maximale | ≥ 1 000 ng/µl d'ARN |

Tableau 2 : Spectrophotomètre UV-Vis micro-volume avec photodiode pour la quantification des acides nucléiques

| Conception | Spécifications |
|--------------------------------|----------------------------|
| Plage de volumes d'échantillon | 1-2 µl |
| Longueur du trajet | 0,5 mm |
| Plage de longueurs d'onde | 260 et 280 nm |
| Résolution spectrale | Inférieure ou égale à 8 nm |
| Précision de l'absorbance | 3 % (à 1,05 Abs à 260 nm) |
| Limite de détection | 4 ng/µl d'ARN |
| Concentration maximale | ≥ 1 000 ng/µl d'ARN |

Tableau 3 : Bloc chauffant avec couvercle chauffant pour dosage par hybridation

| Conception | Spécifications |
|-----------------------------------|--|
| Conception du bloc chauffant | <ul style="list-style-type: none"> Doit accepter les 12 tubes à bande identifiés de 0,2 ml à profil standard fournis dans le kit de préparation nCounter. <ul style="list-style-type: none"> Les blocs chauffants conçus pour les tubes à profil bas (LP, Low Profile) et à profil haut (HP, High Profile) ne sont pas compatibles (également appelés blocs « rapides » pour le thermocyclage). Les blocs chauffants conçus pour d'autres types de tubes (p. ex., tubes de 0,1 ml, tubes de 1,5 ml) ne sont pas compatibles. Doit être programmable pour se maintenir à une température de 65 °C Doit maintenir une température comprise dans une plage de 65 °C ±1 °C |
| Conception du couvercle chauffant | <ul style="list-style-type: none"> Les couvercles à hauteur fixe ou réglable sont acceptés Le couvercle doit être programmable à 70 °C |

Tableau 4 : Centrifugeuse dotée d'un portoir de microplaques pour la centrifugation des plaques de préparation nCounter

| Conception | Spécifications |
|---------------------------|--|
| Vitesse de centrifugation | Minimum de 2 000 x g |
| Rotors | Rotors à godets oscillants de 4 x 750 ml avec portoirs de microplaques (ou équivalents) pour recevoir des microplaques de 96 puits au format SBS |
| Modes | Mode d'accélération/de décélération |

11 PRÉLÈVEMENT ET TRAITEMENT DES ÉCHANTILLONS

11.1 Exigences relatives aux échantillons de tissu et examen pathologique

- Le dosage pour l'identification de la signature d'expression génique pronostique du cancer du sein Prosigna doit porter sur des échantillons de tissus tumoraux mammaires à récepteurs hormonaux positifs fixés au formol et inclus en paraffine (FFIP), qu'un anatomopathologiste doit ensuite affecter à l'un des types de carcinome invasif du sein suivants :
 - Carcinome canalaire invasif
 - Carcinome lobulaire invasif
 - Carcinome invasif présentant des caractéristiques canalaire et lobulaires (« carcinome de type mixte »)
 - Aucun type spécial (NST, No special type) ou pas autrement indiqué (NOS, Not otherwise specified)
- Un anatomopathologiste doit sélectionner le bloc tumoral FFIP présentant la région de carcinome mammaire invasif viable la plus importante pour ce test.
- Le test exige pour le traitement des coupes de tissus non colorées montées sur des lames et une lame colorée à l'hématoxyline et à l'éosine correspondante extraite du bloc tumoral FFIP.
- Il est recommandé que les coupes de tissus destinées au traitement du dosage soient découpées de façon contiguë aux coupes de tissus destinées à la coloration à l'hématoxyline et à l'éosine afin de s'assurer que la région tumorale identifiée sur la lame colorée à l'hématoxyline et à l'éosine soit représentative de la région tumorale sur les lames non colorées.
- Un anatomopathologiste doit entourer d'un cercle la région du carcinome invasif du sein viable sur la lame colorée à l'hématoxyline et à l'éosine en excluant les tissus non tumoraux adjacents.
- Un anatomopathologiste ou un technicien de laboratoire dûment formé doit évaluer la cellularité et la superficie de la tumeur dans la zone délimitée par le cercle sur la lame colorée à l'hématoxyline et à l'éosine.
 - Le pourcentage de cellularité de la tumeur sur la lame colorée à l'hématoxyline et à l'éosine doit être ≥ à 10 %
 - La superficie de la tumeur délimitée par le cercle sur la lame colorée à l'hématoxyline et à l'éosine doit être ≥ 4 mm²

*Le pourcentage de cellularité de la tumeur fait référence au pourcentage de cellules tumorales viables dans la superficie de la tumeur délimitée par le cercle.
- Une superficie tumorale totale supérieure à 100 mm² est recommandée en entrée pour le test. Le tableau suivant indique le nombre de lames recommandé en fonction de la superficie tumorale mesurée sur la lame colorée à l'hématoxyline et à l'éosine.

- Si l'examen des tissus révèle que le bloc tumoral présente une région tumorale ou une cellularité tumorale insuffisante, un autre bloc de la même tumeur peut alors être évalué. Si aucun bloc FFIP ne contient suffisamment de tissus tumoraux, le Dosage Prosigna doit alors être réexécuté. Notez que, pour les tumeurs d'une superficie inférieure à 20 mm², il est très probable que les exigences d'incorporation d'ARN ne soient pas respectées.

Tableau 5 : Exigences relatives aux lames recommandées selon la superficie tumorale

| Superficie tumorale mesurée sur la lame colorée à l'hématoxyline et à l'éosine (mm ²) | Nombre de lames non colorées |
|---|------------------------------|
| 4-19 | 6 |
| 20-99 | 3 |
| ≥ 100 | 1 |

11.2 Prélèvement et conservation des échantillons

- Les opérations suivantes peuvent être effectuées conformément aux procédures opératoires standard du laboratoire : prélèvement des tissus et fixation au formol, manipulation et conservation des blocs tumoraux FFIP, et expédition des tissus FFIP montés sur les lames.
- Les coupes de tissus FFIP montées sur les lames doivent être conservées conformément aux procédures opératoires standard du laboratoire. En cas de conservation pendant des périodes prolongées (>30 jours), les lames doivent être conservées dans un environnement déshydraté et doivent être traitées dans un délai de 9 mois pour garantir la qualité des résultats du test.

11.3 Préparation des lames

- À l'aide d'un microtome, découper une coupe épaisse de 4-5 µm pour la coloration à l'hématoxyline et à l'éosine.
- À l'aide d'un microtome, découper des coupes épaisses de 10 µm à utiliser pour le Dosage Prosigna.
- Faire flotter les coupes dans un bain d'eau à 40 °C.
- Monter les coupes sur des lames pour microscope en verre chargées positivement.
- Laisser les lames sécher à l'air.
- Cuire les lames pendant la nuit à 45 °C.

11.4 Traitement des lames

- Préparer une solution de travail au glycérol à 3 % en mélangeant 1,5 ml de glycérol avec 48,5 ml d'eau sans nucléases de qualité moléculaire, puis mettre à l'échelle comme approprié. Verser la solution dans une cuve de Coplin pour le traitement des lames.
- Verser environ 200 à 250 ml de l'agent de rinçage au D-Limonène dans deux bacs à coloration, en veillant à ce que les lames présentes dans le portoir de lames soient complètement immergées.
- Verser environ 200 à 250 ml d'éthanol absolu (EtOH) dans un troisième bac à coloration.
- Placer la ou les coupes de tissus montées sur les lames non colorées dans un portoir de lames.
- Placer le portoir de lames dans le premier bac à coloration au D-Limonène et l'agiter délicatement d'avant en arrière pendant 10 à 15 secondes. Laisser le portoir dans le premier bac à coloration au D-Limonène pendant 2 minutes au total.
- Déplacer le portoir de lames du premier bac à coloration au D-Limonène vers le deuxième bac de D-Limonène. Agiter délicatement le portoir de lames d'avant en arrière pendant 10 à 15 secondes. Laisser le portoir de lames dans le deuxième bac à coloration au D-Limonène pendant 2 minutes au total. S'assurer que la totalité de la paraffine a été éliminée ; sinon, laisser le portoir dans le deuxième bac à coloration au D-Limonène pendant 1 minute supplémentaire.
- Déplacer le portoir de lames du deuxième bac à coloration au D-Limonène vers le bac de lavage à l'EtOH. Agiter délicatement le portoir de lames d'avant en arrière pendant 10 à 15 secondes et le retirer au bout de 2 minutes.
- Laisser les lames sécher à l'air pendant 5 à 10 minutes ou jusqu'à ce qu'elles soient complètement sèches et que les tissus soient blancs (cette opération peut prendre plus de temps, selon la taille des tissus).
- Délimiter la région tumorale au dos de la lame non colorée, en l'alignant sur la lame colorée à l'hématoxyline et à l'éosine correspondante et en transposant la région délimitée.
- En manipulant une lame à la fois, réhydrater les tissus sur la lame non colorée délimitée en plongeant cette dernière dans une solution à 3 % de glycérol.
- Éliminer tout excès éventuel de glycérol de la lame au moyen d'une serviette de laboratoire.
- Lors du traitement de plusieurs lames, l'utilisateur peut laisser les lames sécher sur un séchoir pendant qu'il réhydrate les autres lames.
- Gratter tous les tissus non tumoraux éventuellement présents autour de la région tumorale délimitée avec une lame de rasoir ou un scalpel et les mettre au rebut.
- En tenant une extrémité de la lame et en laissant reposer l'autre extrémité sur une surface solide à un angle de 45°, prélever les tissus tumoraux macro-disséqués sur l'arête d'une lame de rasoir. Les tissus devraient facilement « s'enrouler » sur la lame du rasoir lors de leur prélèvement.

- Répéter l'étape précédente pour chaque lame portant le même échantillon.
Remarque : Plusieurs lames non colorées portant un même échantillon FFIP peuvent être prélevées sur la même lame de rasoir.
- Faire glisser délicatement les coupes de tissus du même échantillon dans un tube de microcentrifugation de 1,5 ml étiqueté.
- Le cas échéant, nettoyer l'aiguille à dissection ou la pince en la plongeant dans du D-Limonène pendant quelques secondes et en la séchant entre différents échantillons de tissus.

11.5 Isolation de l'ARN

Veracyte recommande d'utiliser le kit d'isolation d'ARN Roche FFPE ou le kit d'extraction d'ARN FFIP Veracyte, qui ont été validés spécifiquement pour être utilisés avec Prosigna.

D'autres kits d'isolation d'ARN peuvent être utilisés afin de préparer des échantillons pour Prosigna s'ils produisent de l'ARN à partir de sections de tissus tumoraux mammaires FFIP montées sur lames répondant aux spécifications suivantes :

Tableau 6 : Spécifications du kit d'isolation d'ARN

| Métrique | Test ou mesure | Spécification |
|----------------------------|--|---|
| Concentration d'ARN | Densité optique à 260 nm | ≥ 12,5 ng/µl |
| Volume d'ARN total (µl) | Volume élué total | ≥ 12 µl |
| Pureté de l'ARN | Rapport de densité optique à 260 nm/densité optique à 280 nm (DO 260/280 nm) | 1,7-2,3 |
| Contamination par de l'ADN | Teneur de l'échantillon d'ARN élué par de l'ADN génomique | ≤ 1 ng/µl |
| Intégrité de l'ARN | Répartition par taille des fragments d'ARN isolé | ≥ 90 % des fragments d'ARN isolé doivent avoir une longueur > à 100 nucléotides |

Attention : Si une autre procédure d'isolation est utilisée avec le Dosage Prosigna, ce flux de travail particulier doit être entièrement validé par le laboratoire avant de pouvoir l'incorporer en routine.

Procédure d'isolation d'ARN :

- Si le kit d'isolation d'ARN Roche FFPE est utilisé, suivre les instructions spécifiques à l'isolation de l'ARN décrites ci-après.
- Si le kit d'extraction d'ARN FFIP Veracyte est utilisé, suivre les instructions fournies par Veracyte, puis passer à la section 11.6.
- Si une autre méthode d'extraction est utilisée, suivre le protocole validé ou le protocole fourni par le fabricant, puis passer à la section 11.6.

Si un kit autre que le kit d'isolation d'ARN Roche FFPE est utilisé, isoler l'ARN des tissus tumoraux macro-disséqués conformément aux instructions du fabricant.

Chaque lot de kits d'extraction d'ARN fabriqué par Roche ou par Veracyte a été validé de manière à produire des échantillons d'ARN répondant aux spécifications prédéfinies pour les dosages de l'expression génique à visée diagnostique. Consulter la feuille du protocole/le mode d'emploi du kit d'extraction d'ARN choisi pour obtenir les instructions appropriées concernant le stockage, la sécurité et la manipulation.

Préparation de solutions de travail pour le kit d'isolation d'ARN Roche FFPE

- Préparer les solutions de travail avant de passer à la digestion des tissus et à l'isolation de l'ARN :

| Préparation de solutions de travail | |
|-------------------------------------|--|
| Réactif | Procédure |
| Tampon d'eau I (WBI)* | Ajouter 15 ml d'éthanol à 100 % et stocker le WBI préparé entre +15 et +25 °C |
| Tampon d'eau II (WBII)* | Ajouter 80 ml d'éthanol à 100 % et stocker le WBII préparé entre +15 et +25 °C |
| Protéinase K (PK) | Dissoudre la protéinase K lyophilisée dans 4,5 ml de tampon de préparation de réactif (RPB) Préparer 600 µl d'aliquots, puis les étiqueter et les conserver entre -15 et -25 °C |
| DNase I (DNase I)* | Dissoudre la DNase I lyophilisée dans 740 µl de tampon de préparation de réactif (RPB) Préparer 50 µl d'aliquots, puis les étiqueter et les conserver entre -15 et -25 °C |

Remarque : Les éléments marqués d'un astérisque (*) ne sont pas requis jusqu'à ce que le tissu ait été digéré.

Digestion des tissus pour le kit d'isolation d'ARN Roche FFPE

- Décongeler un nombre suffisant d'aliquots de protéinase K (PK). Une fois qu'elles sont décongelées, stocker les aliqots sur de la glace jusqu'à leur utilisation.
Remarque : Un aliqot de 600 µl de PK contient suffisamment de protéinase K pour 4 digestions tissulaires.
- Ajouter 100 µl de tampon de lyse tissulaire, 16 µl de SDS à 10 % et 120 µl de solution de travail à la protéinase K dans des tubes d'échantillon contenant les tissus.
- Vortexer quelques secondes les tubes d'échantillon contenant les tissus et centrifuger brièvement.
- Incuber à 55 °C pendant la nuit (12 heures – 23 heures).

Isolation de l'ARN pour le kit d'isolation d'ARN Roche FFPE

- Contrôler visuellement les tubes d'échantillon pour déterminer si le tissu est complètement digéré. Une digestion complète se traduit par une solution transparente ne contenant pas ou très peu de tissu.
 - Si la digestion est complète, passer à l'étape suivante.
 - Si la digestion est incomplète, ajouter 20 µl de protéinase K supplémentaire et incuber pendant une heure de plus.
- Centrifuger brièvement tous les échantillons (<30 secondes dans une mini-centrifugeuse).
- Incuber les échantillons à 80 °C pendant 15 minutes.
- Préparer ou décongeler un nombre suffisant d'aliqots de DNase. Une fois qu'elles sont décongelées, stocker les aliqots sur de la glace jusqu'à leur utilisation.
Remarque : Un aliqot de 50 µl de DNase contient suffisamment de DNase pour 4 isolations d'ARN.
- Diluer la DNase dans le tampon d'incubation de la DNase (DIB). La quantité requise pour N (nombre de) isolations d'ARN est : (N+1) × 90 µl de tampon d'incubation DNase + (N+1) × 10 µl de DNase. Stocker la solution DNase diluée sur de la glace jusqu'à son utilisation.
- Ajouter 325 µl de tampon de liaison à la paraffine (PBB) et 325 µl d'éthanol absolu à chaque échantillon et mélanger en pipetant.
- Centrifuger brièvement (< 30 secondes dans une mini-centrifugeuse).
- Placer un tube à filtre Haute pureté sur un tube de prélèvement Haute pureté.
- Pipeter l'échantillon dans le réservoir supérieur du tube à filtre en évitant de prélever les tissus résiduels.
- Centrifuger pendant 30 secondes à 6 000 x g.
- Placer un tube à filtre Haute pureté sur un nouveau tube de prélèvement Haute pureté (jeter l'ancien tube de prélèvement contenant le renouvellement).
- Centrifuger pendant 2 minutes à 16 000 x g pour sécher complètement la membrane du filtre.
- Placer un tube à filtre Haute pureté sur un nouveau tube de prélèvement Haute pureté (jeter l'ancien tube de prélèvement contenant le renouvellement).
- Ajouter 100 µl de solution DNase diluée dans le filtre du tube à filtre Haute pureté et incuber pendant 15 minutes entre +15 et +25 °C.
- Ajouter 500 µl de solution de travail Tampon d'eau I (WBI) au filtre Haute pureté, centrifuger pendant 20 à 30 secondes à 6 000 x g, puis éliminer le renouvellement.
- Ajouter 500 µl de solution de travail Tampon d'eau II (WBII) au filtre Haute pureté, centrifuger pendant 20 à 30 secondes à 6 000 x g, puis éliminer le renouvellement.
- Ajouter 500 µl de solution de travail Tampon d'eau II (WBII) au filtre Haute pureté, centrifuger pendant 20 à 30 secondes à 6 000 x g, puis éliminer le renouvellement.
- Centrifuger pendant 2 minutes à 16 000 x g pour sécher complètement la membrane du filtre.
- Placer le tube à filtre Haute pureté dans un tube de microcentrifugation de 1,5 ou 1,7 ml sans RNase étiqueté.
- Ajouter 30 µl de tampon d'éluion (EB) au centre du filtre Haute Pureté.
- Incuber pendant 1 minute entre +15 et +25 °C.
- Centrifuger pendant 1 minute à 6 000 x g pour éluier l'ARN de la colonne. Retirer et jeter le tube du filtre Haute pureté.
- Centrifuger l'ARN élué dans le tube de microcentrifugation pendant 2 minutes à vitesse maximum.
- Transférer le surnageant dans un tube de 0,5 ml avec bouchon à vis (sans troubler les fibres de verre susceptibles d'avoir été entraînées du filtre vers le fond du tube d'origine).

11.6 Mesure de la concentration et de la qualité de l'ARN

- Mesurer la concentration de l'ARN isolé dans la même journée (stocker entre +2 et +8 °C) ou congeler à -70 °C ou moins jusqu'à utilisation.
- Mesurer la densité optique (DO) à 260 et 280 nm de 2 µl d'ARN isolé à l'aide d'un spectrophotomètre conforme aux spécifications définies à la section 10.3 Spécifications de l'équipement. Éviter de pipeter les 2 µl au fond du tube source pour ne pas prélever d'éventuelles fibres de verre, qui interféreraient avec la mesure de la densité optique.
- Suivre les instructions du fabricant du spectrophotomètre relatives à la mesure de l'ARN.
- Si un échantillon ne satisfait pas aux critères minimum de pureté ou de concentration de l'ARN (tableau 6), centrifuger le tube d'échantillon pendant 1 minute à vitesse maximale (> 10 000 x g), placer le tube sur de la glace et répéter la mesure. Si l'échantillon d'ARN ne satisfait toujours pas le critère de pureté ou de concentration, cela signifie qu'il ne convient pas à l'analyse dans le cadre de la procédure de Dosage Prosigna. Ne pas utiliser un ARN dont la qualité ou la quantité est insuffisante pour le Dosage Prosigna.

5. L'extraction d'ARN peut être répétée si les spécifications minimum de concentration ou de pureté ne sont pas satisfaites (tableau 6). Les utilisateurs peuvent choisir d'isoler des lames supplémentaires à partir du même bloc FFIP ou ils peuvent choisir un bloc distinct prélevé sur la même patiente.
6. Si la concentration d'ARN est supérieure à 250 ng/μl, la solution doit être diluée dans de l'eau de qualité moléculaire exempte de RNase et de DNase à une concentration cible de 200 ng/μl avant le dosage par hybridation en aval. Utiliser le ratio DO 260/280 enregistré résultant de l'échantillon non dilué pour déterminer si l'échantillon dilué satisfait au critère de pureté d'ARN minimum égal à 1,7.
7. Si le Dosage Prosigna ne peut pas être réalisé pendant la même journée de travail, congeler l'ARN à une température inférieure ou égale à -70 °C.

- c. Si la concentration calculée de l'échantillon est comprise entre 12,5 ng/μl et 25 ng/μl, ajouter le volume maximum de 10 μl.
- d. Pour les échantillons nécessitant moins de 10 μl, calculer le volume d'eau requis pour obtenir le volume d'échantillon total de 10 μl.

Exemple : Pour un échantillon dont la concentration d'ARN mesurée est égale à 85 ng/μl, 2,9 μl d'échantillon sont nécessaires pour une masse totale de 250 ng et 7,1 μl d'eau sont requis pour porter le volume à 10 μl avant l'ajout des réactifs restants. Dans l'équation : $250 \text{ ng} \div 85 \text{ ng}/\mu\text{l} = 2,9 \mu\text{l}$

Enregistrement et traitement des échantillons

Grâce à l'application en ligne des services d'analyse nCounter, l'utilisateur créera une ID de série unique pour chaque lot d'échantillons en associant les ID d'échantillon avec l'emplacement des tubes à bande (positions 3 à 12). Pour obtenir les instructions d'utilisation de l'application en ligne des services d'analyse nCounter, l'utilisateur peut consulter le manuel d'utilisation.

11.7 Procédure de dosage

Cette procédure de dosage décrit les étapes à suivre pour effectuer le Dosage Prosigna à l'aide du système d'analyse nCounter. Ces étapes peuvent être regroupées dans les catégories suivantes pendant deux jours consécutifs :

Jour 1

- Configuration de l'enregistrement d'identification RSID (Run Set Identification) dans l'application en ligne
- Configuration de l'hybridation de l'ARN avec le CodeSet Prosigna (configuration : 30 min, hybridation : 15 à 21 h)

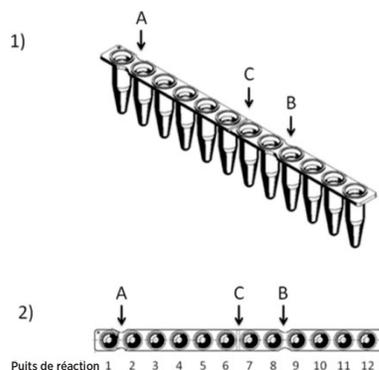
Jour 2

- Configuration et utilisation de la station de préparation (20 minutes de configuration, 2 à 3 heures par série, en fonction du nombre d'échantillons traités)
- Configuration et analyse de la cartouche sur l'analyseur numérique (configuration : 5 minutes, entre 2,5 et 4,5 h pour chaque cartouche, en fonction du nombre d'échantillons traités)
- Récupération de rapport (30 minutes)

Sélection des échantillons de patientes et configuration des lots

1. Déterminer les échantillons de la patiente qui seront soumis au test. Il est possible d'inclure jusqu'à 10 échantillons dans un lot unique.
 - a. Chaque échantillon du lot sera affecté à une position unique dans le tube à bande à 12 puits utilisé pour l'hybridation, qui est enregistrée sous l'ID de série (Run Set ID) sur l'instrument (Run Set ID exécuté dans le logiciel en ligne). Noter que les positions 1 et 2 sont réservées à l'échantillon de référence, tandis que les positions 3 à 12 sont affectées aux échantillons d'ARN des tissus tumoraux.
 - b. L'illustration ci-dessous présente une vue de côté 1) et une vue de haut 2) du tube à bande. Les tubes à bandes sont verrouillés de façon asymétrique entre les puits de réaction 1 et 2 (A), ainsi que 8 et 9 (B) pour contribuer à maintenir l'ordre des échantillons pendant le traitement. Les tubes à bandes comportent également une entaille entre les puits de réaction 6 et 7 (C) pour faciliter la coupe du tube à bande, si nécessaire, pour prendre en charge les adaptateurs de centrifugeuse standard.

Figure 6 : Illustration des tubes à bandes verrouillés



2. Calculer la quantité d'ARN et d'eau (le cas échéant) à ajouter à la réaction d'hybridation pour chaque échantillon du lot.
 - a. L'incorporation d'ARN recommandée est de 250 ng pour le dosage. La plage d'incorporation d'ARN acceptable pour l'hybridation est comprise entre 125 et 500 ng.
 - b. Calculer le volume (en microlitres) de l'échantillon d'ARN à ajouter à la réaction d'hybridation en divisant l'apport d'échantillon souhaité (p. ex., 250 ng) par la concentration mesurée.

1. Si l'ARN a été congelé avant utilisation, procéder comme décrit ci-dessous avant de poursuivre :
 - a. Décongeler complètement les échantillons d'ARN et les conserver sur de la glace.
 - b. Centrifuger le tube d'échantillon décongelé pendant 1 minute à vitesse maximale (> 10 000 x g) et le replacer sur de la glace.
 2. Choisir la taille du kit de test Prosigna en fonction du nombre d'échantillons de patientes à tester (1, 2, 3, 4 ou 10). Retirer un tube de chacun des réactifs du kit CodeSet suivants du congélateur à -80 °C et les décongeler. Si les étapes suivantes ne sont pas effectuées immédiatement, stocker les réactifs sur de la glace.
 - a. Prosigna Reporter CodeSet (autocollant vert sur le bouchon)
 - b. Prosigna Capture ProbeSet (autocollant gris sur le bouchon)
 - c. Prosigna Reference Sample (aucun autocollant sur le bouchon)
 3. Retirer l'autocollant à code-barres du lot de CodeSet et sortir un code de configuration du test de la boîte du CodeSet.
 4. À l'aide d'un navigateur Web, se connecter à l'application en ligne du système d'analyse nCounter IVD et sélectionner le type de Dosage Prosigna pour commencer à configurer les formulaires d'enregistrement numériques.
 5. Dans la page principale, sélectionner l'option Create New Run Set (Créer une nouvelle série).
 6. Le premier champ obligatoire pour définir une série Prosigna est le champ Run Set ID (ID de série). Saisir un identifiant unique dans le champ Run Set ID (ID de série) pour identifier le lot d'échantillons.
 7. Lire ou saisir manuellement le code de configuration du test dans l'application en ligne. Lorsque le code a été lu ou saisi, il peut être jeté.
 8. Lire ou saisir manuellement le numéro du kit de CodeSet dans l'application en ligne.
 9. Saisir ensuite l'ID unique de l'échantillon qui sera placé dans le puits ou la position numéro 3 du tube à bande dans le champ d'ID d'échantillon correspondant.
 - a. Saisir les ID d'échantillon d'ARN de la patiente à l'aide d'un lecteur de codes-barres ou en les tapant manuellement au clavier.
 - b. Après avoir saisi chaque ID d'échantillon, appuyer sur la touche de tabulation pour renseigner les champs déroulants requis (taille brute des tumeurs et état ganglionnaire) pour l'échantillon avant de passer à l'échantillon suivant.
 - i. Utiliser le nombre de ganglions établi pendant l'évaluation pathologique de la patiente pour sélectionner la catégorie ganglionnaire appropriée pour le test (zéro, 1-3, ≥ 4).
 - ii. Utiliser la taille des tumeurs brutes mesurée ou le stade établi pendant l'évaluation pathologique de la patiente pour sélectionner la catégorie de taille tumorale brute appropriée pour le test (≤ 2 cm ou > 2 cm).
 - c. Tous les commentaires peuvent être saisis dans le champ Memo (Mémo) facultatif pour chaque échantillon.
- Remarque :** Laisser les champs restants vierges si aucun puits ou position pour tube à bande n'est requis. Si des champs supplémentaires sont requis pour davantage d'échantillons, utiliser une autre configuration de test qui sera adaptée à un plus grand nombre d'échantillons.
10. Après avoir renseigné les champs relatifs aux échantillons, indiquer les utilisateurs qui recevront les informations suivantes :
 - a. Actualisations de l'état des séries traitées sur la station de préparation et l'analyseur numérique.
 - b. Notification indiquant la disponibilité du rapport final.
 11. Enregistrer la série complétée.
 - a. La fiche de travail des séries peut être imprimée et utilisée pour la traçabilité et la vérification des échantillons.

Procédure de réaction d'hybridation

Remarque : Les étapes suivantes supposent que dix (10) échantillons de patientes et deux (2) échantillons de référence sont utilisés.

Remarque : Ne pas centrifuger le Reporter CodeSet à une vitesse supérieure à 3 000 x g pendant plus de 10 secondes et ne pas le « battre ». Cela risque de faire fonctionner la centrifugeuse à vitesse maximum et d'éjecter le CodeSet hors de la solution.

1. Programmer le bloc chauffant en utilisant un volume de 30 µl, la température du bloc et du couvercle calculée et le réglage de temps « forever » (Toujours) (ou un temps équivalent). Régler la température du bloc chauffant sur 65 °C et celle du couvercle chauffant sur 70 °C.

Remarque : Au cours des étapes suivantes, il est essentiel de maintenir l'ordre dans lequel les échantillons sont ajoutés dans le tube à bande, en veillant à ce que celui-ci corresponde à l'ordre des champs Run Set ID (ID de série).

2. Étiqueter le tube à bande à 12 puits identifié fourni pour distinguer les positions 1 à 6 des positions 7 à 12 (voir l'illustration des tubes à bande).

3. Si nécessaire, couper le tube à bande en deux, de sorte qu'il tienne dans une mini-centrifugeuse avec un adaptateur de tube à bande.

4. Pipeter 10 µl de l'échantillon de référence dans les positions 1 et 2 du tube à bande identifié.

5. Pipeter le volume calculé d'eau requis pour chaque échantillon dans les positions respectives du tube à bande identifié.

6. À l'aide d'un embout de pipette neuf pour chaque échantillon, pipeter le volume calculé d'ARN requis pour chaque échantillon dans la position appropriée du tube à bande identifié.

7. Une fois l'échantillon de patiente ajouté dans le tube à bande, il est recommandé de placer le tube échantillon dans un portoir de tubes d'échantillon, en conservant l'ordre dans lequel l'échantillon a été ajouté dans le tube à bande. Cela permet de vérifier que l'ordre souhaité a été respecté après que tous les échantillons ont été ajoutés dans le tube à bande.

8. Après que tous les échantillons ont été ajoutés dans le tube à bande, vérifier que leur ordre a été respecté dans le tube à bande (pour ce faire, l'utilisateur peut se référer à la fiche de travail des séries).

- Si nécessaire, modifier les champs Run Set ID (ID de série) dans l'application en ligne pour refléter l'ordre des échantillons dans la disposition finale. Pour savoir comment modifier les champs Run Set ID (ID de série) existants, voir le manuel d'utilisation du système d'analyse nCounter.

9. Une fois que l'ordre des échantillons a été vérifié, replacer chaque tube d'échantillon ARN sur de la glace.

10. Créer un master mix contenant 130 µl du tampon d'hybridation et 65 µl du Reporter CodeSet.

Remarque : Si le Reporter CodeSet a été conservé sur de la glace, le laisser s'équilibrer à température ambiante pendant 1 minute avant d'ajouter le tampon d'hybridation.

11. Mélanger en pipetant et centrifuger brièvement le master mix.
Remarque : Ne pas ajouter le Capture ProbeSet au master mix ET ne pas conserver le master mix final sur de la glace.

12. Pipeter 15 µl de master mix dans chacun des 12 puits. Utiliser un embout de pipette neuf pour chaque puits.

Remarque : Après avoir effectué l'étape suivante, placer le tube à bande dans le bloc chauffant à 65 °C dans un délai de 15 minutes.

13. Ajouter 5 µl de Capture ProbeSet dans chaque puits en utilisant un embout de pipette neuf pour chaque puits.

14. Boucher les puits du tube à bande, puis mélanger les réactifs en retournant le tube à bande plusieurs fois et en le tapotant avec un doigt pour s'assurer de bien le mélanger.

15. Centrifuger brièvement les échantillons contenus dans le tube à bande dans une mini-centrifugeuse (par exemple de marque Picofuge) à < 3 000 x g.

Remarque : Utiliser une microcentrifugeuse Picofuge qui peut contenir un tube à bande à 12 puits ou, si nécessaire, une mini-centrifuge qui accepte des tubes à bande coupés.

16. Placer le(s) tube(s) à bande dans un bloc chauffant à 65 °C doté d'un couvercle chauffant. Incuber les dosages par hybridation à 65 °C pendant 15 à 21 heures. Les hybridations doivent être laissées à 65 °C jusqu'à ce qu'elles soient prêtes pour le traitement sur la station de préparation.

Remarque : Éliminer tout CodeSet non utilisé.

Traitement des échantillons sur la station de préparation nCounter

1. Identifier la station de préparation associée à l'analyseur numérique.
2. Retirer les cartouches nCounter du congélateur à -20 °C et les laisser revenir à l'équilibre à température ambiante pendant 10 à 15 minutes dans la pochette en aluminium.

Remarque : Vérifier que des composants du même lot de kit sont utilisés ensemble.

3. Une fois que les cartouches ont atteint la température ambiante, les retirer de la pochette en aluminium avant de les charger sur le plateau de la station de préparation.

4. Retirer les plaques de préparation nCounter du réfrigérateur à 4 °C et les laisser revenir à l'équilibre à température ambiante pendant 10 à 15 minutes.

Remarque : Une seule plaque de préparation est requise pour les séries exécutées avec un kit Prosigna de 1, 2, 3 ou 4 tests.

5. Centrifuger les plaques de préparation à 2 000 x g pendant 2 minutes pour recueillir les liquides au fond des puits avant de charger les plaques de préparation sur le plateau de la station de préparation.

6. Pendant que les cartouches et les plaques de préparation parviennent à température ambiante, Préparer la station de préparation avec les consommables du kit de préparation nCounter.

7. Sur l'écran tactile de la station de préparation nCounter, toucher le bouton Diagnostics pour le dosage.

8. Dans l'interface à écran tactile de l'écran Main Menu (Menu principal), sélectionner le bouton Process Samples (Traiter des échantillons).

9. Parcourir la liste des ID de série (RSID) disponibles illustrée à l'écran pour confirmer le RSID des échantillons en cours de traitement.

10. Dans l'interface à écran tactile, sélectionner le RSID puis sélectionner Next (Suivant).

11. Dans l'interface à écran tactile, vérifier que le RSID approprié a été choisi en examinant chaque tube à l'écran et en croisant les informations relatives aux échantillons.

a. Il est possible de se référer à ce stade à la fiche de travail des séries pour la traçabilité et la vérification des échantillons.

b. Si un RSID incorrect a été sélectionné, toucher le bouton Back (Précédent) et choisir le RSID correct.

c. Si le RSID est correct mais si les échantillons indiqués comportent des erreurs, toucher le bouton « Back » (Précédent) et modifier le RSID sur une station de travail informatique via l'application en ligne.

Figure 7 : Écran de traitement d'une série sur une station de préparation



12. Dans les écrans suivants, l'utilisateur sera invité à lire les ID de codes-barres des réactifs demandés dans les champs ouverts ou confirmer le placement des consommables requis sur le plateau. Après l'exécution de chaque tâche, sélectionner Next (Suivant) dans l'interface à écran tactile pour passer à l'étape suivante.

Remarque : Une seule plaque de préparation et un seul tube à bande pour bloc chauffant vide sont requis pour les séries exécutées avec un kit Prosigna de 1, 2, 3 ou 4 tests. Pour les séries du kit de 1, 2, 3 ou 4 tests, charger la plaque de préparation et le tube à bande pour bloc chauffant vide dans leurs positions avant respectives (les plus proches de l'utilisateur) sur le plateau de la station de préparation.

13. Retirer les échantillons du bloc chauffant.

Remarque : Lancer la série sur la station de préparation dans les 15 minutes suivant le retrait des échantillons du bloc chauffant.

14. Placer le(s) tube(s) à bande dans une mini-centrifugeuse (par exemple de marque Picofuge) et centrifuger brièvement (à < 3 000 x g).

15. Retirer délicatement les bouchons du ou des tubes à bande.

16. Les rainures sur le tube à bande et les guides sur la station de préparation doivent préserver l'ordre et l'orientation des échantillons.

17. Placer le(s) tube(s) à bande avec les puits dans l'ordre 1 à 12, de gauche à droite, sur le plateau de la station de préparation nCounter. En cas d'exécution avec un kit de 1, 2, 3 ou 4 tests, seule la première moitié du tube à bande (puits 1 à 6) doit être placée à gauche du portoir de tubes d'échantillon sur le plateau, le cas échéant. La seconde moitié du tube à bande (puits 7 à 12) ne s'adapte pas dans la partie gauche du portoir à cause de l'encoche présente sur le tube.

18. Vérifier que les tubes à bande sont bien installés sur la station de préparation et fermer le couvercle métallique.

19. Si le couvercle ne se ferme pas correctement, l'utilisateur est invité à le fermer lors de la validation de la disposition du plateau.

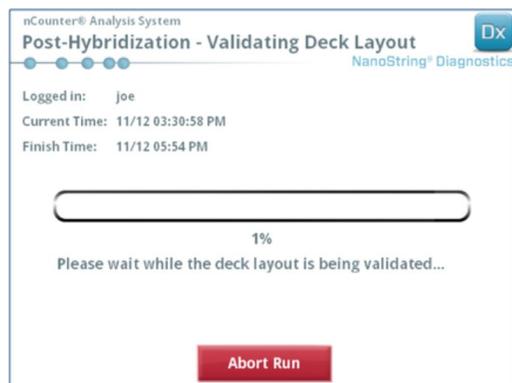
20. Sélectionner Next (Suivant) dans l'interface de l'écran tactile.

21. Fermer la porte de l'instrument quand le système le demande, puis sélectionner Next (Suivant) pour lancer la validation de la disposition du plateau.
22. Si une erreur se produit, suivre les instructions associées à celle-ci afin de poursuivre la validation de la disposition du plateau.

9. Pour ajouter une cartouche dans un analyseur numérique qui est déjà en train d'analyser des cartouches, toucher Pause sur l'écran Counting Cartridges (Comptage de la cartouche) et attendre que l'analyseur numérique suspende l'analyse en cours.
10. Ouvrir la porte de l'analyseur numérique.
11. Placer la cartouche à ajouter dans un emplacement vide (voir le guide des états de position ci-dessus).
12. Fermer la porte et toucher Resume (Reprendre).
13. Une fois l'analyse terminée, le logiciel envoie le rapport correspondant aux adresses de messagerie précédemment définies pour les utilisateurs.
14. À la réception de la notification par courriel, retirer la cartouche complétée et la mettre au rebut conformément aux directives de l'établissement.
15. En cliquant sur le lien joint à ce courriel, ouvrir l'application en ligne et télécharger tous les rapports de test associés au RSID en cours de traitement.
16. Suivi des erreurs : Suivre la recommandation indiquée dans le rapport de test concernant chaque erreur système ou échantillon.

Remarque : Les échecs d'échantillons individuels ne sont pas considérés comme des erreurs système.

Figure 8 : Validation de la disposition du plateau sur la station de préparation après l'hybridation



23. Après que la disposition du plateau a été validée, sélectionner Start Processing (Lancer le traitement) dans l'interface de l'écran tactile.
- Remarque :** Si des problèmes surviennent lors du démarrage de la station de préparation, remettre les échantillons hybridés dans le bloc chauffant, mais ne pas excéder le temps maximal de 21 heures.
24. Une fois la série terminée, suivre les invites de la station de préparation.
25. Lorsque la station de préparation a fini la série, retirer soigneusement la cartouche de la station de préparation et boucher les puits de la cartouche avec le cache adhésif pour puits de cartouche fourni.
- Remarque :** Ne pas laisser la cartouche débouchée sur la station de préparation pendant la nuit.
26. Si l'utilisateur ne prévoit pas d'analyser les échantillons le jour même, conserver la cartouche à 4 °C dans une boîte opaque pendant 1 semaine au maximum.

Analyse de la cartouche sur l'analyseur numérique nCounter

1. Identifier l'analyseur numérique lié à la station de préparation qui a traité les échantillons. Charger la cartouche sur l'analyseur numérique nCounter en vue de son analyse.
 - a. Ouvrir la porte de l'analyseur numérique.
 - b. Placer la cartouche à ajouter dans un emplacement vide.
 - c. Fermer la porte et consulter l'affichage de l'écran tactile.
2. L'interface à écran tactile de l'analyseur numérique contient plusieurs graphiques différents, qui aident à identifier rapidement l'état des positions :
 - a. Emplacement vide : Cet emplacement est vide et prêt pour le chargement d'une nouvelle cartouche.
 - b. Cartouche bleue complète : Analyse terminée.

NE PAS RETIRER LES CARTOUCHES SUIVANTES :

 - a. Cartouche blanche : Cet emplacement contient une cartouche enregistrée, mais non analysée.
 - b. Cartouche bleue partielle : Cet emplacement contient une cartouche en cours d'analyse.
3. Les cartouches dont l'analyse est terminée peuvent être retirées de l'analyseur numérique.
4. S'il s'agit de la première cartouche chargée sur l'analyseur numérique, toucher le bouton Diagnostics, puis cliquer sur le bouton Main Menu (Menu principal) pour se connecter à l'analyseur numérique. Si l'analyseur numérique est déjà en train d'analyser des cartouches, passer à l'étape 9 ci-dessous.
5. Placer soigneusement la cartouche dans un emplacement vide (voir le guide des états de position ci-dessus) de l'analyseur numérique. L'emplacement et la cartouche sont verrouillés afin de garantir que l'orientation est correcte. Le code-barres est orienté face vers le haut.
6. Abaisser le couvercle à fente et appuyer sur la cartouche à travers l'ouverture dans l'emplacement dédié pour s'assurer qu'elle est correctement insérée.
7. Toucher le bouton Start Counting (Lancer le comptage) et attendre que le lecteur commence l'analyse. Une série de petits clics rythmés sont audibles lorsque l'analyseur numérique commence à analyser la cartouche.
8. S'assurer qu'une barre bleue apparaît à la position de la cartouche à l'écran (dans les 5 minutes suivant le démarrage de l'analyse) pour indiquer que l'analyse a commencé.

12 DÉPANNAGE ET ÉCHECS DE TESTS

Tableau 7 : Codes d'erreur entraînant la répétition du test

| Code d'erreur | Description de l'échec | Action recommandée |
|---------------|------------------------|---|
| 5 | Échec de l'analyse | Retraiter l'échantillon avec 250 ng d'ARN |
| 7 | Signal élevé | Respécifier l'échantillon et réexécuter le test avec 125 ng d'ARN |
| 6 | Signal faible | Respécifier l'échantillon et réexécuter le test avec 500 ng d'ARN |
| 30 | Signal faible | Respécifier l'échantillon et réexécuter le test avec 500 ng d'ARN |
| 31 | Signal d'ARN faible | Respécifier l'échantillon et réexécuter le test avec 500 ng d'ARN |

Motifs de répétition du dosage :

1. Le rapport de dosage identifie les échantillons qui ont échoué et aucun résultat de dosage n'est alors renvoyé. Les résultats sont renvoyés si les échantillons sont bien traités.
2. Le rapport de dosage indique le type d'échec et l'action recommandée en cas d'échec du dosage. Selon le type d'échec et la quantité d'ARN restante pour obtenir un résultat, la concentration d'ARN des échantillons qui ont échoué peut être mesurée à nouveau et les échantillons peuvent être retraités (dans le cadre d'un nouveau lot/RSID).

13 RÉSULTATS DU DOSAGE

Le Dosage Prosigna comprend une série de métriques de contrôle de qualité qui sont appliquées automatiquement à chaque échantillon pendant leur analyse. Ces métriques évaluent dans quelle mesure le dosage détermine si les résultats sont compris dans les limites des valeurs attendues. Si l'analyse de ces critères de contrôle de qualité aboutit, le Dosage Prosigna renvoie les résultats suivants :

Tableau 8 : Résultats du Dosage Prosigna

| Résultat | Valeurs résultantes |
|--|--|
| Sous-type intrinsèque de l'échantillon de cancer du sein | Luminal A Luminal B HER2 enrichi Basal-Like |
| Estimation individuelle de la probabilité de récurrence à distance dans 10 ans | 0-100 % |
| Score RDR (Risque de récurrence) | Valeur entière sur une échelle de 0 à 100 |
| Catégorie de risque | Faible, intermédiaire, élevé |

13.1 Sous-types intrinsèques

Il a été démontré que le sous-type intrinsèque d'une tumeur du cancer du sein est lié au pronostic du cancer du sein précoce. En moyenne, les patientes présentant une tumeur de type Luminal A obtiennent des résultats nettement supérieurs à ceux des patientes souffrant d'une tumeur de type Luminal B, HER2 enrichi ou Basal-like²⁵.

Le sous-type intrinsèque est identifié en comparant le profil d'expression génique de 50 gènes dans un échantillon inconnu avec les profils d'expression attendus des quatre sous-types intrinsèques. Le sous-type présentant le profil le plus similaire est affecté à l'échantillon inconnu.

Les sous-types de cancer du sein les plus courants sont les sous-types luminaux, Luminal A (LumA) et Luminal B (LumB). Des études antérieures suggèrent que le type Luminal A représente environ 30 % à 40 % des cancers du sein, et le type Luminal B environ 20 % de ce cancer⁵. Toutefois, plus de 90 % des patientes présentant des récepteurs hormonaux positifs ont des tumeurs lumineuses. Le motif d'expression génique de ces sous-types ressemble au composant épithélial luminal des tissus mammaires⁵. Ces tumeurs se caractérisent par une forte expression du récepteur d'œstrogènes (ER), du récepteur de progestérone (PR) et des gènes associés à l'activation de l'ER, par exemple *LIV1*, *GATA3* et *cycline D1*, ainsi que l'expression des cytokératines lumineuses 8 et 18. Les cancers du sein de type Luminal A présentent une plus faible expression des gènes associés à l'activation du cycle cellulaire que les cancers du sein de type Luminal B, permettant ainsi d'établir un meilleur pronostic.

Des études antérieures suggèrent que le sous-type HER2 enrichi (HER2-E) représente environ 20 % des cancers du sein⁵. Toutefois, les tumeurs de type HER2 enrichi étant généralement ER-négatives, il a été démontré que 5 % seulement des patientes testées ER-positives présentaient un cancer du sein de type HER2 enrichi. Quel que soit l'état des récepteurs d'œstrogènes, les tumeurs de type HER2 enrichi sont HER2-positives dans la majorité des cas, avec une forte expression du cluster ERBB2, y compris ERBB2 et GRB7. On observe également une forte expression des gènes associés à l'activation du cycle cellulaire.

Les données publiées suggèrent que le sous-type Basal-like représente environ 20 % des cancers du sein⁵. Toutefois, les tumeurs de type Basal-like étant généralement ER-négatives, 1 % seulement des patientes à récepteurs hormonaux positifs présentent un cancer du sein de type Basal-like. Le sous-type Basal-like est presque toujours cliniquement HER2-négatif et exprime une suite de biomarqueurs de base, notamment les cytokératines (CK) épithéliales basales et le récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR). On observe également une forte expression des gènes associés à l'activation du cycle cellulaire.

13.2 Score RDR

Le score RDR est une valeur entière comprise sur une échelle allant de 0 à 100, qui est liée à la probabilité de récidive à distance à 10 ans d'une patiente individuelle pour l'utilisation prévue auprès de la population définie. Le score RDR est calculé en comparant le profil d'expression de 46 gènes contenus dans un échantillon inconnu avec les profils attendus pour les quatre sous-types intrinsèques, comme décrit ci-dessus, en vue de calculer quatre valeurs de corrélation différentes. Ces valeurs de corrélation sont ensuite combinées avec un score de prolifération et la taille brute des tumeurs pour calculer le score RDR.

13.3 Probabilité de récidive à distance à 10 ans

Les scores RDR de 2 cohortes de femmes post-ménopausées souffrant d'un cancer du sein précoce à récepteurs hormonaux positifs ont été comparés aux taux de survie sans récidive à distance après chirurgie et traitement avec 5 ans d'endocrinothérapie adjuvante suivis de 5 ans d'observation (voir la section 16.4 Performances cliniques pour plus d'informations). Ces deux études ont débouché sur un modèle qui lie le score RDR à la probabilité de récidive à distance au sein de la population testée, avec un intervalle de confiance de 95 %.

13.4 Classification du risque

La classification du risque est également indiquée pour permettre l'interprétation du score RDR à l'aide de valeurs de seuil liées au résultat clinique obtenu auprès des populations testées.

Tableau 9 : Classification du risque par plage de RDR et état ganglionnaire

| État ganglionnaire | Plage RDR | Classification du risque |
|--|-----------|--------------------------|
| Sans envahissement ganglionnaire | 0-40 | Faible |
| | 41-60 | Modéré |
| | 61-100 | Élevé |
| Avec envahissement ganglionnaire (1 à 3 ganglions) | 0-15 | Faible |
| | 16-40 | Modéré |
| | 41-100 | Élevé |
| Avec envahissement ganglionnaire (≥ 4 ganglions) | 0-100 | Élevé |

13.5 Contrôle de qualité

Chaque lot de composants du Dosage Prosigna est testé sur la base de spécifications prédéterminées. Tous les éléments du kit sont tracés par lot et les composants critiques contenus dans chaque kit sont testés ensemble et commercialisés dans le cadre d'un lot de kit Prosigna.

Le kit de Dosage Prosigna contient une série de contrôles internes qui servent à évaluer la qualité de chaque série globalement et de chaque échantillon individuellement. Ces contrôles sont décrits ci-dessous.

Ensemble de contrôles du lot : Échantillon de référence d'ARN transcrit *in vitro*

Un échantillon de référence d'ARN synthétique est inclus comme contrôle dans le kit de Dosage Prosigna. L'échantillon de référence est composé de cibles d'ARN

transcrites *in vitro* à partir des 50 gènes algorithmiques et des 8 gènes domestiques. L'échantillon de référence est traité en double dans chaque série de Dosage Prosigna, avec un ensemble comprenant jusqu'à 10 échantillons d'ARN de tumeurs mammaires inconnus dans un tube à bande de 12 réactions. Le signal émis par l'échantillon de référence est analysé au regard de seuils prédéfinis pour qualifier la série.

Le signal émis par chacun des 50 gènes algorithmiques de l'échantillon d'ARN de tumeur mammaire est normalisé selon les gènes correspondants de l'échantillon de référence.

Ensemble de contrôles positifs : Cibles d'ARN transcrites *in vitro* et sondes de capture et rapporteuses correspondantes

Des cibles d'ARN synthétiques sont utilisées comme contrôles positifs (PC) pour le Dosage Prosigna. Les séquences cibles PC sont dérivées de la bibliothèque de séquences d'ADN ERCC (External RNA Control Consortium)⁶. Les cibles d'ARN sont transcrites *in vitro* à partir de plasmides d'ADN. Six cibles d'ARN sont incluses dans le kit de dosage dans une série de titrage multipliée par 4 (concentration finale comprise entre 128 et 0,125 fM dans la réaction d'hybridation) ainsi que les sondes de capture et rapporteuses correspondantes. Les PC sont ajoutés à chaque échantillon d'ARN de tumeur mammaire et échantillon de référence testé avec le Dosage Prosigna. Un échantillon sera disqualifié de toute autre analyse si les intensités du signal émis par les PC ne sont pas conformes aux seuils prédéfinis.

Ensemble de contrôles négatifs : sondes exogènes sans cibles

Les séquences de cibles de contrôles négatifs sont dérivées de la bibliothèque de séquences d'ADN ERCC⁶. Les sondes conçues pour détecter ces séquences cibles sont incluses dans le kit de dosage sans la séquence cible correspondante. Les contrôles négatifs (NC) sont ajoutés à chaque échantillon d'ARN de tumeur mammaire et échantillon de référence testé avec le Dosage Prosigna dans le cadre du contrôle de qualité. L'échantillon sera disqualifié de toute autre analyse si les intensités du signal émis par les NC ne sont pas conformes aux seuils prédéfinis.

Ensemble de contrôles de l'intégrité de l'ARN : Gènes domestiques

Les sondes de capture et rapporteuses conçues pour détecter 8 gènes domestiques et 50 gènes algorithmiques sont incluses dans le kit Prosigna. Les niveaux d'expression des 8 gènes domestiques sont analysés pour déterminer la qualité de l'ARN extrait de l'échantillon de tissu FFIP et sont intégrés au Dosage Prosigna. L'échantillon sera disqualifié de toute autre analyse si les niveaux d'expression des gènes domestiques tombent en-deçà des seuils prédéfinis.

Les gènes domestiques sont également utilisés pour normaliser toutes les différences éventuelles de quantité d'ARN intact dans échantillon avant la normalisation de l'échantillon de référence.

14 LIMITES DES PROCÉDURES

1. Le Dosage Prosigna a été optimisé pour identifier le sous-type intrinsèque d'une tumeur de cancer mammaire et le risque de récidive à distance des patientes à 10 ans comme score RDR et catégorie de risque, en utilisant l'ARN purifié extrait de tissus mammaires humains fixés au formol et inclus en paraffine. D'autres types d'échantillons ou fixateurs n'ont pas été testés et ne doivent pas être utilisés.
2. La performance du Dosage Prosigna a uniquement été validée à l'aide des procédures décrites dans cette notice. Toute modification de ces procédures pourrait altérer la performance du test.
3. Les caractéristiques de performance du Dosage Prosigna ont été établies pour les femmes post-ménopausées souffrant d'un cancer du sein précoce à récepteurs hormonaux positifs, traité par endocrinothérapie adjuvante pendant 5 ans. La performance du dosage avec d'autres schémas thérapeutiques ou auprès d'autres populations de patients n'a pas été établie.
4. Si l'ARN ajouté au dosage est de qualité ou de quantité insuffisante, il est alors possible que le Dosage Prosigna ne puisse pas donner un résultat valide qu'il se conclue par un échec.
5. L'interprétation des résultats du Dosage Prosigna (sous-type intrinsèque, score RDR, catégorie de risque) doit être évaluée au regard d'autres facteurs clinicopathologiques, des antécédents médicaux de la patiente et de tous autres résultats de test du laboratoire.
6. La performance du Dosage Prosigna a été établie avec de l'ARN conforme aux spécifications définies selon la procédure décrite précédemment. La performance avec de l'ARN isolé ne satisfaisant pas à ces spécifications n'a pas été établie.
7. Les substances interférentes connues avec le Dosage Prosigna comprennent l'ADN génomique et les tissus non tumoraux (p. ex., tissus normaux). Se reporter aux considérations générales relatives au dosage avant de commencer la procédure. La région du carcinome invasif viable doit être clairement identifiée par un anatomopathologiste avant d'entamer la procédure. En outre, chaque échantillon d'ARN doit être traité avec la DNase. Avant de traiter les échantillons de test d'une patiente, chaque nouveau lot de DNase doit être testé et qualifié conformément aux spécifications du kit d'isolation employé s'il ne s'agit pas du kit d'isolation d'ARN Roche FFPET.

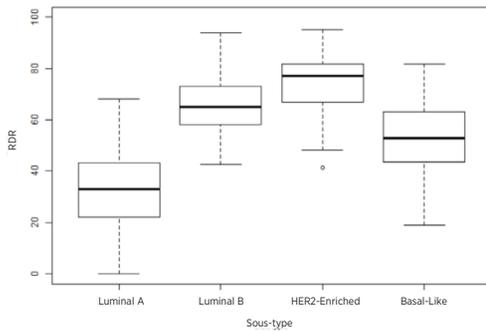
15 VALEURS ATTENDUES

Le Dosage Prosigna renvoie un score RDR (0-100), un sous-type intrinsèque (Luminal A, Luminal B, HER2 enrichi ou Basal-like) et une catégorie de risque (Faible, Modéré ou Élevé) pour chaque échantillon tumoral. Sur la base des deux études de validation cliniques décrites ci-dessous, les femmes post-ménopausées souffrant d'un cancer du sein précoce à récepteurs hormonaux positifs (HR+) traité avec de l'anastrozole ou du tamoxifène dans le cadre des essais ATAC et ABCSG-8, les illustrations ci-après indiquent les valeurs attendues pour la plage et la fréquence des scores RDR (figure 10), la relation continue entre le score RDR et la probabilité de récurrence à distance par état ganglionnaire (figure 11) et la répartition des scores RDR par sous-type intrinsèque (figure 9). Sur la base de ces études de validation cliniques, la survie sans récurrence à distance sur 10 ans par catégorie de risque est représentée dans la figure 12 (patientes sans envahissement ganglionnaire) et la figure 13 (patientes avec envahissement ganglionnaire de 1 à 3 ganglions).

15.1 Plage RDR par sous-type

La figure 9 représente le score RDR par sous-type intrinsèque sous forme de diagramme à surfaces.

Figure 9 : Score RDR par sous-type intrinsèque sous forme de diagramme à surfaces.



15.2 Fréquence du score RDR par état ganglionnaire

L'histogramme de la figure 10 a été généré à l'aide d'un modèle de Cox unique, qui inclut le score RDR et des variables catégorielles pour distinguer les trois groupes ganglionnaires impliqués.

Figure 10 : Histogramme des scores RDR et des groupes d'état ganglionnaire

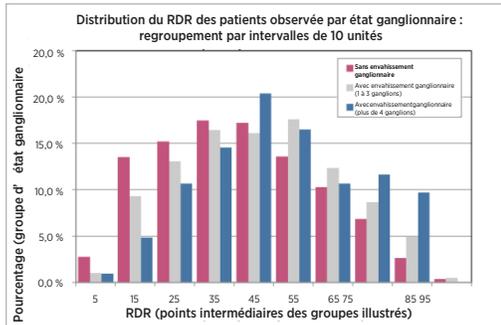
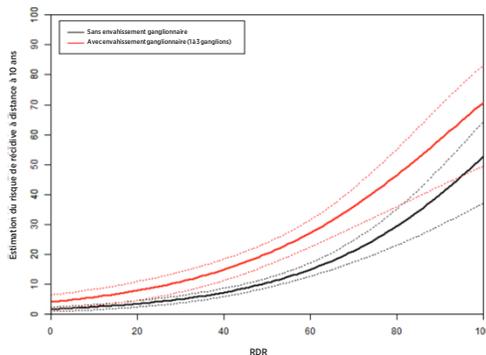


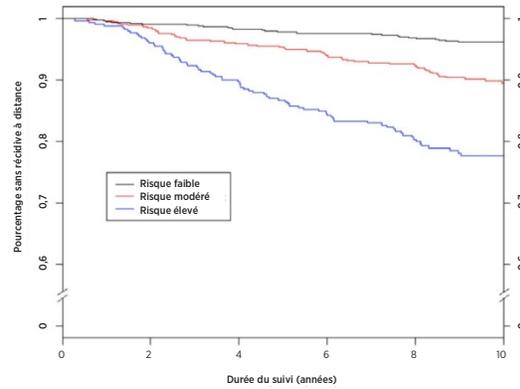
Figure 11 : Estimation du risque prévu à 10 ans au sein du groupe d'état ganglionnaire



15.3 Survie sans récurrence à distance par catégorie de risque

Les données suivantes proviennent de l'analyse combinée des essais TransATAC et ABCSG-8. Pour affecter des patientes à des groupes de risque, les scores RDR ont été comparés aux seuils de risque prédéfinis pour les patientes sans envahissement ganglionnaire ou avec envahissement ganglionnaire. Les figures 12 et 13 illustrent la survie sans récurrence à distance (DRFS) à 10 ans pour chaque groupe de catégorie de risque par état ganglionnaire.

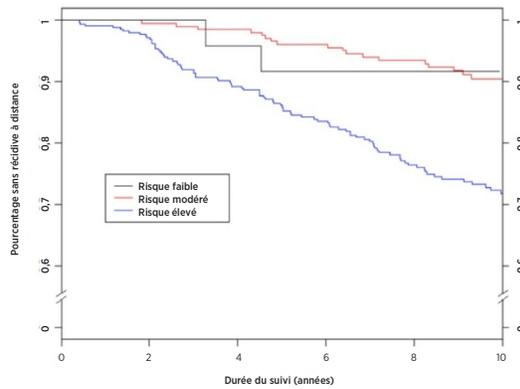
Figure 12 : DRFS par groupe de risque chez les patientes sans envahissement ganglionnaire



Résumé des données de la figure 12 : DRFS par groupe de risque chez les patientes sans envahissement ganglionnaire

| Groupe de risque | Nombre de patientes (%) | Nombre d'événements sur 10 ans | Pourcentage estimé sans récurrence à distance à 10 ans [IC de 95 %] |
|------------------|-------------------------|--------------------------------|---|
| Faible | 875 (49 %) | 31 | 96,2 % [94,7 % - 97,3 %] |
| Modéré | 551 (31 %) | 53 | 89,2 % [86,1 % - 91,7 %] |
| Élevé | 360 (20 %) | 73 | 77,7 % [72,8 % - 81,9 %] |
| Total | 1 786 (100 %) | 157 | |

Figure 13 : DRFS par groupe de risque chez les patientes avec envahissement ganglionnaire (1 à 3 ganglions)



Résumé des données de la figure 13 : DRFS par groupe de risque chez les patientes avec envahissement ganglionnaire (1 à 3 ganglions)

| Groupe de risque | Nombre de patientes (%) | Nombre d'événements sur 10 ans | Pourcentage estimé sans récurrence à distance à 10 ans [IC de 95 %] |
|------------------|-------------------------|--------------------------------|---|
| Faible | 24 (4 %) | 2 | 91,7 % [70,6 % - 97,8 %] |
| Modéré | 211 (36 %) | 18 | 90,4 % [85,2 % - 93,9 %] |
| Élevé | 355 (60 %) | 87 | 71,8 % [66,3 % - 76,6 %] |
| Total | 590 (100 %) | 107 | |

Tableau 10 : Taux de DRFS à 10 ans chez les patientes avec envahissement ganglionnaire comprenant au moins 4 ganglions

| Groupe de risque | Nombre de patientes | Nombre d'événements sur 10 ans | Pourcentage estimé sans récurrence à distance à 10 ans [IC de 95 %] |
|------------------|---------------------|--------------------------------|---|
| Élevé | 103 | 39 | 57,4 % [46,3 % - 67,0 %] |

16 CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCE

16.1 Précision et reproductibilité des analyses

En vue d'estimer la précision et la reproductibilité globales de Prosigna, deux études ont été réalisées et leurs résultats ont été combinés. La première étude a évalué la précision sur le système d'analyse nCounter, en commençant avec l'ARN des tumeurs mammaires extrait, tandis que la deuxième étude s'est intéressée à la reproductibilité à partir des tissus tumoraux mammaires FFIP en incluant des facteurs préanalytiques.

Précision ARN

16.1.1 Plan expérimental

Une étude comparative en aveugle et randomisée a été menée auprès de trois sites en vue d'évaluer la précision d'analyse du Dosage Prosigna sur le système d'analyse nCounter. Cinq échantillons d'ARN de tumeurs mammaires regroupés ont été obtenus à partir des échantillons FFIP archivés en vue d'être testés sur chaque site. Le panel d'échantillons représentait les profils d'expression génique types identifiés pendant les tests de routine et chaque groupe de classification de risque.

Chaque site a traité 18 séries valides (9 séries par chaque opérateur, chaque série consistant en 10 tests), après le traitement d'une série de familiarisation par chaque opérateur (tableau 11). Chaque échantillon a été testé en double au cours de chaque série, au niveau d'entrée d'ARN nominal de 250 ng pour le dosage. Chaque opérateur a traité une série un jour donné, conformément aux règles généralement acceptées pour les méthodes à long terme². La période d'étude totale, y compris la période de familiarisation, s'est étendue sur 4 semaines sur chaque site.

Tableau 11 : Présentation de l'étude d'évaluation de la précision ARN

| Variable de l'étude | Nombres |
|--|------------|
| Nbr d'échantillons d'ARN de tumeurs mammaires | 5 |
| Nbr de réplicats d'échantillons par série (même cartouche) | 2 |
| Nbr de séries/site | 18 |
| Nbr de séries/jour | 1 |
| Nbr d'opérateurs/site | 2 |
| Nbr de lots de réactifs/site | 3 |
| Nbr de sites | 3 |
| <i>Nbr d'échantillons total testés par site (sauf familiarisation) =</i> | <i>180</i> |
| <i>Nbr d'échantillons total =</i> | <i>540</i> |

16.1.2 Analyse des composants de variance

Le tableau 12 illustre le résultat de l'analyse des composants de variance pour chaque membre du panel. La variance estimée ci-dessous désigne le pourcentage de variance totale (entre parenthèses).

Tableau 12 : Composants de variance par membre du panel (échantillons d'ARN regroupés)

| Membre du panel par risque, sous-type | RDR moyen | Composant de variance | | | | | Variance totale | ET total |
|---------------------------------------|-----------|-----------------------|-------------|-------------|--------------|--------------|-----------------|----------|
| | | Lot | Site | Opérateur | Série | Intra-série | | |
| Luminal A faible | 31,4 | 0,010 (2 %) | 0,000 (0 %) | 0,000 (0 %) | 0,134 (30 %) | 0,296 (67 %) | 0,44 (100 %) | 0,66 |
| Luminal B modéré | 55 | 0,105 (18 %) | 0,000 (0 %) | 0,000 (0 %) | 0,046 (8 %) | 0,426 (74 %) | 0,576 (100 %) | 0,76 |
| Basal-like modéré | 55,4 | 0,059 (20 %) | 0,000 (0 %) | 0,000 (0 %) | 0,046 (15 %) | 0,194 (65 %) | 0,299 (100 %) | 0,55 |
| Luminal B élevé | 64,8 | 0,119 (21 %) | 0,014 (2 %) | 0,000 (0 %) | 0,064 (11 %) | 0,380 (66 %) | 0,576 (100 %) | 0,76 |
| HER2 enrichi élevé | 76,2 | 0,165 (37 %) | 0,000 (0 %) | 0,000 (0 %) | 0,000 (0 %) | 0,277 (63 %) | 0,442 (100 %) | 0,66 |

Pour les cinq membres du panel, l'ET total était inférieur à 1 unité RDR sur une échelle allant de 0 à 100. Pour tous les membres du panel, la variance était en majeure partie due à la variance intra-série (répétabilité). Quasiment aucune variance d'un site à un autre ou d'un opérateur à un autre n'a été observée. Un test de rapport de vraisemblance évaluant l'importance du site par membre du panel a démontré que les différences entre sites étaient statistiquement insignifiantes ($p > 0,05$). Pour chaque lot, les scores RDR moyens sont inférieurs à une unité RDR distincte pour chaque membre du panel contribuant en moyenne à environ 20 % de la variance globale.

16.1.3 Concordance des classifications d'appels de sous-types et de risques

Pour tous les membres du panel, une concordance à 100 % a été observée entre le sous-type résultant et le sous-type intrinsèque du membre du panel. Pour tous les échantillons, une concordance à 100 % a été observée entre le groupe de risque mesuré et le groupe de risque attendu.

Reproductibilité des tissus

16.1.4 Plan expérimental

Une étude comparative en aveugle et randomisée a été menée sur trois sites en vue d'évaluer sur le système d'analyse nCounter, à l'aide du Dosage Prosigna, des réplicats d'échantillons de tissus tumoraux mammaires prélevés sur un même bloc FFIP. Un ensemble de 43 échantillons de tumeurs mammaires FFIP récemment prélevés sur des patientes souffrant d'un cancer du sein à récepteurs hormonaux positifs, avec carcinome canalaire et/ou lobulaire invasif confirmé, a été testé dans le cadre de l'étude. Tous les échantillons de tissus ont été expédiés au site de test approprié en vue de leur traitement. Les 43 échantillons ont été examinés de manière indépendante par trois anatomopathologistes distincts. Chaque échantillon de tissu examiné a fait l'objet d'une série de tests consistant en une macrodissection des tissus, l'extraction d'ARN et la réalisation d'un test avec le Dosage Prosigna, effectué par un opérateur unique sur chaque site à l'aide de la procédure de dosage définie. L'ARN isolé à partir de chacun des échantillons de tissu a été testé deux fois dans le cadre de séries de dosage distinctes. Trois lots du kit d'isolation d'ARN (un par site) et un lot unique de réactions d'un kit de dosage ont été utilisés lors de la réalisation de cette étude. Une lame unique a été incluse pour l'extraction d'ARN quand la superficie de la tumeur mesurait $\geq 100 \text{ mm}^2$, et 3 lames ont été incluses quand la superficie de la tumeur mesurait moins de $< 100 \text{ mm}^2$, une superficie de tumeur minimale de 4 mm^2 étant requise.

16.1.5 Résumé des tests

Le taux d'appel pour les quarante-trois (43) échantillons de tissus évalués sur chacun des trois sites est décrit dans le tableau 13.

Tableau 13 : Taux d'appel sur chaque site

| Site | Pourcentage ayant donné un résultat | Réussi/Total |
|------|-------------------------------------|--------------|
| 1 | 95 % | 41/43 |
| 2 | 93 % | 40/43 |
| 3 | 100 % | 43/43 |

Quarante (40) échantillons ont des résultats sur tous les sites (l'isolation de l'ARN d'un échantillon sur un site a requis une répétition), 1 échantillon a donné des résultats sur 2 sites et 2 échantillons ont donné des résultats sur un seul site. Cent pour cent (100 %) des échantillons ont passé l'examen des tissus avec succès et les spécifications d'isolation d'ARN ont donné des résultats positifs avec le Dosage Prosigna. La superficie tumorale mesurée dans le cas de 4 échecs d'isolation d'ARN sur 5 était $\leq 15 \text{ mm}^2$, équivalant à moins de 50 mm^2 des tissus totaux par zone incluse dans le test.

Les 43 échantillons comprenaient des tissus prélevés sur des patientes avec et sans envahissement ganglionnaire. Les résultats obtenus avec les 43 échantillons représentent une large plage (94 unités) de scores RDR, les 4 sous-types intrinsèques et toutes les catégories de risque lors de l'application des seuils sans envahissement ganglionnaire ou avec envahissement ganglionnaire à tous les échantillons. Les deux échantillons renvoyant des résultats sur un seul site ont été exclus de toutes les analyses statistiques suivantes, car aucune donnée permettant d'effectuer des comparaisons entre plusieurs sites n'était disponible.

16.1.6 Analyse des composants de variance

Aucune différence significative du point de vue statistique ($\alpha = 0,05$) n'a été observée entre les catégories de risque avec un test de Kruskal-Wallis non paramétrique. Par conséquent, le modèle des composants de variance a été ajusté à toutes les catégories de risque simultanément.

Le tableau 14 illustre les résultats de l'analyse des composants de variance pour les 41 échantillons de tissus.

Tableau 14 : Composants de variance (étude de reproductibilité des tissus)

| Composants de variance | | | | ET total |
|------------------------|------------|----------|-------|----------|
| Site | Intra-bloc | Résiduel | Total | |
| 0,10 | 7,72 | 0,51 | 8,34 | 2,89 |

Le composant Site mesure la variation spécifique au site systématique. Le composant Intra-bloc mesure la variation aléatoire qui diffère en fonction de l'examen/le traitement des échantillons de tissus ou la variation intra-bloc FFIP. Enfin, la variation résiduelle mesure la variabilité combinée d'une série à l'autre et la variabilité intra-série dans le Dosage Prosigna. Le composant Site est très petit par rapport à la variabilité aléatoire au sein du bloc, indiquant que les différences en moyenne entre les sites étaient négligeables ($< 1 \%$ de la variance totale). La variation résiduelle était cohérente avec la variabilité équivalente mesurée dans le cadre de l'étude d'évaluation de la précision ARN, qui comprenait moins d'échantillons mais plus de mesures de réplicats (variance de 0,51 par rapport à la variance de 0,39 du lot de réactifs Prosigna d'un site unique moyen pour l'étude d'évaluation de la précision ARN).

Le tableau 15 résume la variabilité totale en utilisant la somme de la variabilité de traitement des tissus (composants Site et Intra-bloc au tableau 14 de cette étude) ainsi que la variabilité de traitement de l'ARN totale relevée dans l'étude d'évaluation de la précision ARN (moyenne entre les cinq membres du panel testés dans le tableau 12). Les facteurs préanalytiques associés aux traitements des tissus sont la principale source de variation du test (94 % de la variance totale). L'ET total, incluant toutes les sources de variation, est égal à 2,9, ce qui indique que le Dosage Prosigna est une mesure fiable de l'écart entre deux valeurs RDR de 6,75, avec un intervalle de confiance de 95%.

Tableau 15 : Variabilité totale (traitement des tissus et de l'ARN)

| Variabilité de traitement des tissus | Variabilité de traitement de l'ARN | Variabilité totale | ET total |
|--------------------------------------|------------------------------------|--------------------|----------|
| 7,82 | 0,47 | 8,29 | 2,9 |

16.1.7 Concordance des classifications de sous-types et de catégories de risque

La concordance site à site par sous-type et catégorie de risque des patientes (risque faible/modéré/élevé) est indiquée au tableau 16, où les seuils de risque respectifs des classifications sans et avec envahissement ganglionnaire ont été appliqués à tous les échantillons. Les intervalles de confiance à 95 % de type exact sont indiqués entre crochets, tandis que le nombre d'échantillons ayant donné des résultats sur les deux sites est indiqué entre parenthèses. La concordance moyenne est indiquée dans la dernière colonne. Pour chaque comparaison, la concordance a été calculée en deux étapes. Dans un premier temps, pour chaque échantillon de tissu, la proportion des quatre paires de résultats possibles (2 sur le site 1 * 2 sur le site 2) qui concordait a été calculée. Dans un deuxième temps, la moyenne de ces proportions a été calculée entre tous les échantillons de tissus qui ont donné des résultats sur les deux sites dans la comparaison donnée.

Tableau 16 : Résumé de la concordance du sous-type et de la catégorie de risque par état ganglionnaire

| Type de comparaison | Concordance par paires | | | Concordance moyenne |
|--|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|---------------------|
| | Site 1 vs. Site 2 (n = 40) | Site 1 vs. Site 3 (n = 41) | Site 2 vs. Site 3 (n = 40) | |
| Sous-type | 96,3 % [86,4 % - 99,5 %] | 98,8 % [91,0 % - 100 %] | 95 % [83,1 % - 99,3 %] | 97 % |
| Catégorie de risque Sans envahissement ganglionnaire | 87,5 % [73,2 % - 95,8 %] | 92,7 % [80,1 % - 98,4 %] | 90 % [76,4 % - 97,2 %] | 90 % |
| Catégorie de risque Avec envahissement ganglionnaire | 88,8 % [75,9 % - 96,0 %] | 92,7 % [80,1 % - 98,4 %] | 91,3 % [79,2 % - 97,4 %] | 91 % |

Pour chaque comparaison (sous-type et catégories de risque avec et sans envahissement ganglionnaire), la concordance moyenne entre les sites était au moins de 90 %. Aucun échantillon n'est passé de la catégorie de risque Faible à Élevé (ou vice versa) d'un site à un autre ou au sein des mêmes sites. Deux échantillons seulement (sur 41) n'ont pas renvoyé des sous-types identiques entre les 6 répliqués :

1. Un échantillon a donné des résultats Luminal A en double sur un site et des résultats Luminal B en double sur chacun des deux autres sites.
2. Un échantillon a donné des résultats Luminal A en double sur un site, des résultats HER2 enrichi en double sur un autre site, et un résultat Luminal A et un résultat HER2 enrichi sur le troisième site.

16.2 Sensibilité/Incorporation d'ARN

Description de l'étude de l'incorporation d'ARN

L'étude a testé 13 échantillons d'ARN de tumeurs mammaires à trois niveaux d'incorporation d'ARN conformément aux spécifications du dosage (500, 250 et 125 ng) et deux niveaux supplémentaires d'incorporation d'ARN en dehors des spécifications du dosage (625, 62,5 ng). Chaque échantillon a été testé avec chaque lot du kit (2 lots au total) en une seule série de tests, qui comprenait des mesures en double à chaque niveau conforme aux spécifications et une mesure unique pour chaque niveau non conforme aux spécifications. Des mesures à blanc (c.-à-d. sans cible) en double ont été incluses dans chaque série de tests. Un échantillon unique a été testé avec un seul lot.

Résultats de l'étude d'incorporation d'ARN

Tous les échantillons mesurés à blanc (n = 46) ont renvoyé un signal nettement inférieur à la valeur de seuil et se sont soldés par un échec du test (taux d'appel de 0 %). Toutes les mesures de l'ARN des tumeurs conformes aux spécifications du dosage (n = 138) ont donné un résultat de test positif (taux d'appel de 100 %). Cent pour cent (100 %) des échantillons avec une incorporation supérieure aux spécifications (625 ng) ont donné un résultat de test positif. Quatre-vingt-trois pour cent (83 %) des échantillons (10/12) testés avec une incorporation inférieure aux spécifications (62,5 ng) ont donné un résultat de test dans le lot 1, et 100 % dans le lot 2.

Le score RDR moyen des 13 échantillons couvrait une large plage (20 à 82). La classification des groupes de risque (faible/modéré/élevé) concordait à 100 % entre tous les niveaux d'incorporation d'ARN pour les 13 échantillons testés. Le tableau 17 résume la variation du score RDR en fonction de l'incorporation d'ARN. L'écart moyen du score RDR entre les niveaux d'incorporation d'ARN, l'ET des différences et un intervalle de confiance de 90 % ont été utilisés pour déterminer si les scores RDR produits par différents niveaux d'incorporation d'ARN étaient équivalents à ceux produits avec le niveau cible de 250 ng. Pour satisfaire le critère d'acceptation, l'intervalle de confiance a dû être complètement contenu (RDR de -3,3). Aux deux niveaux situés aux extrémités de la plage des spécifications du dosage (125 and 500 ng d'ARN), les scores RDR étaient équivalents à ceux obtenus avec la concentration d'incorporation cible de 250 ng avec chacun des deux lots de kit testés. Pour chaque niveau non conforme aux spécifications du dosage, les scores RDR étaient équivalents avec un des lots, mais pas avec l'autre.

Tableau 17 : Résumé des écarts de score RDR. Le nombre est égal au nombre d'échantillons inclus dans l'analyse.

| Lot de kit | Masse (ng) | Nombre | Écart moyen des scores RDR | ET de différence | Intervalle de confiance inférieur | Intervalle de confiance supérieur |
|------------|------------|--------|----------------------------|------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| 20535 | 62,5 - 250 | 10 | 1,90 | 2,62 | 0,54 | 3,26 |
| | 125 - 250 | 12 | 0,75 | 1,23 | 0,16 | 1,34 |
| | 500 - 250 | 12 | 0,04 | 0,78 | -0,33 | 0,41 |
| | 625 - 250 | 12 | -0,13 | 0,86 | -0,53 | 0,28 |
| 20536 | 62,5 - 250 | 11 | -0,36 | 3,96 | -2,33 | 1,60 |
| | 125 - 250 | 11 | -0,50 | 3,07 | -2,02 | 1,02 |
| | 500 - 250 | 11 | -0,82 | 3,25 | -2,43 | 0,79 |
| | 625 - 250 | 11 | -1,09 | 4,24 | -3,19 | 1,01 |

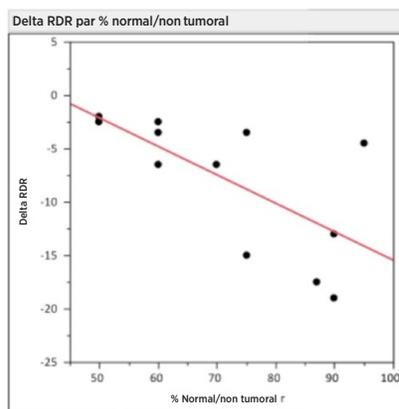
16.3 Tests d'interférence

Tissus normaux/non-tumoraux adjacents

Des tissus mammaires normaux/non-tumoraux adjacents sont généralement présents dans les blocs tumoraux mammaires FFIP et peuvent être identifiés lors d'un examen pathologique comme une zone distincte de celle du carcinome invasif du sein. La procédure de Dosage Prosigna décrite précédemment stipule l'élimination des tissus normaux adjacents par macrodissection. Pour évaluer le risque de contamination des résultats du test par les tissus normaux, 13 blocs tumoraux mammaires FFIP au total, contenant un carcinome canalaire infiltré confirmé par analyse pathologique et environ 50 à 95 % de tissus normaux/non-tumoraux adjacents, ont été testés avec et sans macrodissection des tissus adjacents et l'écart entre les scores RDR (delta RDR) a été déterminé.

En moyenne, le score RDR de l'échantillon tumoral macrodissecté était supérieur de presque 8 unités RDR au score observé lorsque les tissus normaux/non-tumoraux n'avaient pas été retirés. La figure 14 montre qu'à mesure que la quantité de tissus normaux augmente (jusqu'à 95 % des tissus non éliminés par macrodissection), le risque que le score RDR rapporté sous-estime ou biaise négativement (jusqu'à -19 unités RDR) le risque de récurrence de la patiente s'accroît.

Figure 14 : Impact des tissus normaux/non-tumoraux sur la valeur Delta RDR



Interférences des tissus nécrosés, hémorragiques et CCIS (carcinome canalaire in situ)

Pour évaluer le risque de contamination des résultats du test par des tissus nécrosés/hémorragiques/CCIS, 11 blocs tumoraux mammaires FFIP au total (3 CCIS, 5 nécrosés, 3 hémorragiques), contenant un carcinome invasif du sein confirmé par analyse pathologique et environ 10 à 30 % de l'interférent, ont été testés avec et sans macrodissection de l'interférent et l'écart entre les scores RDR (delta RDR) a été déterminé. Aux niveaux testés, les tissus sanguins/hémorragiques, CCIS et nécrosés inclus dans la procédure ont eu un impact négligeable sur le score RDR (rapports < 6 unités RDR). On a observé une concordance à 100 % de l'affectation des catégories de risque entre les onze échantillons de tissus nécrosés, hémorragiques et CCIS avec et sans macrodissection.

ADN génomique humain

La procédure de Dosage Prosigna inclut l'élimination de l'ADN génomique humain (ADNg) par digestion à la DNase. Pour évaluer le risque de contamination des résultats du test par l'ADNg, dix (10) blocs tumoraux mammaires FFIP contenant un carcinome canalaire infiltré confirmé par analyse pathologique ont été testés avec et sans élimination de l'ADN génomique humain, en omettant l'étape DNase de la procédure. Dans les échantillons testés, en moyenne, le score RDR a été inférieur de 4 à 5 unités dans les groupes de risque Faible et Modéré quand l'ADNg a été éliminé par DNase I (voir le tableau 18). Quand les échantillons qui n'ont pas été traités par DNase I ont été soumis à ce traitement ultérieurement (post-traitement), les scores RDR ont été conformes aux valeurs RDR observées initialement avec le traitement DNase inscrit au protocole. Il y a un risque que le score RDR rapporté soit une surestimation ou une estimation positivement biaisée (jusqu'à 7 unités RDR) du risque de récurrence de la patiente en présence d'ADNg. En outre, le signal calculé pour les échantillons sans traitement DNase I a été nettement inférieur ($p < 0,05$) au signal des échantillons traités par DNase I, en raison des interférences dans le relevé des valeurs d'absorbance utilisées pour quantifier la quantité d'ARN avant de procéder aux tests avec le Dosage Prosigna.

Tableau 18 : Impact du traitement par DNase sur le score RDR des échantillons tumoraux

| RDR Catégorie | Échantillons FFIP testés | Écart RDR avec et sans DNase I | | | Écart ROR avec DNase I et avec DNase I (post-traitement) | | |
|---------------|--------------------------|--------------------------------|------|------|--|------|-----|
| | | Moyenne | Min | Max | Moyenne | Min | Max |
| Faible | 3 | -4,0 | -6,0 | -1,0 | 0,7 | -1,0 | 3,0 |
| Modéré | 2 | -4,5 | -7,0 | -2,0 | 1,0 | 0,0 | 2,0 |
| Élevé | 5 | 0,4 | -1,0 | 2,0 | 0,4 | -1,0 | 1,0 |

16.4 Performances cliniques

Deux études de validation cliniques ont été menées afin de valider le dosage pour l'identification de la signature d'expression génique pronostique du cancer du sein Prosigna. Le principal objectif de ces deux études était de valider les observations publiées indiquant que le score de risque de récurrence (RDR) fournit des informations pronostiques supplémentaires sur la survie sans récurrence à distance à 10 ans au-delà des variables cliniques standard. Les deux études visent également à valider les observations antérieures indiquant que les patientes présentant un cancer de type Luminal A et Luminal B ont un score de survie sans récurrence à distance à 10 ans largement différent du point de vue statistique. Les critères d'entrée et les résultats de ces deux études étant similaires, les deux bases de données ont été combinées et analysées avec un plan d'analyse défini de façon prospective qui avait les mêmes objectifs que chacune des études.

Analyse combinée : Création des courbes de risque sur la base des résultats combinés du Dosage Prosigna à partir des essais TransATAC et ABCSG-8.

Les caractéristiques de traitement et cliniques de l'analyse combinée sont résumées ci-dessous. Pour plus d'informations sur l'analyse et le plan expérimental de chaque étude, voir les sections suivantes des études 1 et 2, respectivement.

Analyse

Tableau 19 : Résumé des caractéristiques de traitement et cliniques de l'analyse combinée des études 1 et 2

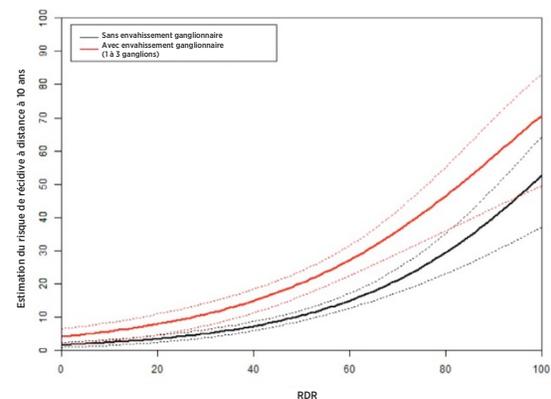
| Caractéristiques | Valeur | Sans envahissement ganglionnaire (n = 1 786) | | Avec envahissement ganglionnaire: 1 à 3 ganglions (n = 590) | | ≥ 4 ganglions (n = 103) | |
|----------------------------------|-----------------------|--|--------------------|---|------------------|-------------------------|-----------------|
| | | Trans ATAC (n = 739) | ABCSG8 (n = 1 047) | Trans ATAC (n = 208) | ABCSG8 (n = 382) | Trans ATAC (n = 54) | ABCSG8 (n = 49) |
| Traitement | Un peu d'anastrozole | 377 (51,0 %) | 528 (50,4 %) | 102 (49,0 %) | 184 (48,2 %) | 31 (57,4 %) | 25 (51,0 %) |
| | Tamoxifène uniquement | 362 (49,0 %) | 519 (49,6 %) | 106 (51,0 %) | 198 (51,8 %) | 23 (42,6 %) | 24 (49,0 %) |
| Stade | G1 | 169 (22,9 %) | 210 (20,1 %) | 39 (18,8 %) | 54 (14,1 %) | 3 (5,6 %) | 7 (14,3 %) |
| | G2/GX | 438 (59,3 %) | 837 (79,9 %) | 122 (58,7 %) | 328 (85,9 %) | 37 (68,5 %) | 42 (85,7 %) |
| | G3 | 132 (17,9 %) | 0 (0 %) | 47 (22,6 %) | 0 (0 %) | 14 (25,9 %) | 0 (0 %) |
| Taille de la tumeur | ≤ 1 cm | 122 (16,5 %) | 219 (20,9 %) | 13 (6,2 %) | 37 (9,7 %) | 3 (5,6 %) | 2 (4,1 %) |
| | 1-2 cm | 420 (56,8 %) | 568 (54,3 %) | 83 (39,9 %) | 193 (50,5 %) | 15 (27,8 %) | 18 (36,7 %) |
| | 2-3 cm | 157 (21,2 %) | 213 (20,3 %) | 77 (37,0 %) | 122 (31,9 %) | 18 (33,3 %) | 23 (46,9 %) |
| | > 3 cm | 40 (5,4 %) | 47 (4,5 %) | 35 (16,8 %) | 30 (7,9 %) | 18 (33,3 %) | 6 (12,2 %) |
| État HER2 | Négatif | 649 (87,8 %) | 984 (94,0 %) | 186 (89,4 %) | 367 (96,1 %) | 47 (87,0 %) | 46 (93,9 %) |
| | Positif | 90 (12,2 %) | 63 (6,0 %) | 22 (10,6 %) | 15 (3,9 %) | 7 (13,0 %) | 3 (6,1 %) |
| Récidives | À distance | 79 (10,7 %) | 91 (8,7 %) | 50 (24,0 %) | 64 (16,8 %) | 31 (57,4 %) | 10 (20,4 %) |
| | Toutes | 117 (15,8 %) | 121 (11,6 %) | 59 (28,4 %) | 73 (19,1 %) | 34 (63,0 %) | 10 (20,4 %) |
| Sous-type intrinsèque NanoString | Luminal A | 529 (71,6 %) | 725 (69,2 %) | 127 (61,1 %) | 248 (64,9 %) | 31 (57,4 %) | 31 (63,3 %) |
| | Luminal B | 176 (23,8 %) | 284 (27,1 %) | 68 (32,7 %) | 118 (30,9 %) | 20 (37 %) | 16 (32,7 %) |
| | Basal-Like | 7 (0,9 %) | 6 (0,6 %) | 2 (1,0 %) | 2 (0,5 %) | 0 (0 %) | 0 (0 %) |
| | HER2 enrichi | 27 (3,7 %) | 32 (3,1 %) | 11 (5,3 %) | 14 (3,7 %) | 3 (5,6 %) | 2 (4,1 %) |

Les deux études comprennent un groupe de traitement consistant en l'administration de tamoxifène pendant 5 ans. Dans l'étude TransATAC, l'autre groupe d'étude a évalué l'administration d'anastrozole pendant 5 ans, tandis que dans l'étude ABCSG-8, le deuxième groupe d'étude consistait en l'administration de tamoxifène pendant 2 ans, suivie de l'administration d'anastrozole pendant 3 ans. Quand la RD a été modélisée en fonction de toutes les variables de traitement et cliniques, le traitement n'a pas contribué significativement ($p = 0,66$) en tant que prédicteur de la RD. Les principales autres différences entre ces essais résidaient dans le fait que l'essai TransATAC a inclus des patientes souffrant de tumeurs au stade 3 et que le taux de récurrence global enregistré dans le cadre de l'étude TransATAC a été supérieur à celui relevé dans l'étude ABCSG-8.

Résultats

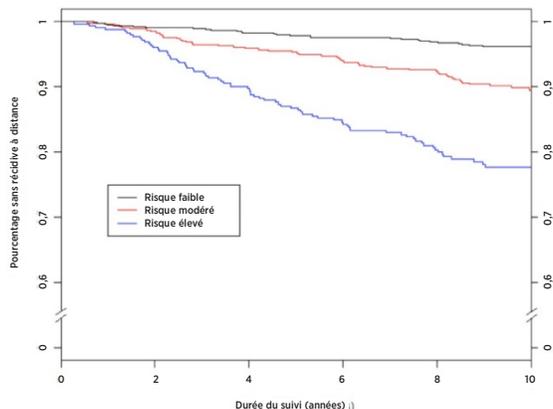
La figure 15 illustre le risque de RD à 10 ans en fonction du score RDR avec des intervalles de confiance de 95 %, sur la base de modèles de risques proportionnels de Cox distincts pour chacun des groupes de patientes sans envahissement ganglionnaire et avec envahissement ganglionnaire (1 à 3 ganglions positifs).

Figure 15 : Estimation du risque RD à dix ans par état ganglionnaire avec des intervalles de confiance de 95 %



La figure 16 illustre les courbes de Kaplan-Meier et d'incidence par groupe de risque chez les patientes sans envahissement ganglionnaire, tandis que la figure 17 illustre les mêmes tracés chez les patientes avec envahissement ganglionnaire (1 à 3 ganglions). Dans chaque figure, les détails relatifs à la taille des échantillons, le nombre d'événements et le pourcentage estimé de patientes ne présentant pas de récurrence à distance à 10 ans sont décrits par groupe de risque. Parmi les patientes avec envahissement ganglionnaire, très peu figurant dans les groupes de risque faible prédéfinis ont entraîné un très large intervalle de confiance sur la courbe de Kaplan-Meier, et de ce fait une estimation importante de la DRFS à 10 ans.

Figure 16A : DRFS par groupe de risque chez les patientes sans envahissement ganglionnaire



Résumé des données de la figure 16A : DRFS par groupe de risque chez les patientes sans envahissement ganglionnaire

| Groupe de risque | Nombre de patientes (%) | Nombre d'événements sur 10 ans | Pourcentage estimé sans récurrence à distance à 10 ans [IC de 95 %] |
|------------------|-------------------------|--------------------------------|---|
| Faible | 875 (49 %) | 31 | 96,2 % [94,7 % - 97,3 %] |
| Modéré | 551 (31 %) | 53 | 89,2 % [86,1 % - 91,7 %] |
| Élevé | 360 (20 %) | 73 | 77,7 % [72,8 % - 81,9 %] |
| Total | 1 786 (100 %) | 157 | |

Figure 16B : Incidence par groupe de risque chez les patientes sans envahissement ganglionnaire avec intervalles à cinq ans

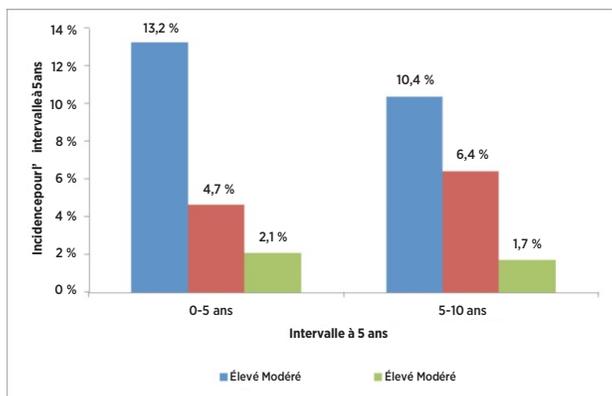
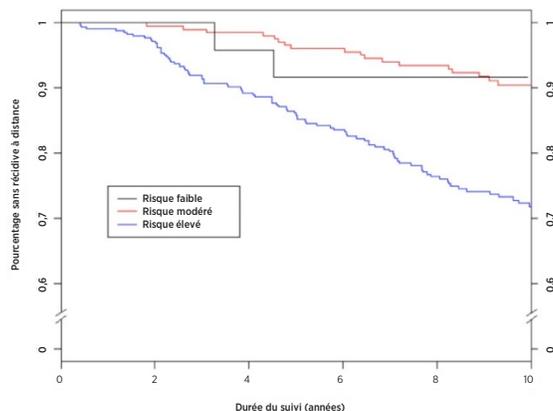


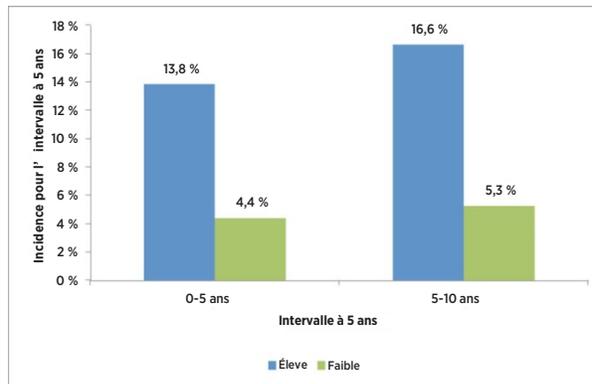
Figure 17A : DRFS par groupe de risque chez les patientes avec envahissement ganglionnaire comprenant au moins 1 à 3 ganglions



Résumé des données de la figure 17A : DRFS par groupe de risque chez les patientes avec envahissement ganglionnaire comprenant au moins 1 à 3 ganglions

| Groupe de risque | Nombre de patientes (%) | Nombre d'événements sur 10 ans | Pourcentage estimé sans récurrence à distance à 10 ans [IC de 95 %] |
|------------------|-------------------------|--------------------------------|---|
| Faible | 24 (4 %) | 2 | 91,7 % [70,6 % - 97,8 %] |
| Modéré | 211 (36 %) | 18 | 90,4 % [85,2 % - 93,9 %] |
| Élevé | 355 (60 %) | 87 | 71,8 % [66,3 % - 76,6 %] |
| Total | 590 (100 %) | 107 | |

Figure 17B : Incidence par groupe de risque chez les patientes avec envahissement ganglionnaire (1 à 3 ganglions) avec intervalles à cinq ans



Dans la figure 17B, les seules 24 patientes présentant 2 événements dans le groupe avec envahissement ganglionnaire à faible risque ont été associées aux patientes à risque modéré pour l'analyse de récurrence tardive.

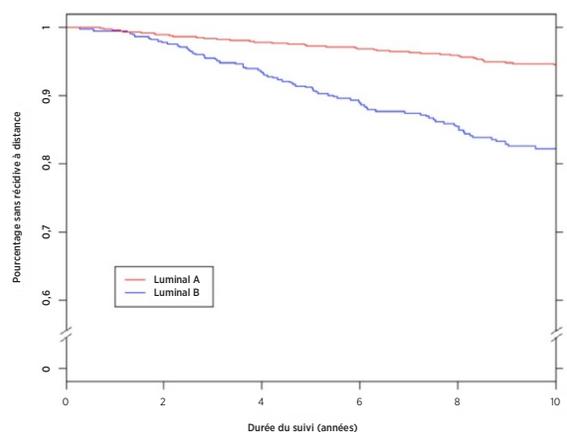
Les 103 patientes dans la base de données combinée affichant 4 ganglions au moins sont classés comme présentant un risque élevé. Le tableau 20 indique le taux de DRFS à 10 ans de ces patientes.

Tableau 20 : Taux de DRFS à 10 ans chez les patientes avec envahissement ganglionnaire comprenant au moins 4 ganglions

| Groupe de risque | Nombre de patientes | Nombre d'événements sur 10 ans | Pourcentage estimé sans récurrence à distance à 10 ans [IC de 95 %] |
|------------------|---------------------|--------------------------------|---|
| Élevé | 103 | 39 | 57,4 % [46,3 % - 67,0 %] |

La majorité des sujets ayant participé aux études combinées (96 %) présentaient un cancer de type Luminal A ou Luminal B. La figure 18 illustre une comparaison de la DRFS par sous-type Luminal pour les patientes sans envahissement ganglionnaire.

Figure 18 : Courbes de Kaplan-Meier illustrant le taux de DRFS par sous-type intrinsèque chez les patientes sans envahissement ganglionnaire

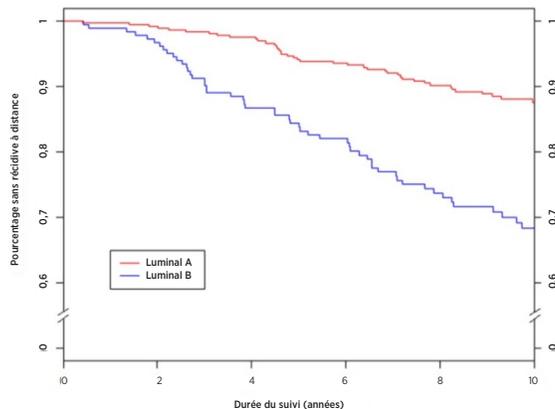


Résumé des données de la figure 18 : Courbes de Kaplan-Meier illustrant le taux de DRFS par sous-type intrinsèque chez les patientes sans envahissement ganglionnaire

| Groupe de risque | Nombre de patientes | Nombre d'événements sur 10 ans | Pourcentage estimé sans récidive à distance à 10 ans [IC de 95 %] |
|------------------|---------------------|--------------------------------|---|
| Luminal A | 1 254 | 62 | 94,6 [93,1 - 95,8] |
| Luminal B | 460 | 75 | 81,9 [77,7 - 85,3] |
| Total | 1 714 | 137 | |

La figure 19 illustre la même comparaison pour les avec envahissement ganglionnaire (1 à 3 ganglions). Dans les deux groupes, on a observé des différences significatives entre la DRFS des patientes souffrant d'un cancer de type Luminal A et Luminal B.

Figure 19 : Courbes de Kaplan-Meier illustrant le taux de DRFS par sous-type intrinsèque chez les patientes avec envahissement ganglionnaire (1 à 3 ganglions)



Résumé des données de la figure 19 : Courbes de Kaplan-Meier illustrant le taux de DRFS par sous-type intrinsèque chez les patientes avec envahissement ganglionnaire (1 à 3 ganglions)

| Groupe de risque | Nombre de patientes | Nombre d'événements sur 10 ans | Pourcentage estimé sans récidive à distance à 10 ans [IC de 95 %] |
|------------------|---------------------|--------------------------------|---|
| Luminal A | 375 | 41 | 87,6 [83,5 - 90,8] |
| Luminal B | 186 | 52 | 68,3 [60,4 - 75,0] |
| Total | 561 | 93 | |

Dans la base de données combinée, seules 98 patientes de sous-type Luminal présentaient un envahissement ganglionnaire avec au moins 4 ganglions. Le tableau 21 illustre le taux de DRFS à 10 ans des patientes affichant également un plus grand risque en présence d'un cancer de sous-type Luminal B.

Tableau 21 : Taux de DRFS à 10 ans chez les patientes avec envahissement ganglionnaire comprenant au moins 4 ganglions par sous-type Luminal

| Groupe de risque | Nombre de patientes | Nombre d'événements sur 10 ans | Pourcentage estimé sans récidive à distance à 10 ans [IC de 95 %] |
|------------------|---------------------|--------------------------------|---|
| Luminal A | 62 | 17 | 68,3 [53,6 - 79,3] |
| Luminal B | 36 | 20 | 38,0 [21,4 - 54,5] |
| Total | 98 | 37 | |

Analyse de récidive tardive

Dans les données d'analyse combinées décrites précédemment, les taux d'événement dans chaque groupe de risque ne sont pas constants sur l'intervalle à 10 ans comme le montrent les figures 16B et 17B. Pour mieux comprendre la RD dans la période de récidive tardive, une analyse rétrospective post-hoc des données combinées décrites précédemment a été effectuée pour le sous-ensemble de patientes sans récidive à distance dans les cinq ans (2 163 patientes au total[®]). Parmi ces patientes, 1 605 ne présentaient pas d'envahissement ganglionnaire et 488 présentaient un envahissement ganglionnaire (1 à 3 ganglions). Pour chaque groupe d'état ganglionnaire, les valeurs situées sous l'axe x à 5 ans dans les figures 20 et 21 montrent le nombre de patientes à risque par groupe de risque à cinq ans, c'est-à-dire les patientes éligibles à l'analyse de récidive tardive.

Le tableau 22 fournit un résumé du traitement et des caractéristiques cliniques pour les patientes sans et avec envahissement ganglionnaire (1 à 3 ganglions) dans l'analyse de récidive tardive.

Tableau 22 : Résumé du traitement et des caractéristiques cliniques pour l'analyse de récidive tardive

| Caractéristiques | Valeur | Sans envahissement ganglionnaire (n = 1 605) | | Avec envahissement ganglionnaire (1 à 3 ganglions) (n = 488) | |
|----------------------------------|-----------------------|--|---------------------|--|---------------------|
| | | ABCSG8 (n = 944) | TransATAC (n = 661) | ABCSG8 (n = 311) | TransATAC (n = 177) |
| Traitement | Un peu d'anastrozole | 480 | 346 | 153 | 89 |
| | Tamoxifène uniquement | 464 | 315 | 158 | 88 |
| Stade | Puits | 192 | 158 | 46 | 36 |
| | Modéré | 752 | 394 | 265 | 105 |
| | Médiocre | 0 | 109 | 0 | 36 |
| Taille de la tumeur | ≤ 1 cm | 204 | 116 | 35 | 11 |
| | 1-2 cm | 526 | 376 | 165 | 74 |
| | 2-3 cm | 183 | 139 | 90 | 64 |
| | > 3 cm | 31 | 30 | 21 | 28 |
| État HER2 | Négatif | 888 | 590 | 300 | 157 |
| | Positif | 56 | 71 | 11 | 20 |
| Récidives | À distance | 41 | 40 | 28 | 29 |
| | Toutes | 71 | 78 | 37 | 37 |
| Sous-type intrinsèque NanoString | Luminal A | 674 | 488 | 218 | 112 |
| | Luminal B | 245 | 150 | 87 | 54 |
| | Basal-Like | 4 | 5 | 0 | 1 |
| | HER2 enrichi | 21 | 18 | 6 | 10 |

L'objectif principal était d'évaluer la capacité du score RDR à fournir des informations pronostiques supplémentaires importantes sur la survie sans récidive à distance au-delà des variables cliniques standard dans les années 5 à 10. Un modèle nul composé du seul score de traitement clinique (CTS) a été comparé à un autre modèle comportant le CTS et la RDR en utilisant un test de rapport de vraisemblance. La RDR a ajouté des informations importantes au point de vue statistique pour la DRFS après 5 ans au-delà des variables cliniques standard pour toutes les patientes ($p < 0,0001$), ainsi que pour les patientes sans envahissement ganglionnaire ($p < 0,0001$) et avec envahissement ganglionnaire (1 à 3 ganglions) ($p < 0,0001$).

Le tableau 23 montre un résumé des rapports de risque pour une modification de 10 points basée sur une analyse univariée et sur une analyse multivariée incluant le score RDR et le CTS. Les rapports de risque pour le score RDR s'éloignent tous nettement de 1, même après l'ajustement du CTS. Les index C sont également indiqués dans le tableau 22. Pour les deux groupes, l'index C s'éloignait nettement de la valeur d'absence d'information de 0,5.

Tableau 23 : Résumé des tests de récidive tardive

| Nombre de ganglions | N | Rapport de risque : Modification de 10 points du score RDR | | Index C avec intervalles de confiance de 95 % | | |
|---------------------|-------|--|---------------------|---|-----------|-----------|
| | | Analyse univariée | Analyse multivariée | Index C | Inférieur | Supérieur |
| 0 | 1 605 | 1,38 [1,23-1,54] | 1,29 [1,15-1,46] | 70,1 % | 64,7 % | 75,5 % |
| 1-3 | 488 | 1,43 [1,25-1,63] | 1,34 [1,16-1,53] | 71,1 % | 64,0 % | 78,3 % |

La majorité des patientes des deux études étaient HER2 négatives. Le tableau 24 montre la distribution de l'état HER2 pour les femmes sans et avec envahissement ganglionnaire (1 à 3 ganglions). Pour les deux groupes, plus de 90 % des femmes des études étaient HER2 négatives.

Tableau 24 : Distribution de l'état HER2 par nombre de ganglions

| Sous-ensemble de patientes | État HER2 | | Total |
|--|----------------|-------------|-------|
| | Négatif | Positif | |
| Sans envahissement ganglionnaire | 1 478 (92,1 %) | 127 (7,9 %) | 1 605 |
| Avec envahissement ganglionnaire (1 à 3 ganglions) | 457 (93,6 %) | 31 (6,4 %) | 488 |

Le tableau 25 montre une comparaison du modèle multivarié ajusté pour toutes les patientes d'un groupe d'état ganglionnaire donné, ainsi que le modèle ajusté pour l'ensemble des patientes HER2 négatives du groupe. Il n'existe pas de différence importante au niveau statistique.

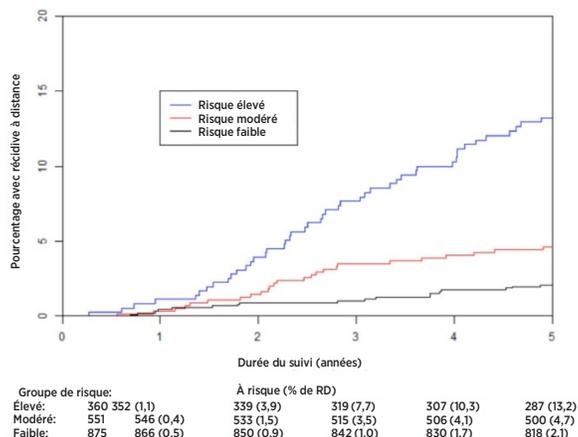
Tableau 25 : Rapports de risque multivariés pour la modification du score RDR de 10 points : Toutes les patientes du sous-groupe par rapport aux patientes HER2 négatives du sous-groupe

| Nombre de ganglions | Toutes les patientes [IC de 95 %] | Patientes HER2 négatives [IC de 95 %] |
|--|-----------------------------------|---------------------------------------|
| Sans envahissement ganglionnaire | 1,29 [1,15-1,46] | 1,35 [1,19-1,54] |
| Avec envahissement ganglionnaire (1 à 3 ganglions) | 1,34 [1,16-1,53] | 1,29 [1,11-1,50] |

La comparaison dans les groupes de risque se poursuit dans les figures 20 et 21, qui montrent les courbes d'incidence pour la récurrence à distance précoce et tardive représentées par groupe de risque chez les patientes sans et avec envahissement ganglionnaire (1 à 3 ganglions), respectivement. Les courbes d'incidence couvrent la période de récurrence précoce (dans les 5 premières années) et la période de récurrence tardive (entre 5 et 10 ans après le diagnostic). Immédiatement sous l'axe x, chaque figure montre le nombre de femmes à risque et l'incidence cumulée. Les tableaux récapitulatifs sous les figures montrent les intervalles de confiance pour le taux de récurrence à distance cumulé à 5 ans ou à 10 ans pour les femmes sans récurrence à distance à la fin des 5 années de traitement. Pour les patientes avec envahissement ganglionnaire (1 à 3 ganglions) représentées dans la figure 21, les groupes de risque faible et modéré ont été associés en raison du nombre peu élevé de patientes dans le groupe à risque faible.

La population à risque faible présente une infime probabilité de récurrence entre 5 et 10 ans après 5 ans d'endocrinothérapie, comme le montrent les courbes d'incidence cumulée et les rapports de risque associés à chaque groupe de risque. Au contraire, les populations à risque modéré et élevé présentent un risque persistant de récurrence à distance tardive après 5 années d'endocrinothérapie. La différence de résultat entre les populations sans envahissement ganglionnaire à risque modéré et élevé est établie dans les 5 premières années (taux de récurrence à distance = 13,2 % [9,6 % - 16,7 %] pour les patientes à risque élevé et 4,7 % [2,9 % - 6,4 %] pour les patientes à risque modéré) et persiste jusqu'à 10 ans. Toutefois, les taux de récurrence pour les groupes à risque modéré et élevé après 5 ans d'endocrinothérapie sont très similaires.

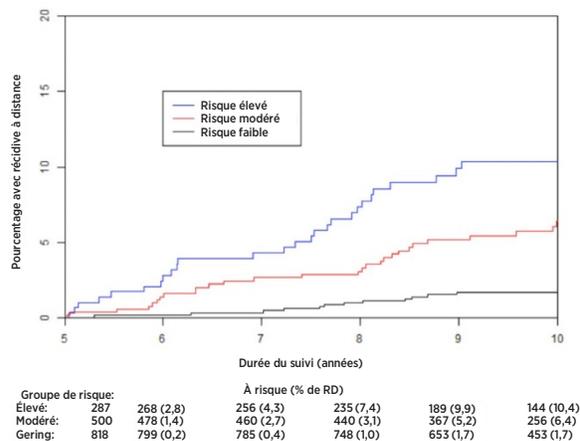
Figure 20A : Courbes d'incidence pour la récurrence à distance par groupe de risque de 0 à 5 ans : Sans envahissement ganglionnaire



Résumé des données de la figure 20A : Courbes d'incidence pour la récurrence à distance par groupe de risque de 0 à 5 ans : Sans envahissement ganglionnaire

| Taux de récurrence à distance par groupe de risque jusqu'à cinq ans après la fin du traitement [intervalles de confiance de 95 %] | | |
|---|-----------------------|-----------------------|
| Élevé | Modéré | Faible |
| 13,2 % [9,6 % - 16,7 %] | 4,7 % [2,9 % - 6,4 %] | 2,1 % [1,1 % - 3,1 %] |

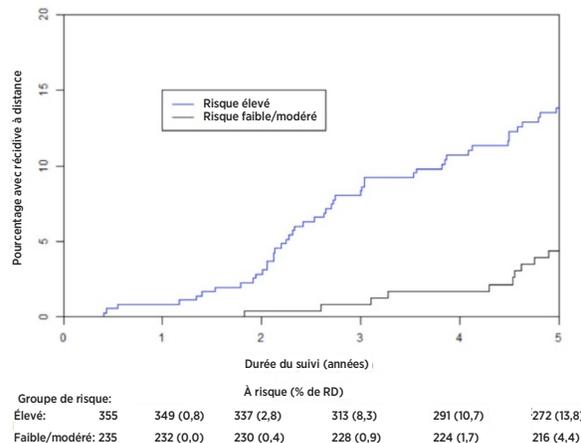
Figure 20B : Courbes d'incidence pour la récurrence à distance par groupe de risque de 5 à 10 ans : Sans envahissement ganglionnaire



Résumé des données de la figure 20B : Courbes d'incidence pour la récurrence à distance par groupe de risque de 5 à 10 ans : Sans envahissement ganglionnaire

| Taux de récurrence à distance par groupe de risque cinq ans après la fin du traitement sans récurrence à distance [intervalles de confiance de 95 %] | | |
|--|-----------------------|-----------------------|
| Élevé | Modéré | Faible |
| 10,4 % [6,6 % - 14 %] | 6,4 % [4,1 % - 8,7 %] | 1,7 % [0,8 % - 2,6 %] |

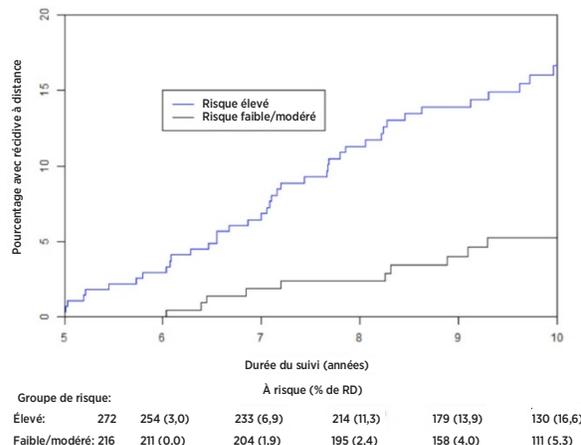
Figure 21A : Courbes d'incidence pour la récurrence à distance par groupe de risque de 0 à 5 ans : Avec envahissement ganglionnaire (1 à 3 ganglions)



Résumé des données de la figure 21A : Courbes d'incidence pour la récurrence à distance par groupe de risque de 0 à 5 ans : Avec envahissement ganglionnaire (1 à 3 ganglions)

| Taux de récurrence à distance par groupe de risque jusqu'à cinq ans après la fin du traitement [intervalles de confiance de 95 %] | |
|---|-----------------------|
| Élevé | Faible/modéré |
| 13,8 % [10,1 % - 17,4 %] | 4,4 % [1,7 % - 7,0 %] |

Figure 21B : Courbes d'incidence pour la récurrence à distance par groupe de risque de 5 à 10 ans : Avec envahissement ganglionnaire (1 à 3 ganglions)



Résumé des données de la figure 21B : Courbes d'incidence pour la récurrence à distance par groupe de risque de 5 à 10 ans : Avec envahissement ganglionnaire (1 à 3 ganglions)

| Taux de récurrence à distance par groupe de risque cinq ans après la fin du traitement sans récurrence à distance [intervalles de confiance de 95 %] | |
|--|-----------------------|
| Élevé | Faible/modéré |
| 16,6 % [11,7 % - 21,3 %] | 5,3 % [2,0 % - 8,4 %] |

Conclusions de l'analyse combinée

Le score RDR a été indiqué pour ajouter des informations pronostiques importantes dans la période de récurrence tardive entre 5 et 10 ans après le diagnostic et au-delà des variables cliniques standard dans l'étude combinée pour les patientes sans récurrence à distance pendant cinq années. En utilisant les groupes de risque définis en référence pour chaque cohorte spécifique du nombre de ganglions, les groupes de risque ont été indiqués pour classer l'ensemble des patientes en groupes présentant un risque très différent de récurrence à distance tardive. Les analyses des groupes de risque continu et basé sur le score RDR ont fourni des informations pronostiques similaires dans différents sous-groupes. Aucune différence matérielle n'a été observée entre les résultats en comparant les patientes HER2 négatives à l'ensemble des patientes.

Dans chacune des études TransATAC et ABCSG-8, il a été démontré que le RDR ajoutait des informations pronostiques significatives au-delà des variables cliniques et de traitement standard, aussi bien quand elles étaient incluses comme une mesure continue que lors de l'utilisation des trois groupes de risque prédéfinis. Les deux études impliquaient des profils de risque différents dans le sens où le taux d'événements était supérieur dans l'étude TransATAC par rapport à l'étude ABCSG-8 : cette différence est clairement démontrée par la comparaison du taux DRFS (%) dans les groupes de contrôle des essais ATAC (90,8 %) et ABCSG8 (92,5 %) décrits dans la littérature^{9,10}. Cette analyse combinait les données des deux études à poids égal, pour créer les profils de risque qui semblaient plus applicables aux autres populations de patientes que les résultats de chacune des études.

Étude 1 : Prédiction du risque de récurrence à distance chez les femmes post-ménopausées souffrant d'un cancer du sein précoce à récepteurs hormonaux positifs, avec ou sans envahissement ganglionnaire, traité avec l'Arimidex ou le Tamoxifène : une étude TransATAC.

Plan expérimental

L'étude de validation clinique est conçue de manière à confirmer que le score de risque de récurrence (RDR) fournit des informations pronostiques supplémentaires sur la survie sans récurrence à distance (DRFS) au-delà des variables cliniques standard sur la base de tous les échantillons de patientes disponibles. Cette étude a utilisé l'ARN isolé à partir des tissus tumoraux mammaires FFIP prélevés sur un sous-ensemble des patientes qui avaient participé à l'essai¹¹. L'essai ATAC incluait 9 366 patientes, réparties entre trois groupes (1:1:1) dans lesquels les patientes ont été sélectionnées de manière aléatoire pour suivre une endocrinothérapie pendant 5 ans, consistant en 1 mg d'Anastrozole (à savoir, Arimidex) plus un placebo Tamoxifène, 20 mg de Tamoxifène plus un placebo Anastrozole ou une combinaison de Tamoxifène/Arimidex. Le groupe de traitement combiné a été abandonné après l'analyse initiale, car il n'a démontré aucun bénéfice en termes d'efficacité et de tolérabilité par rapport à l'administration de tamoxifène en monothérapie. Un suivi médian sur 10 ans des groupes de monothérapie inclus dans le cadre de l'essai ATAC a été récemment publié pour satisfaire les exigences de la FDA relatives à l'actualisation des informations sur l'innocuité et l'efficacité⁹. Parmi les patientes à récepteurs hormonaux positifs, une amélioration significative de la DFS (HR = 0,86), de la RFS (HR = 0,79) et de la DRFS (HR = 0,85) a été observée chez les patientes traitées avec l'anastrozole par rapport à celles traitées au tamoxifène dans cette analyse. Les différences absolues de la survie sans récurrence à distance entre les groupes traités à l'anastrozole et au tamoxifène se sont accrues au fil du temps, passant de 2,7 % à 5 ans à 4,3 % à 10 ans. L'étude TransATAC a été lancée en 2002, conformément au protocole TA/O1, pour établir une banque de tissus à partir des blocs FFIP histopathologiques archivés prélevés sur des patientes ayant participé à l'étude ATAC rétrospectivement¹¹.

Au total 2 006 blocs ont été prélevés sur les 4 160 femmes atteintes d'un cancer du sein à récepteurs hormonaux positifs qui ont été randomisées au sein des groupes soumis à une monothérapie dans le cadre de l'essai ATAC. Parmi ces blocs FFIP, 1 372 ont été recueillis auprès de patientes au Royaume-Uni et contenaient suffisamment de tumeurs invasives pour mener à bien l'analyse à l'aide du test Genomic Health® Oncotype Dx®¹². Le score de récurrence Oncotype Dx Recurrence Score® (RS) a été déterminé à partir des blocs FFIP et les résultats de l'étude ont cliniquement validé le score de récurrence pour l'estimation de la survie sans récurrence à distance chez les patientes post-ménopausées souffrant d'un cancer du sein avec récepteurs hormonaux positifs traitées à l'Anastrozole ou au Tamoxifène. L'ARN restant dans l'étude Oncotype Dx a été envoyé au Royal Marsden Hospital, à Londres, où il a été stocké à -70 °C. Au total 1 017 patientes ayant participé à l'étude Oncotype Dx avaient >500 ng d'ARN restant et ont été testées par NanoString dans le cadre de l'étude de validation clinique NanoString.

Cette étude a utilisé les sous-types intrinsèques générés par le dosage et a évalué deux versions du score RDR en mettant en œuvre une approche séquentielle prédéfinie. Les deux scores RDR différents, allant chacun de 0 à 100, ont été calculés à l'aide des 50 gènes du test, comme précédemment publié⁹, ou à l'aide d'un sous-ensemble de 46 gènes. Dans chaque cas, les coefficients ont été calculés à partir d'un

modèle de Cox incluant la corrélation de Pearson aux 50 ou aux 46 gènes servant au calcul de chaque sous-type intrinsèque, un score de prolifération et la taille des tumeurs. Les données de suivi sur 10 ans ont fait l'objet de toutes les analyses.

Le critère d'évaluation principal était la survie sans récurrence à distance (DRFS). Ce critère a été défini comme l'intervalle entre le diagnostic et la récurrence à distance ou le décès dû au cancer du sein. Le critère d'évaluation secondaire était la survie sans récurrence (RFS). Ce critère a été défini comme l'intervalle entre le diagnostic et la première récurrence (locale, régionale ou à distance) ou le décès dû au cancer du sein.

En utilisant tous les échantillons de patientes disponibles, les modèles à risques proportionnels (PH, Proportional Hazards) de Cox multivariés ont été ajustés pour évaluer l'objectif principal dans des tests séquentiels du RDR sur la base de 50 et 46 gènes. Le modèle incluait les covariables cliniques standard (âge, stade des tumeurs, taille des tumeurs, état ganglionnaire, traitement adjuvant). Un modèle de Cox a ensuite été ajusté et un test du rapport de vraisemblance a été effectué pour déterminer si le RDR a ajouté des informations pronostiques supplémentaires, significatives du point de vue statistique ($\alpha = 0,05$), supérieures à celles contenues dans le score de traitement clinique (CTS, Clinical Treatment Score). Le score CTS est une combinaison optimisée de facteurs clinicopathologiques, développés par le chercheur clinique comme une mesure de pathologie standard¹². Les analyses primaires ont été répétées pour différents sous-ensembles de patientes (toutes, sans envahissement ganglionnaire, avec envahissement ganglionnaire ou HER2 négatives seulement) et critères d'évaluation (DRFS ou RFS).

Pour chacune des patientes avec envahissement ganglionnaire et sans envahissement ganglionnaire, des modèles de Cox (sauf CTS) ont été utilisés pour prédire le risque de DR à 10 ans en fonction du RDR. Sur la base des prédictions de ces modèles, trois groupes de risque ont été définis comme suit :

| | |
|-----------------|------------------------------------|
| Risque faible : | < 10 % de risque de DR à 10 ans |
| Risque modéré : | 10 - 20 % de risque de DR à 10 ans |
| Risque élevé : | > 20 % de risque de DR à 10 ans |

Analyse

Des courbes de Kaplan-Meier ont été générées pour chaque groupe de risque. Des tests de rapport de vraisemblance (utilisés pour comparer l'ajustement de deux modèles statistiques), comme décrit dans l'analyse primaire, ont été effectués pour le test Oncotype Dx de Genomic Health (RS, score de récurrence) et le test immunohistochimique (IHC4) du responsable de la recherche. Ces résultats ont été comparés à ceux du RDR obtenus pour déterminer dans quelle mesure chaque système de score fournit des informations pronostiques supplémentaires supérieures au score CTS. Les résultats IHC4 ne seront pas discutés davantage, car ils sont difficiles à comparer aux autres dosages, puisque le test IHC4 a été traité à l'aide des données de l'étude TransATAC.

Tableau 26 : Résumé des données démographiques et des caractéristiques cliniques

| Caractéristiques | Étude actuelle (n = 1 007) | | Étude initiale à partir de laquelle a été obtenue l'ARN (n = 1 231) | Groupes d'agent unique de l'étude ATAC non inclus (n = 2 929) |
|----------------------------|----------------------------|----------------|---|---|
| | Nbr de patientes | % de patientes | | |
| État ganglionnaire | | | | |
| Négatif | 701 | 70 % | 71 % | 68 % |
| Positif | 268 | 27 % | 25 % | 25 % |
| Inconnu | 38 | 4 % | 4 % | 7 % |
| Taille de la tumeur | | | | |
| < 1 cm | 138 | 14 % | 67 % | 70 % |
| 1-2 cm | 523 | 52 % | | |
| 2-3 cm | 253 | 25 % | 33 % | 30 % |
| > 3 cm | 93 | 9 % | | |
| Stade de la tumeur | | | | |
| Puits | 213 | 21 % | 27 % | 25 % |
| Modéré | 601 | 60 % | 57 % | 59 % |
| Médiocre | 193 | 19 % | 16 % | 17 % |
| Âge | | | | |
| Moyenne | 64,4 ans | | 64,3 | 66,1 |

Tableau 27 : Autres caractéristiques cliniques

| Caractéristiques | Nombre de patientes | % de patientes |
|--------------------|---------------------|----------------|
| Sous-type | | |
| Basal-Like | 9 | 1 % |
| HER2 enrichi | 41 | 4 % |
| Luminal A | 692 | 69 % |
| Luminal B | 265 | 26 % |
| Traitement | | |
| Anastrozole | 513 | 51 % |
| Tamoxifène | 494 | 49 % |
| Récurrences | | |
| Toutes | 210 | 21 % |
| À distance | 160 | 16 % |
| État HER2 | | |
| Négatif | 888 | 88 % |
| Positif | 119 | 12 % |

Résultats

Les tests de l'analyse primaire ont démontré que le score RDR fournit des informations pronostiques supplémentaires sur la survie sans récurrence à distance au-delà des variables cliniques standard (CTS). Toutes les données RDR rapportées ensuite reposent sur 46 gènes, ceux-ci formant la base du score RDR tel qu'il est renvoyé par le Dosage Prosigna.

Tableau 28 : Tests de l'analyse primaire du RDR

| Modèle nul | Modèle alternatif | $\Delta LR \chi^2$ | Valeur p χ^2 |
|------------|-------------------|--------------------|-------------------|
| CTS | CTS + ROR | 34,21 | P < 0,0001 |

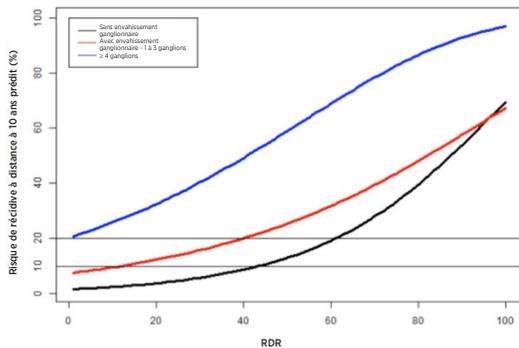
Les analyses secondaires ont démontré que le RDR est largement lié à la survie sans récurrence à distance et ajoute des informations pronostiques au-delà du score CTS dans plusieurs sous-groupes pertinents du point de vue clinique.

Tableau 29 : Répétition des tests de l'analyse primaire pour les sous-groupes prédéfinis

| Groupe de sujets | Critère d'évaluation | Nbr de patientes | Nbr d'événements | CTS+ROR vs. CTS | |
|---|----------------------|------------------|------------------|--------------------|-------------------|
| | | | | $\Delta LR \chi^2$ | Valeur p χ^2 |
| Tous | DRFS | 1 007 | 160 | 34,2 | < 0,0001 |
| | RFS | 1 007 | 210 | 31,2 | < 0,0001 |
| HER2 négatives | DRFS | 888 | 131 | 28,9 | < 0,0001 |
| | RFS | 888 | 179 | 26,9 | < 0,0001 |
| Sans envahissement ganglionnaire | DRFS | 739 | 79 | 25,0 | < 0,0001 |
| | RFS | 739 | 117 | 21,5 | < 0,0001 |
| Avec envahissement ganglionnaire | DRFS | 268 | 81 | 9,3 | 0,0023 |
| | RFS | 268 | 93 | 10,6 | 0,0011 |
| HER2 négatives sans envahissement ganglionnaire | DRFS | 649 | 62 | 24,6 | < 0,0001 |
| | RFS | 649 | 98 | 20,8 | < 0,0001 |

Les analyses primaires et secondaires ont montré que le RDR était en permanence lié au DRFS chez toutes les patientes et au sein de tous les sous-groupes.

Figure 22 : Estimation du risque de récurrence à distance prévu à 10 ans par l'analyse du score RDR au sein du groupe d'état ganglionnaire



Les analyses secondaires ont démontré que les sous-types Luminal A et Luminal B avaient des résultats significativement différents du point de vue statistique au sein de chaque sous-groupe de patientes défini par état ganglionnaire.

Figure 23 : Courbes de Kaplan-Meier illustrant la DRFS chez les patientes sans envahissement ganglionnaire par sous-type intrinsèque

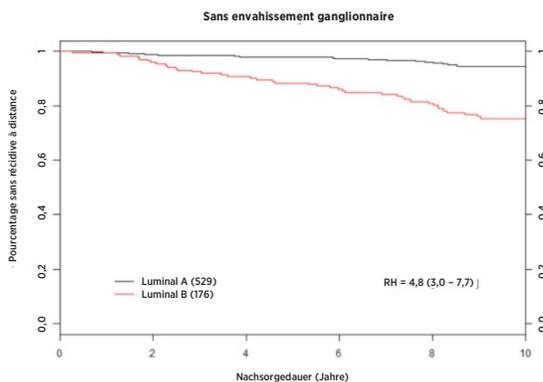
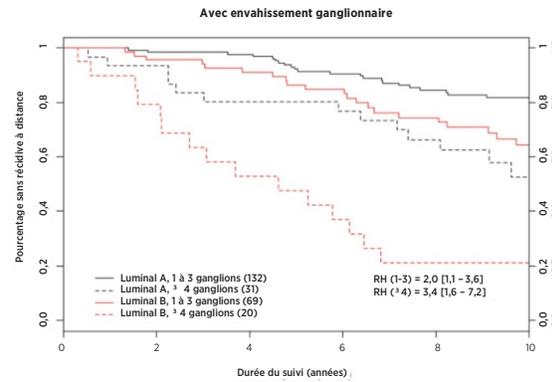
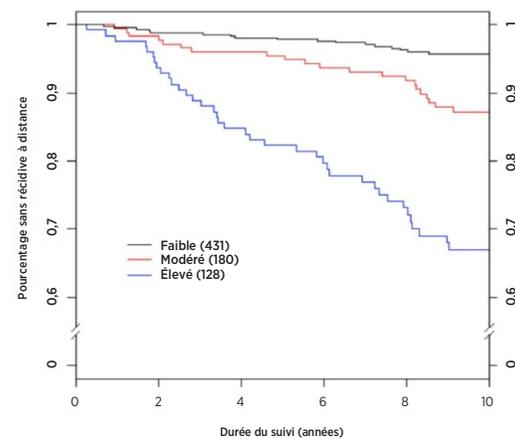


Figure 24 : Courbes de Kaplan-Meier illustrant la DRFS chez les patientes avec envahissement ganglionnaire par sous-type intrinsèque



Les Figures 25 et 26 ont démontré qu'au sein de chaque catégorie ganglionnaire, le risque clinique absolu des patientes pour lesquelles les prédictions donnent un risque faible était nettement différent du risque clinique absolu des patientes pour lesquelles les prédictions donnent un risque élevé : les patientes qui présenteraient un risque faible ont affiché des taux de DR à 10 ans inférieurs à 10 %, tandis que les patientes qui présenteraient un risque élevé ont affiché des taux de DR à 10 ans supérieurs à 30 %.

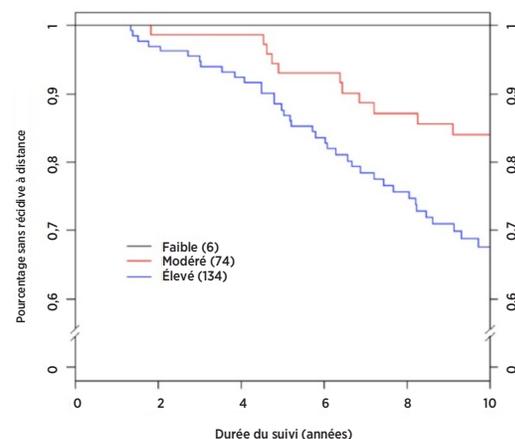
Figure 25 : DRFS par groupe de risque chez les patientes sans envahissement ganglionnaire, sauf CTS



Résumé des données de la figure 25 : DRFS par groupe de risque chez les patientes sans envahissement ganglionnaire, sauf CTS

| Groupe de risque | Nombre de patientes (%) | Nombre d'événements | Pourcentage estimé sans récurrence à distance à 10 ans [IC de 95 %] |
|------------------|-------------------------|---------------------|---|
| Faible | 431 (58 %) | 17 | 96 % [94 % - 98 %] |
| Modéré | 180 (24 %) | 22 | 86 % [81 % - 92 %] |
| Élevé | 128 (17 %) | 38 | 67 % [59 % - 76 %] |
| Total | 739 (100 %) | 77 | |

Figure 26 : DRFS par groupe de risque chez les patientes avec envahissement ganglionnaire comprenant 1 à 3 ganglions sans CTS



Résumé des données de la figure 26 : DRFS par groupe de risque chez les patientes avec envahissement ganglionnaire comprenant 1 à 3 ganglions sans CTS

| Groupe de risque | Nombre de patientes (%) | Nombre d'événements | Pourcentage estimé sans récurrence à distance à 10 ans [IC de 95 %] |
|------------------|-------------------------|---------------------|---|
| Faible | 6 (3 %) | 0 | 100 % [S/O] |
| Modéré | 74 (35 %) | 11 | 84 % [76 % - 93 %] |
| Élevé | 134 (63 %) | 38 | 68 % [59 % - 77 %] |
| Total | 214 (100 %) | 49 | |

Comparaison du RDR et du RS

Sur les 1 007 échantillons renvoyant des scores RDR, le test Oncotype Dx a donné des résultats pour les 1 007 échantillons. En revanche, des résultats IHC n'ont été obtenus que pour 940 échantillons. Pour permettre la comparaison des trois tests, les résultats présentés dans cette section sont basés sur les 940 échantillons qui ont renvoyé des résultats pour les trois méthodes (toutefois, le résultat IHC4 n'est pas rapporté ici). Des tests de rapport de vraisemblance sont présentés pour l'ajout d'une variable unique. Par conséquent, pour que les informations ajoutées soient significatives du point de vue statistique ($\alpha = 0,05$), la variation de la statistique χ^2 à 1 degré de liberté doit être supérieure à 3,84. Les figures ci-dessous indiquent les informations ajoutées quand le test pronostique est ajouté à un autre test pronostique en plus du score CTS en séquence. À chaque addition, les informations ajoutées sont mesurées par la variation de χ^2 .

RDR ajouté à RS en plus du score CTS : informations pronostiques

Figure 27 : Informations pronostiques pour la DRFS au-delà du score CTS chez toutes les patientes (n = 940)

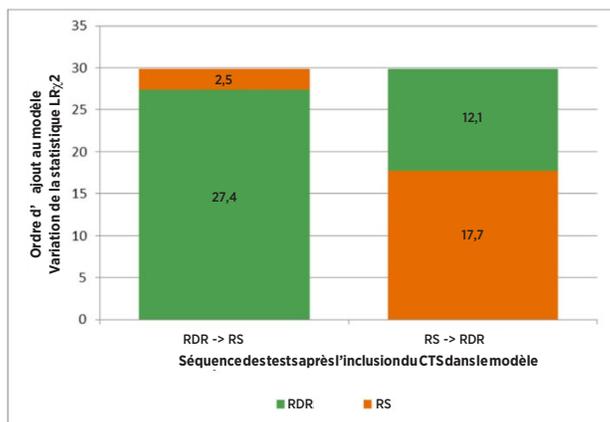


Figure 28 : Informations pronostiques pour la DRFS au-delà du score CTS chez les patientes sans envahissement ganglionnaire (n = 683)

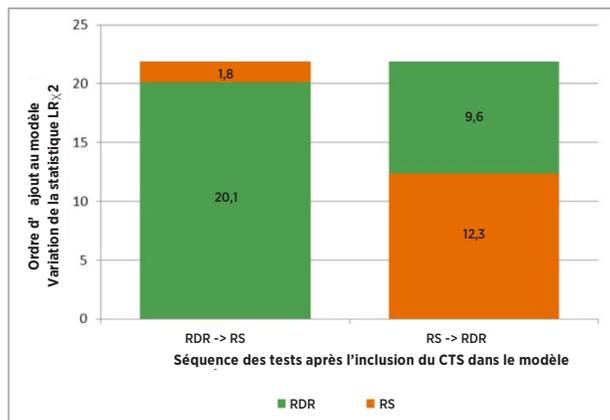


Figure 29 : Informations pronostiques pour la DRFS au-delà du score CTS chez les patientes avec envahissement ganglionnaire (n = 257)

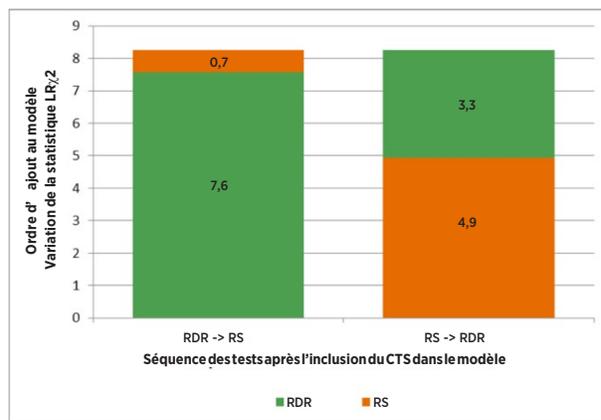
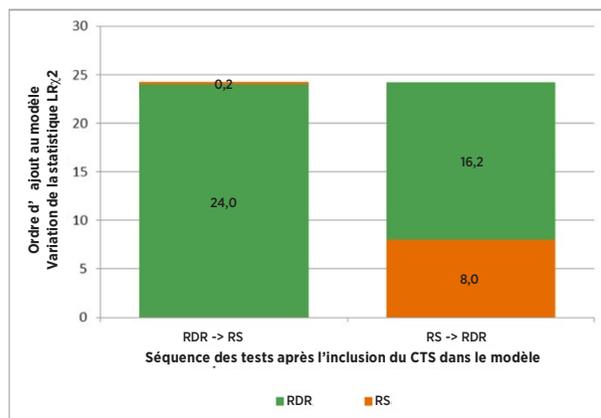


Figure 30 : Informations pronostiques pour la DRFS au-delà du score CTS chez les patientes HER2-négatives sans envahissement ganglionnaire (n = 649)



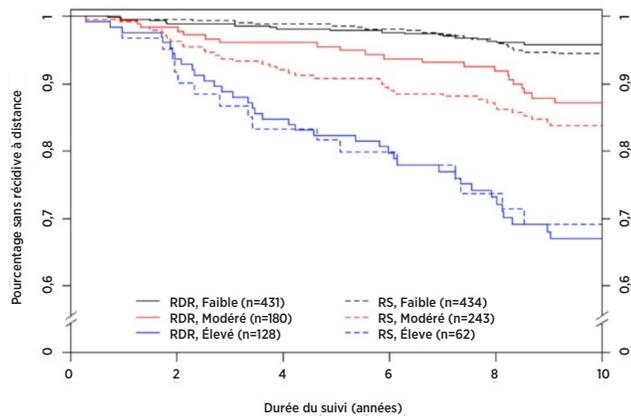
Les figures 27 à 30 indiquent les informations ajoutées au-delà du CTS quand les deux tests pronostiques sont ajoutés en séquence. À chaque addition, les informations ajoutées sont mesurées par la variation de la statistique χ^2 . Par exemple, quand le RDR était le premier test ajouté après l'inclusion du CTS (toutes les données patient), la variation de la statistique χ^2 était égale à 27,4. Une fois le CTS et le RDR inclus dans le modèle, l'ajout du RS a donné une variation de la statistique χ^2 égale à 2,5, ce qui n'est pas significatif (la valeur critique du test χ^2 avec 1 degré de liberté est égale à 3,84) ; en d'autres termes, une fois que le CTS et le RDR sont tous deux inclus dans le modèle, le RS n'ajoute pas d'informations significatives. Toutefois, si le RS était le premier test ajouté, des informations contenues dans le RDR n'étaient toujours pas incluses dans la combinaison du CTS et du RS. Les deux tests affichent une importance pronostique quand ils sont ajoutés au CTS chez les patientes avec envahissement ganglionnaire ; en revanche, aucun des tests ne présente d'importance quand il est ajouté en tant que deuxième test, éventuellement en raison de la petite taille des échantillons. Dans le sous-ensemble des patientes HER2 négatives sans envahissement ganglionnaire, le RS n'ajoute pas d'informations pronostiques significatives à la combinaison CTS + RDR. D'autre part, le RDR ajoute des informations pronostiques significatives à la combinaison CTS + RS.

RDR vs. RS : résultat des groupes de risque

Pour comparer la manière dont les deux tests ont séparé les patientes en fonction du risque, des groupes de risque ont été définis sur la base de l'estimation du risque de récurrence à distance à 10 ans au sein de la population TransATAC établie par le test. Des seuils de score de risque permettant de définir les groupes de risque ont été choisis pour chaque test sur la base des résultats de notre étude TransATAC, en vue de définir les groupes de risque comprenant les patientes présentant un même risque. Pour obtenir ces groupes de risque comparables, les seuils utilisés pour le test Oncotype DX étaient différents de ceux employés par Genomic Health. Pour chaque test, le groupe de risque faible a été prospectivement défini comme comprenant les patientes présentant un risque de récurrence estimé inférieur à 10 %. Pour chaque test, le groupe de risque modéré a été prospectivement défini comme comprenant les patientes présentant un risque de récurrence estimé compris entre 10 et 20 %. Pour chaque test, le groupe de risque élevé a été prospectivement défini comme comprenant les patientes présentant un risque de récurrence estimé supérieur à 20 %. La figure ci-dessous résume les tailles et les résultats des groupes de risque définis par chaque test.

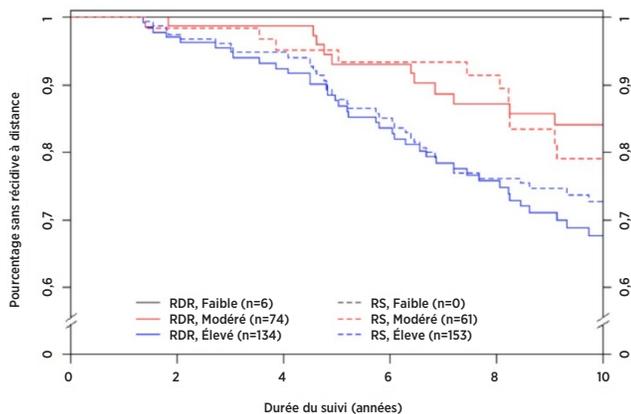
La figure 31 indique que Prosigna a affecté au groupe de risque modéré 26 % de patientes en moins que le test Oncotype DX (180 patientes contre 243 patientes). En outre, Prosigna a affecté davantage de patientes au groupe de risque élevé que le test Oncotype DX ; toutefois, les groupes de risque faible et élevé définis par chaque test ont des résultats similaires à ceux illustrés par les courbes de Kaplan-Meier qui se chevauchent. Cette observation a conduit les chercheurs indépendants de notre étude TransATAC à conclure que Prosigna a affecté moins de patientes au groupe de risque modéré que le score RS du test Oncotype DX, avec une séparation équivalente ou supérieure entre les groupes de risque faible et élevé.

Figure 31 : Le score RDR de Prosigna a identifié un nombre beaucoup plus important de patientes présentant un risque élevé et moins de patientes présentant un risque modéré que le score RS du test Oncotype DX chez les patientes sans envahissement ganglionnaire.



Lors de l'utilisation du RDR seul chez les patientes avec envahissement ganglionnaire (1 à 3 ganglions), il a été prédit que 6 patientes auraient un risque de récidive à distance < 10 %. Aucune de ces patientes n'a présenté d'événement pendant l'étude. Une de ces patientes a été observée pendant 7,9 ans et toutes les autres n'ont affiché aucun DR pendant au moins 9,9 ans de suivi, ce qui indique que les prédictions de risque faible chez les patientes affichant un envahissement ganglionnaire sont avérées. Les tests Mantel-Haenzel n'ont pas été utilisés pour la comparaison, puisqu'il n'y avait pas de groupes de risque faible pour le RS.

Figure 32 : Comparaison de la classification des groupes de risque DRFS à 10 ans sans utilisation du CTS : patientes avec envahissement ganglionnaire (1 à 3 ganglions) (RDR vs. RS)



Conclusions de l'étude clinique 1

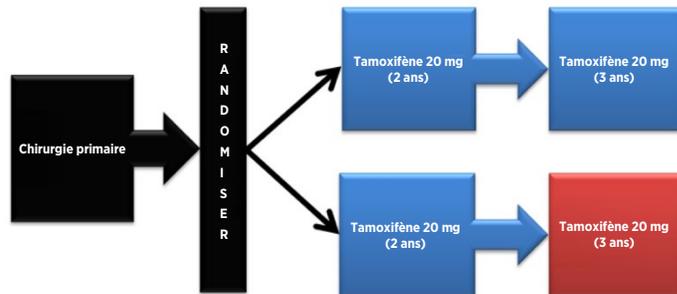
L'analyse primaire a montré que le RDR a ajouté des informations pronostiques significatives au-delà de celles des covariables cliniques standard (CTS) chez toutes les patientes et dans tous les sous-groupes pertinents du point de vue clinique prédéfinis. Il a été démontré que le RDR divise les patientes en 3 groupes de risque, qui ont des résultats significativement différents du point de vue statistique en l'absence d'envahissement ganglionnaire. Il a été observé que les sous-types intrinsèques Luminal A et Luminal B ont des scores DRFS et RFS significativement différents, quel que soit l'état ganglionnaire. Comparé aux indicateurs pronostiques RS (score de récidive sur la base de 21 gènes obtenu par le test Oncotype Dx), le RDR a ajouté des informations pronostiques au-delà du RS chez toutes les patientes et dans les sous-groupes pertinents du point de vue clinique. De plus, dans le groupe sans envahissement ganglionnaire, le RDR a multiplié par deux le nombre de patientes affectées au groupe de risque élevé et a substantiellement réduit le nombre de patientes affectées au groupe de risque modéré, sans réduire les écarts dans les résultats entre les groupes de risque faible et élevé par rapport au score de récidive.

Étude 2 : Pronostic pour les patientes post-ménopausées atteintes d'un cancer du sein à récepteurs hormonaux positifs qui suivent une endocrinothérapie systémique adjuvante en monothérapie à l'aide du Dosage Prosigna : une étude ABCSG-8

Plan expérimental

La cohorte étudiée consiste en des échantillons de tissus tumoraux mammaires FFIP rétrospectivement prélevés et archivés dans la banque de tumeurs ABCSG auprès de patientes inscrites entre 1996 et 2004 dans l'essai ABCSG-8³. Au total 3 901 femmes post-ménopausées atteintes d'un cancer du sein précoce HR+ ont été choisies de manière aléatoire avant le traitement pour recevoir pendant deux ans du Tamoxifène adjuvant, suivi de l'administration d'Arimidex® (anastrozole) pendant trois ans ou de Tamoxifène adjuvant pendant cinq ans. La structure de traitement de l'essai est illustrée dans la figure 33 :

Figure 33 : Schéma du plan expérimental de l'essai ABCSG-8



La cohorte de validation représente la fraction de la cohorte ABCSG-8 évaluable pour laquelle des échantillons de tissus ont pu être recueillis auprès de la banque de tumeurs ABCSG rétrospectivement archivées et pour laquelle un consentement éclairé a pu être obtenu, ou la patiente est décédée. Les patientes qui satisfont aux critères d'éligibilité de l'essai initial ont uniquement été exclues pour l'une des deux raisons suivantes : les tissus n'étaient pas disponibles pour le dosage NanoString à effectuer ou le consentement de la patiente n'a pas pu être obtenu à nouveau. Tous les échantillons disposant d'un bloc tumoral et du consentement de la patiente ont été testés dans le cadre de cette étude.

Cette étude a utilisé les sous-types intrinsèques générés par le dosage et a évalué le score RDR à l'aide d'un plan d'analyse prédéfini. Le score RDR, compris entre 0 et 100, a été calculé à l'aide d'un sous-ensemble de 46 gènes extraits des 50 gènes de test précédemment publiés². Les coefficients de RDR ont été calculés à partir d'un modèle de Cox incluant la corrélation de Pearson aux 46 gènes servant à déterminer chaque sous-type intrinsèque, un score de prolifération et la taille brute des tumeurs. Les données de suivi maximal ont fait l'objet de toutes les analyses.

Le critère d'évaluation principal était la survie sans récidive à distance (DRFS). Ce critère a été défini comme l'intervalle entre le diagnostic et la récidive à distance ou le décès dû au cancer du sein. Le critère d'évaluation secondaire était la survie sans récidive (RFS). Ce critère a été défini comme l'intervalle entre le diagnostic et la première récidive (locale, régionale ou à distance) ou le décès dû au cancer du sein.

En utilisant tous les échantillons de patientes disponibles, les modèles à risques proportionnels (PH, Proportional Hazards) de Cox multivariés ont été ajustés pour évaluer l'objectif principal dans des tests séquentiels du RDR. Le modèle incluait les covariables cliniques standard (âge, stade des tumeurs, taille brute des tumeurs, état ganglionnaire, traitement adjuvant). Un modèle de Cox a ensuite été ajusté et un test du rapport de vraisemblance a été effectué pour déterminer si le RDR a ajouté des informations pronostiques supplémentaires, significatives du point de vue statistique ($\alpha = 0.05$), supérieures à celles contenues dans le score de traitement clinique (CTS, Clinical Treatment Score). Le score CTS est une combinaison optimisée de facteurs clinicopathologiques, développés comme une mesure de pathologie standard¹². Les analyses primaires ont été répétées pour différents sous-ensembles de patientes (toutes, sans envahissement ganglionnaire, avec envahissement ganglionnaire ou HER2 négatives seulement) et critères d'évaluation (DRFS ou RFS).

Analyse

Une approche séquentielle a été mise en œuvre, dont le principal objectif scientifique était de démontrer que le RDR ajoute des informations pronostiques significatives au-delà des variables cliniques standard. L'objectif principal a ajouté une exigence supplémentaire pour démontrer que la classification catégorielle du risque dans l'un des trois groupes (faible/modéré/élevé) ajoute des informations pronostiques significatives au-delà des variables cliniques standard. Pour satisfaire cette exigence, les deux démonstrations suivantes ont dû être faites :

- Démonstration que le score RDR continu ajoute une valeur pronostique au-delà des variables cliniques standard
- Si l'hypothèse nulle d'absence d'informations pronostiques est rejetée, démonstration que les catégories de risque définies sur la base du RDR ajoutent une valeur pronostique au-delà des variables cliniques standard

En utilisant tous les échantillons de patientes disponibles, les modèles à risques proportionnels (PH) de Cox multivariés ont été ajustés pour évaluer l'objectif principal dans des tests séquentiels du RDR, suivis des catégories de risque prédéfinies sur la base du RDR. Les modèles incluaient les covariables cliniques standard catégorielles suivantes (avec les valeurs possibles) :

- Âge (≥ 65 ou < 65)
- Stade (G1 ou G2/GX)
- Taille brute des tumeurs (T1, T2/T3)
- État ganglionnaire (NO, N+(1-3), N+(≥ 4))
- Traitement adjuvant (Tamoxifène seul ou Tamoxifène → Anastrozole)

où NO désigne les patientes sans envahissement ganglionnaire, N+(1-3) désigne les patientes avec envahissement ganglionnaire consistant en 1 à 3 ganglions et N+(≥ 4) désigne les patientes avec envahissement ganglionnaire consistant en 4 ganglions ou plus. T1 indique les tumeurs < 2 cm, T2 indique les tumeurs de plus de 2 cm mais de moins de 5 cm, et T3 désigne les tumeurs de plus de 5 cm. L'étude n'incluant que 14 échantillons T3, ceux-ci ont été combinés avec les échantillons T2. Les tumeurs bien différenciées (G1) ont été comparées à la combinaison de tumeurs modérément différenciées (G2) et lobulaires GX. Les tumeurs lobulaires GX ont été traitées comme des tumeurs G2 pour les besoins de l'analyse, car ces dernières correspondent au stade le plus courant chez cette population de patientes.

Ces covariables sont saisies dans le modèle sous forme de score de traitement clinique (CTS). Pour obtenir le CTS, le modèle suivant a été ajusté :

$$\lambda(t) = \lambda_0(t) \exp\left(\sum_j z_j \gamma_j\right)$$

Où les lettres z représentent les variables cliniques et de traitement indiquées ci-dessus et le CTS a été défini à l'aide des estimations des valeurs γ obtenues ci-dessus ; par conséquent, $CTS = \sum_j z_j \gamma_j$.

Les hypothèses de risques proportionnels ont été testées à l'aide de la méthode des résidus Schoenfeld.

Les patientes incluses dans l'étude de validation présentaient des caractéristiques similaires à celles de l'étude ACBSG-8 initiale.

Tableau 30 : Résumé des caractéristiques cliniques

| Caractéristiques | Valeur | Inclus (n = 1 478) | | Non inclus (n = 2 236) | | Total (n = 3 714) | |
|--------------------|------------------------|--------------------|--------|------------------------|--------|-------------------|--------|
| | | Nbr | % | Nbr | % | Nbr | % |
| Traitement | Tamoxifène uniquement | 741 | 50,1 % | 1 108 | 49,3 % | 1 849 | 49,8 % |
| | Tamoxifène Anastrozole | 737 | 49,9 % | 1 128 | 50,2 % | 1 865 | 50,2 % |
| État ER | Négatif | 14 | 0,9 % | 32 | 1,4 % | 46 | 1,2 % |
| | Positif | 1 464 | 99,1 % | 2 199 | 98,3 % | 3 663 | 98,6 % |
| | Inconnu | 0 | 0,0 % | 5 | 0,2 % | 5 | 0,1 % |
| Stade | G1 | 271 | 18,3 % | 468 | 20,8 % | 739 | 19,9 % |
| | G2 | 1 152 | 77,9 % | 1 659 | 73,9 % | 2 811 | 75,7 % |
| | GX | 55 | 3,7 % | 109 | 4,9 % | 164 | 4,4 % |
| État ganglionnaire | NO | 1 047 | 70,8 % | 1 723 | 76,7 % | 2 770 | 74,6 % |
| | N+(1-3) | 382 | 25,8 % | 449 | 20,0 % | 831 | 22,4 % |
| | N+(≥ 4)* | 49 | 3,3 % | 64 | 2,8 % | 113 | 3,0 % |
| État PgR | Négatif | 260 | 17,6 % | 424 | 18,9 % | 684 | 18,4 % |
| | Positif | 1 218 | 82,4 % | 1 805 | 80,4 % | 3 023 | 81,4 % |
| | Inconnu | 0 | 0,0 % | 7 | 0,3 % | 7 | 0,2 % |
| Stade de la tumeur | T1 | 1 037 | 70,2 % | 1 745 | 77,7 % | 2 782 | 74,9 % |
| | T2 | 427 | 28,9 % | 472 | 21,0 % | 899 | 24,2 % |
| | T3 | 14 | 0,9 % | 19 | 0,8 % | 33 | 0,9 % |
| Âge | Médiane | 63 | | SO | | 64 | |
| | Domaine | 41-79 | | | | 41 - 80 | |

* Inclut une patiente présentant > 9 ganglions

Tableau 31 : Autres caractéristiques cliniques

| Caractéristiques | Valeur | Nombre de patientes | % de patientes |
|----------------------------------|--------------|---------------------|----------------|
| Sous-type intrinsèque NanoString | LuminalA | 1 004 | 67,9 % |
| | LuminalB | 418 | 28,3 % |
| | HER2 enrichi | 48 | 3,2 % |
| Récidives | BasalLike | 8 | 0,5 % |
| | À distance | 155 | 10,5 % |
| État HER2 | Toutes | 194 | 13,1 % |
| | Négatif | 1 397 | 94,5 % |
| | Positif | 77 | 5,2 % |
| | Inconnu | 4 | 0,3 % |

Résultats

Sur les 1 620 tissus disponibles pour les tests, 25 (1,5 %) n'ont pas réussi l'examen pathologique prédéfini pour une tumeur adéquate, 73 des 1 595 échantillons tissulaires (4,6 %) contenant des tissus invasifs viables n'ont pas satisfait les spécifications de CQ prédéfinies pour l'ARN extrait et 44 des 1 522 échantillons d'ARN (2,9 %) n'ont pas satisfait les spécifications de CQ du dosage pour les résultats Prosigna, laissant au total 1 478 (91,2 %) échantillons disponibles pour l'analyse.

Sur les 1 478 patientes disponibles pour l'analyse, 155 ont entraîné une récurrence à distance et 194 ont entraîné une récurrence locale ou à distance, ou un décès dû au cancer du sein. La durée de suivi médiane de l'essai était de 10 ans.

Les tests de l'analyse primaire ont démontré que le score RDR fournit des informations pronostiques supplémentaires sur la survie sans récurrence à distance au-delà des variables cliniques standard (CTS).

Tableau 32 : Résumé des tests de l'analyse primaire

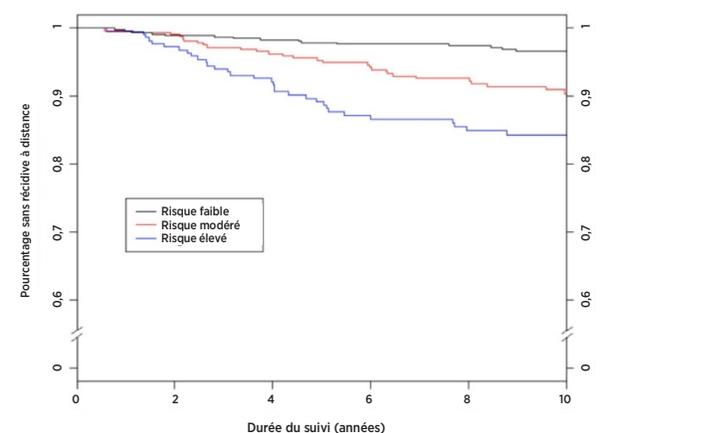
| Modèle nul | Modèle alternatif | $\Delta LR \chi^2$ | Valeur critique χ^2 (Degrés de liberté) | Valeur p χ^2 |
|------------|------------------------|--------------------|--|-------------------|
| CTS | CTS + ROR | 53,49 | 3,84 (df = 1) | $p < 0,0001$ |
| CTS | CTS + Groupe de risque | 34,12 | 5,99 (df = 2) | $p < 0,0001$ |

Les analyses secondaires ont démontré que le RDR est largement lié à la survie sans récurrence à distance et ajoute des informations pronostiques au-delà du score CTS dans plusieurs sous-groupes pertinents du point de vue clinique.

Tableau 33 : Répétition des tests de l'analyse primaire pour les sous-groupes prédéfinis

| Groupe de sujets | Nbr de patientes | Nbr d'événements | CTS+ROR vs. CTS | CTS+Groupe de risque vs. CTS |
|------------------------|------------------|------------------|--|--|
| | | | $\Delta LR \chi^2$ (Valeur crit. = 3,84) | $\Delta LR \chi^2$ (Valeur crit. = 5,99) |
| Tous | 1 478 | 155 | 53,49 | 34,12 |
| HER2 négatives | 1 397 | 145 | 47,50 | 29,94 |
| NO | 1 047 | 86 | 25,57 | 23,36 |
| NO, HER2 négatives | 984 | 79 | 21,69 | 20,32 |
| N+(1-3) | 382 | 59 | 25,99 | 19,94 |
| N+(1-3), HER2 négative | 367 | 56 | 22,75 | 18,75 |

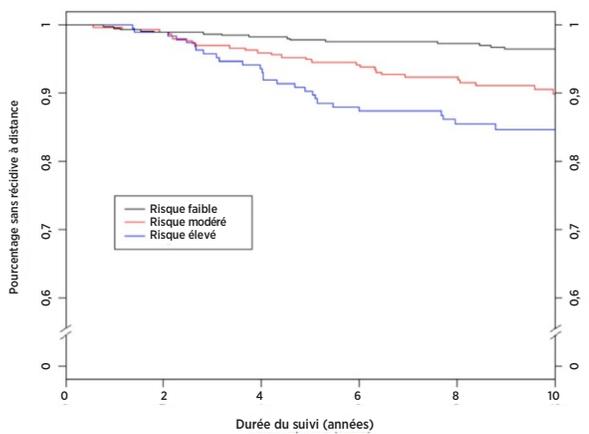
Figure 34 : DRFS par groupe de risque chez les patientes sans envahissement ganglionnaire



Résumé des données de la figure 34 : DRFS par groupe de risque chez les patientes sans envahissement ganglionnaire

| Groupe de risque | Nombre de patientes (%) | Nombre d'événements sur 10 ans | Pourcentage estimé sans récurrence à distance à 10 ans [IC de 95 %] |
|------------------|-------------------------|--------------------------------|---|
| Faible | 487 (47 %) | 15 | 96,6 % [94,4 % - 97,9 %] |
| Modéré | 335 (32 %) | 28 | 90,4 % [86,3 % - 93,3 %] |
| Élevé | 225 (21 %) | 32 | 84,3 % [78,4 % - 88,6 %] |
| Total | 1 047 (100 %) | 75 | |

Figure 35 : DRFS par groupe de risque chez les patientes HER2 négatives sans envahissement ganglionnaire

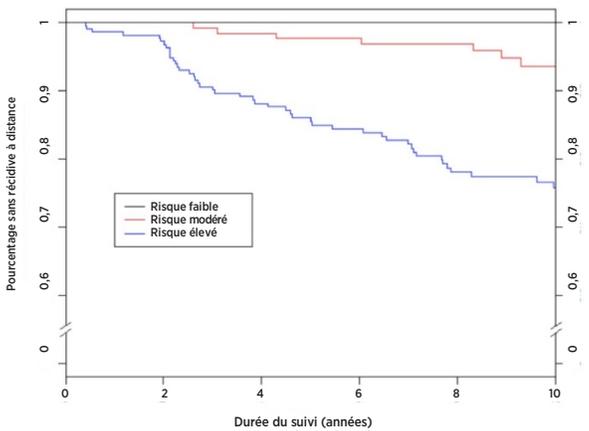


Résumé des données de la figure 35 : DRFS par groupe de risque chez les patientes HER2 négatives sans envahissement ganglionnaire

| Groupe de risque | Nombre de patientes (%) | Nombre d'événements sur 10 ans | Pourcentage estimé sans récurrence à distance à 10 ans [IC de 95 %] |
|------------------|-------------------------|--------------------------------|---|
| Faible | 474 (48 %) | 15 | 96,5 % [94,3 % - 97,9 %] |
| Modéré | 311 (32 %) | 27 | 90 % [85,6 % - 93,1 %] |
| Élevé | 199 (20 %) | 27 | 84,7 % [78,4 % - 89,3 %] |
| Total | 984 (100 %) | 69 | |

La figure 36 illustre les courbes de Kaplan-Meier par groupe de risque chez les patientes avec envahissement ganglionnaire (1 à 3 ganglions), tandis que la figure 37 illustre les mêmes courbes chez les patientes HER2 négatives avec envahissement ganglionnaire (1 à 3 ganglions). Les résultats avec et sans les patientes HER2 positives sont similaires.

Figure 36 : DRFS par groupe de risque chez les patientes avec envahissement ganglionnaire (1 à 3 ganglions)

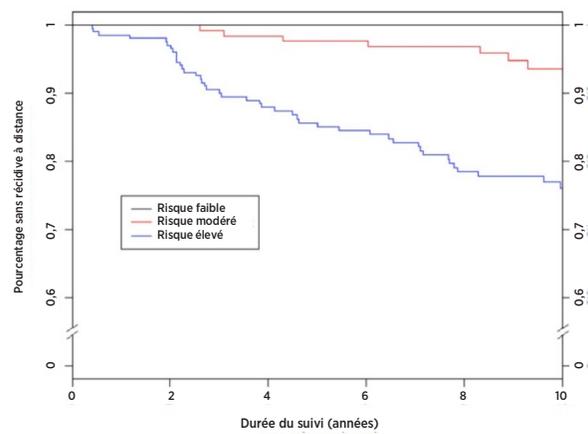


Résumé des données de la figure 36 : DRFS par groupe de risque chez les patientes avec envahissement ganglionnaire (1 à 3 ganglions)

| Groupe de risque | Nombre de patientes (%) | Nombre d'événements sur 10 ans | Pourcentage estimé sans récurrence à distance à 10 ans [IC de 95 %] |
|------------------|-------------------------|--------------------------------|---|
| Faible | 15 (4 %) | 0 | 100 % [78,2 % - 100 %]* |
| Modéré | 143 (37 %) | 7 | 93,6 % [86,9 % - 97 %] |
| Élevé | 224 (59 %) | 46 | 75,8 % [68,9 % - 81,4 %] |
| Total | 382 (100 %) | 53 | |

* Intervalle de confiance estimé à l'aide de la méthode de Clopper-Pearson

Figure 37 : DRFS par groupe de risque chez les patientes HER2 négatives avec envahissement ganglionnaire (1 à 3 ganglions)



Résumé des données de la figure 37 - DRFS par groupe de risque chez les patientes HER2 négatives avec envahissement ganglionnaire (1 à 3 ganglions)

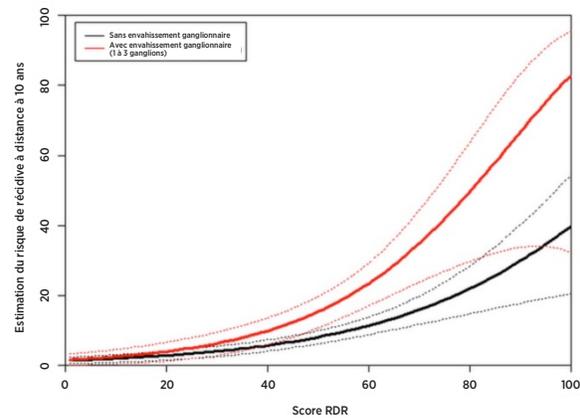
| Groupe de risque | Nombre de patientes (%) | Nombre d'événements sur 10 ans | Pourcentage estimé sans récurrence à distance à 10 ans [IC de 95 %] |
|------------------|-------------------------|--------------------------------|---|
| Faible | 15 (4 %) | 0 | 100 % [78,2 % - 100 %]* |
| Modéré | 142 (39 %) | 7 | 93,6 % [86,8 % - 96,9 %] |
| Élevé | 210 (57 %) | 43 | 76,1 % [69,0 % - 81,8 %] |
| Total | 367 (100 %) | 50 | |

* Intervalle de confiance estimé à l'aide de la méthode de Clopper-Pearson.

Relation entre la prédiction du risque et du RDR

La figure 38 illustre le risque de RD à 10 ans en fonction du score RDR avec des intervalles de confiance de 95 %, sur la base de modèles de risques proportionnels de Cox distincts pour chacun des groupes de patientes sans envahissement ganglionnaire et avec envahissement ganglionnaire (1 à 3 ganglions). Pour les patientes avec envahissement ganglionnaire (1 à 3 ganglions), l'hypothèse des risques proportionnels a été enfreinte lors de l'ajustement sur l'intégralité de la plage. La courbe illustrée ici pour les patientes avec envahissement ganglionnaire (1 à 3 ganglions) utilise les patientes avec envahissement ganglionnaire (1 à 3 ganglions) affichant des scores RDR dans l'intervalle compris entre 0 et 80, pour lesquels l'hypothèse des risques proportionnels a été satisfaite.

Figure 38 : Estimation du risque RD à dix ans par catégorie ganglionnaire avec des intervalles de confiance de 95 %



Dans chaque sous-groupe, le risque clinique absolu des patientes affectées à la catégorie de risque faible était substantiellement différent du risque clinique absolu des patientes affectées à la catégorie de risque élevé.

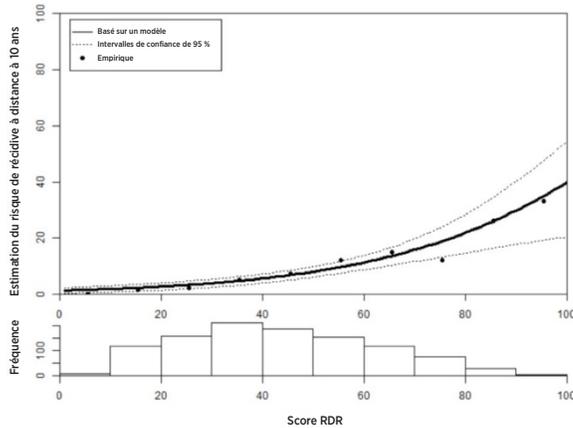
Le tableau 34 illustre la distribution des patientes sans envahissement ganglionnaire par intervalle de RDR de 10 unités. Le risque RD à 10 ans est également indiqué.

Tableau 34 : Distribution des patientes sans envahissement ganglionnaire par intervalle de RDR de 10 unités

| Plage RDR | Nombre de patientes | Pourcentage de patientes | Risque RD à 10 ans (Empirique) |
|-----------|---------------------|--------------------------|--------------------------------|
| 1-10 | 7 | 0,7 % | 0,0 % |
| 11-20 | 116 | 11,1 % | 1,8 % |
| 21-30 | 155 | 14,8 % | 2,5 % |
| 31-40 | 209 | 20,0 % | 5,1 % |
| 41-50 | 183 | 17,5 % | 7,5 % |
| 51-60 | 152 | 14,5 % | 12,1 % |
| 61-70 | 116 | 11,1 % | 15,0 % |
| 71-80 | 77 | 7,4 % | 12,3 % |
| 81-90 | 28 | 2,7 % | 26,1 % |
| 91-100 | 4 | 0,4 % | 33,3 % |
| Total | 1 047 | 100 % | |

La figure 39 illustre la courbe basée sur les modèles correspondant aux patientes sans envahissement ganglionnaire ainsi que les taux de survie à 10 ans estimés de manière empirique pour les 10 intervalles, chaque intervalle comprenant toutes les patientes dans les plages RDR de 10 unités (1-10, 11-20, etc.). En-dessous de la courbe se trouve un histogramme illustrant la distribution par fréquence par intervalle.

Figure 39 : Comparaison des estimations basées sur un modèle et empiriques du risque RD à 10 ans des patientes sans envahissement ganglionnaire avec, en-dessous, l'illustration de la distribution des scores RDR



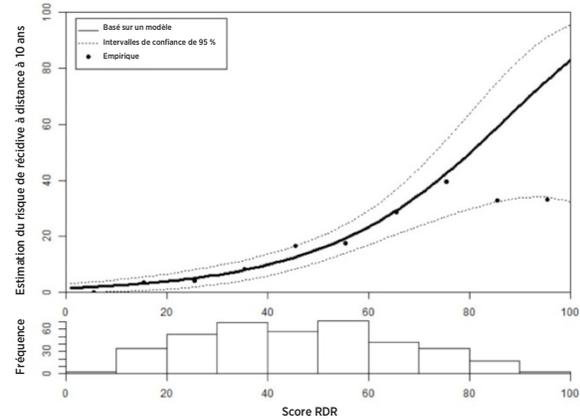
Pour les patientes sans envahissement ganglionnaire, les estimations basées sur les modèles à risques proportionnels étaient similaires aux estimations empiriques sur l'intégralité de la plage. Le tableau 35 illustre la distribution des patientes avec envahissement ganglionnaire (1 à 3 ganglions) par intervalle de RDR de 10 unités. Le risque RD à 10 ans est également indiqué.

Tableau 35 : Distribution des patientes avec envahissement ganglionnaire (1 à 3 ganglions) par intervalle de RDR de 10 unités

| Plage RDR | Nombre de patientes | Pourcentage de patientes | Risque RD à 10 ans (Empirique) |
|-----------|---------------------|--------------------------|--------------------------------|
| 1-10 | 3 | 0,8 % | 0,0 % |
| 11-20 | 34 | 8,9 % | 3,6 % |
| 21-30 | 53 | 13,9 % | 4,1 % |
| 31-40 | 68 | 17,8 % | 8,5 % |
| 41-50 | 57 | 14,9 % | 16,7 % |
| 51-60 | 71 | 18,6 % | 17,8 % |
| 61-70 | 42 | 11,0 % | 28,9 % |
| 71-80 | 34 | 8,9 % | 39,5 % |
| 81-90 | 17 | 4,5 % | 33,0 % |
| 91-100 | 3 | 0,8 % | 33,3 % |
| Total | 382 | 100 % | |

La figure 40 illustre la courbe basée sur un modèle (patientes avec envahissement ganglionnaire [1 à 3 ganglions] et scores RDR ≤ 80) correspondant aux patientes avec envahissement ganglionnaire (1 à 3 ganglions) ainsi que les taux de survie à 10 ans estimés de manière empirique pour les 10 intervalles, chaque intervalle comprenant toutes les patientes dans les plages RDR de 10 unités (1-10, 11-20, etc.). En-dessous de la courbe se trouve un histogramme illustrant la distribution par fréquence par intervalle.

Figure 40 : Comparaison des estimations basées sur un modèle et empiriques du risque RD à 10 ans chez les patientes avec envahissement ganglionnaire (1 à 3 ganglions) avec, en dessous, l'illustration de la distribution des scores RDR



Le tableau 35 et la figure 40 montrent tous deux l'aplatissement du risque à 10 ans observé en haut de la plage RDR qui a conduit à l'échec de l'hypothèse des risques proportionnels. Toutefois, il convient de noter que les tailles des échantillons dans les deux intervalles supérieurs à 80 étaient petites chez les patientes avec envahissement ganglionnaire (1 à 3 ganglions) (17 patientes de 81 à 90 et 3 patientes seulement de 91 à 100).

Comparaison des sous-types intrinsèques Luminal A et Luminal B

La majorité des sujets qui ont participé à l'étude (96 %) souffraient d'un cancer de type Luminal A ou Luminal B, ce qui était inattendu car ces sous-types intrinsèques prédominent chez les patientes à récepteurs hormonaux positifs¹².

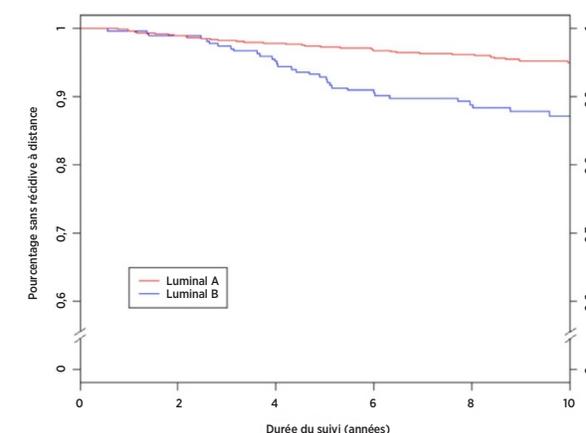
Le tableau 36 présente les résultats du test de rapport de vraisemblance pour démontrer la valeur pronostique additionnelle de la DRFS que la distinction entre les sous-types Luminal A/Luminal B ajoute au-delà du score CTS. Ce tableau indique également le rapport de risque comparant les patientes atteintes d'un cancer de type Luminal A et Luminal B. Le risque de récurrence à distance était nettement inférieur chez les patientes souffrant d'un cancer de type Luminal A dans les trois groupes.

Tableau 36. Test de rapport de vraisemblance relatif à la valeur pronostique de la DRFS des sous-types Luminal

| Sous-groupe | Nbr de patientes | Nbr d'événements | $\Delta LR \chi^2$ | Valeur p χ^2 | Rapport de risque de LumA : LumB (IC de 95 %) |
|-------------|------------------|------------------|--------------------|-------------------|---|
| Tous | 1 422 | 135 | 24,42 | < 0,0001 | 0,42 [0,30 - 0,59] |
| N0 | 1 009 | 74 | 9,68 | 0,0019 | 0,47 [0,30 - 0,75] |
| N+(1-3) | 366 | 51 | 14,94 | 0,0001 | 0,33 [0,19 - 0,58] |

La figure 41 illustre une comparaison de la DRFS par sous-type Luminal chez les patientes sans envahissement ganglionnaire, tandis que la figure 42 montre cette même comparaison chez les patientes avec envahissement ganglionnaire (1 à 3 ganglions). Dans les deux groupes, on a observé des différences significatives entre la DRFS des patientes souffrant d'un cancer de type Luminal A et Luminal B.

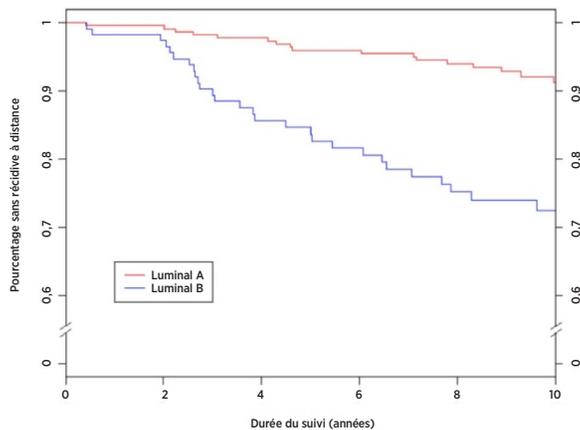
Figure 41 : Courbes de Kaplan-Meier illustrant le taux de DRFS par sous-type intrinsèque chez les patientes sans envahissement ganglionnaire



Résumé des données de la figure 41 : Courbes de Kaplan-Meier illustrant le taux de DRFS par sous-type intrinsèque chez les patientes sans envahissement ganglionnaire

| Groupe de risque | Nombre de patientes | Nombre d'événements sur 10 ans | Pourcentage estimé sans récidive à distance à 10 ans [IC de 95 %] |
|------------------|---------------------|--------------------------------|---|
| Luminal A | 725 | 32 | 95,1 % [93,4 % - 96,3 %] |
| Luminal B | 284 | 32 | 87,2 % [83,2 % - 90,3 %] |
| Total | 1 009 | 64 | |

Figure 42 : Courbes de Kaplan-Meier illustrant le taux de DRFS par sous-type intrinsèque chez les patientes avec envahissement ganglionnaire (1 à 3 ganglions)



Résumé des données de la figure 42 : Courbes de Kaplan-Meier illustrant le taux de DRFS par sous-type intrinsèque chez les patientes avec envahissement ganglionnaire (1 à 3 ganglions)

| Groupe de risque | Nombre de patientes | Nombre d'événements sur 10 ans | Pourcentage estimé sans récidive à distance à 10 ans [IC de 95 %] |
|------------------|---------------------|--------------------------------|---|
| Luminal A | 248 | 17 | 91,3 % [87,2 % - 94,2 %] |
| Luminal B | 118 | 28 | 72,5 % [64,2 % - 79,1 %] |
| Total | 366 | 45 | |

Le tableau 37 illustre les taux de RFS à 10 ans par sous-type Luminal au sein des groupes de patientes sans et avec envahissement ganglionnaire (1 à 3 ganglions).

Tableau 37 : Taux de RFS à 10 ans par groupe d'envahissement ganglionnaire et sous-type Luminal

| État ganglionnaire | Sous-type Luminal | Nombre de patientes (%) | Nombre d'événements sur 10 ans | Pourcentage estimé sans récidive à distance à 10 ans [IC de 95 %] |
|--------------------|-------------------|-------------------------|--------------------------------|---|
| NO | Luminal A | 725 (72) | 44 | 93,0 % [91,1 % - 94,5 %] |
| | Luminal B | 284 (28) | 44 | 82,2 % [77,6 % - 85,9 %] |
| N+(1-3) | Luminal A | 248 (68) | 21 | 89,1 % [84,7 % - 92,4 %] |
| | Luminal B | 118 (32) | 30 | 71,6 % [62,2 % - 77,4 %] |

Pour chacune des populations de patientes sans et avec envahissement ganglionnaire (1 à 3 ganglions), la différence entre les sous-types Luminal A et Luminal B était significative.

Conclusions de l'étude clinique 2

Il a été démontré que le RDR ajoutait des informations pronostiques significatives au-delà des variables cliniques et de traitement standard, aussi bien quand elles étaient incluses comme une mesure continue que lors de l'utilisation des trois groupes de risque prédéfinis. Le groupe de risque faible a présenté une DRFS à 10 ans nettement supérieure à 90 %, comme anticipé. Le groupe de risque élevé a présenté une DRFS à 10 ans de 80 %, soit plus qu'anticipé. On attendait un taux nettement inférieur à 80 %. Les seuils ayant servi à définir les groupes de risque reposaient sur la cohorte TransATAC, qui présente un risque supérieur à la cohorte actuelle, ce qui a conduit à un « groupe de risque élevé » présentant moins de risque que prévu. Le RDR (continu et basé sur le groupe de risque) a fourni des informations pronostiques similaires dans différents sous-groupes. Le modèle de risque continu correspond de près aux taux de récurrence empiriques chez les patientes sans et avec envahissement ganglionnaire (1 à 3 ganglions). La plupart des patientes (96 %) ayant participé à l'étude étaient atteintes de tumeurs de l'un des deux sous-types Luminal (Luminal A ou Luminal B). Dans tous les groupes d'état ganglionnaire, la distinction entre les sous-types Luminal A/Luminal B a ajouté des informations pronostiques concernant la DRFS.

Résumé des études cliniques combinées

Les résultats peuvent être généralisés pour un usage distribué, car les échantillons ont été envoyés à différents laboratoires et ont été analysés au sein de ces différents établissements dans le cadre de deux études de validation cliniques. Il a été démontré que le RDR ajoutait des informations pronostiques significatives pour la DRFS à 10 ans au-delà des variables cliniques et de traitement standard, aussi bien quand elles étaient incluses comme une mesure continue que lors de l'utilisation des trois groupes de risque prédéfinis. En outre, dans une analyse post-hoc, le RDR a ajouté des informations importantes pour la DRFS à 5 ans au-delà des variables cliniques standard pour toutes les patientes. Le RDR (continu et basé sur le groupe de risque) a fourni des informations pronostiques similaires dans différents sous-groupes. Des analyses limitées ont également été effectuées à l'aide de la RFS. Les classes de RDR ont également pu définir 3 groupes de risque présentant un taux de RFS distinct. Dans les deux études, on a observé des différences significatives entre la DRFS des sous-groupes Luminal A et Luminal B, indépendamment de l'état ganglionnaire.

17 BIBLIOGRAPHE

- Geiss G, et al. Direct multiplexed measurement of gene expression with color-coded probe pairs Nature Biotechnology 2008; 26: 317-25.
- Parker JS, et al. Supervised Risk Predictor of Breast Cancer Based on Intrinsic Subtypes. Journal of Clinical Oncology 2009, 27(8): 1160-1167.
- Dowsett M. et al. on behalf of the ATAC and LATTE Trialists Group. Comparison of PAM50 Risk of Recurrence Score With Oncotype DX and IHC4 for Predicting Risk of Distant Recurrence After Endocrine Therapy. Journal of Clinical Oncology. J Clinical Oncology. 2013 Aug 1;31(22):2783-90.
- Nielsen TO, et al. A comparison of PAM50 intrinsic subtyping with immunohistochemistry and clinical prognostic factors in tamoxifen-treated estrogen receptor positive breast cancer. Clinical Cancer Research 2010; 16: 5222-5232.
- Harris JR, et al. (Carey L, Perou C) Diseases of the Breast 4th edition. 2009: 458-471.
- Baker SC, et al. The External RNA Controls Consortium: a progress report. Nature Methods 2010; 2: 731-734.
- Tholen DW, et al. CLSI EP5-A2: Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods; Approved Guideline—Second Edition. Clinical Laboratory Standards Institute. Volume 24.
- Sestak I, et al. Prediction of Late Distant Recurrence After 5 Years of Endocrine Treatment: A Combined Analysis of Patients From the Austrian Breast and Colorectal Cancer Study Group 8 and Arimidex, Tamoxifen Alone or in Combination Randomized Trials Using the PAM50 Risk of Recurrence Score. Journal of Clinical Oncology 2014; Oct 20 ePub ahead of print JCO.2014.55.6894.
- Cuzick J, et al. Effect of anastrozole and tamoxifen as adjuvant treatment for early-stage breast cancer: 10-year analysis of the ATAC trial. Lancet Oncology 2010; 11(12):1135-41.
- Dubsky PC, et al. Tamoxifen and Anastrozole As a Sequencing Strategy: A Randomized Controlled Trial in Postmenopausal Patients With Endocrine-Responsive Early Breast Cancer From the Austrian Breast and Colorectal Cancer Study Group. Journal of Clinical Oncology 2012;30(7): 722-728.
- Dowsett M, et al. Prediction of Risk of Distant Recurrence Using the 21-Gene Recurrence Score in Node-Negative and Node-Positive Postmenopausal Patients With Breast Cancer Treated With Anastrozole or Tamoxifen: A TransATAC Study. Journal of Clinical Oncology 2010; 28: 1829-1834.
- Cuzick J, et al. Prognostic Value of a Combined Estrogen Receptor, Progesterone Receptor, Ki-67, and Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Immunohistochemical Score and Comparison With the Genomic Health® Recurrence Score in Early Breast Cancer. Journal of Clinical Oncology 2011; 29: 4273-4278.

13. (a) Jakesz R, Jonat W, Gnant M, et al. Switching of postmenopausal women with endocrine responsive early breast cancer to anastrozole after 2 years' adjuvant tamoxifen: Combined results of ABCSG trial 8 and ARNO 95 trial. *Lancet* 2005; 366(9484): 455-462.
- (b) Jonat W, Gnant M, Boccard F, Kaufmann M, Rubagotti A, Zuna I, Greenwood M, Jakesz R: Effectiveness of switching from adjuvant tamoxifen to anastrozole in postmenopausal women with hormone-sensitive early-stage breast cancer: a meta-analysis. *Lancet Oncology* 2006; 7(12): 991-996.
- (c) Gnant M, Filipits R, Greil H, et al. Predicting distant recurrence in receptor-positive breast cancer patients with limited clinicopathological risk: using the PAM50 Risk of Recurrence score in 1478 postmenopausal patients of the ABCSG-8 trial treated with adjuvant endocrine therapy alone. *Annals of Oncology* 2014; 25(2):339-45.

19 COORDONNÉES

États-Unis :
 Veracyte, Inc.
 6000 Shoreline Court
 Suite 300
 South San Francisco CA 94080
 USA
 Téléphone : +1-650-243-6335
 www.veracyte.com



Représentant agréé en Europe :
 Veracyte
 Luminy Biotech Entreprises 163
 Avenue de Luminy
 13288 Marseille Cedex 9
 FRANCE

International
 Courriel pour l'assistance technique : DxSupport@Veracyte.com
 Courriel pour les informations produit : info@prosigna.com
 Site Web : www.prosigna.com

18 SYMBOLES ET DÉFINITIONS

- Fabricant

- Représentant agréé au sein de la Communauté européenne

- Dispositif médical réservé au diagnostic *in vitro*

- Consulter le mode d'emploi

- Marque CE

- Code de lot/Numéro de lot

- Référence catalogue

- Contenu suffisant pour <n> tests

- Plage de température de conservation

- Limite de température de conservation minimale

- Limite de température de conservation maximale

- Date limite d'utilisation/Date de péremption -

- Haut

Room Temp. = Température ambiante

HYB = Hybridation

Exclusion de responsabilité

Réservé au diagnostic *in vitro*.

© 2023 Veracyte, Inc. et sociétés affiliées. Tous droits réservés. Veracyte, le logo Veracyte, Prosigna et le logo Prosigna sont des marques de Veracyte, Inc. et de ses sociétés affiliées. nCounter est une marque de NanoString Technologies, Inc. et est utilisée sous licence.