



D'après une communication de

Sylvie LANTUEJOUL

Anatomopathologiste, PU-PH.

Expertise : Pathologie thoracique.

Déclaration publique d'intérêts : Aucun.

Correspondance : Département d'Anatomie et Cytologie Pathologiques DACP, Pôle de Biologie, Institut de Biologie et de Pathologie CHU A Michallon, CS 10217 38043 Grenoble Cedex 09 slantuejoul@chu-grenoble.fr

Peut-on faire le diagnostic de translocation ALK sans FISH ?

Les réarrangements du gène *ALK* dans les adénocarcinomes pulmonaires (ADK) induisent une activation constitutive de la kinase ALK, ciblable par le crizotinib. Bien que la FISH (hybridation *in situ* fluorescente) soit la technique de référence pour le diagnostic de ces réarrangements, l'immunohistochimie (IHC) est un outil très utile de préscreening des tumeurs. Il faut cependant suivre les recommandations d'interprétation des différentes techniques IHC et FISH, notamment pour un pourcentage de cellules réarrangées entre 10 et 20 % par FISH.

Introduction

Le réarrangement du gène *ALK* correspond à une translocation-fusion avec un gène partenaire dont le plus connu est *EML4*. Le diagnostic du réarrangement du gène *ALK* peut se faire selon trois modes : par test FISH, technique de référence qui met en évidence le réarrangement chromosomique, et qui est agréée par la FDA, par immunohistochimie (IHC) qui permet la mise en évidence sur coupes histologiques de l'oncoprotéine de fusion ALK ; cette méthode est plus facile, plus rapide et moins onéreuse donc la plus utilisée actuellement en screening, et la RT-PCR, mais qui en raison de la diversité des partenaires et des variants de ce réarrangement, comporte un taux important de faux négatifs. Des *guidelines* concernant le testing ALK par FISH, IHC

et RT-PCR ont été publiées : *Atlas of ALK Testing in Lung Cancer* sous l'égide de l'IASLC (*International Association for the Study of Lung Cancer*)⁽¹⁾. Le chapitre 3 présente les recommandations importantes à respecter pour FISH par exemple (figure 1).

Analyse comparée FISH/IHC

Différentes études ont comparé les sensibilités et spécificités de l'IHC par rapport à la FISH. L'étude de Cabillic *et al.*⁽³⁾ a porté sur la comparaison dans deux centres Bordeaux et Rennes de l'IHC versus FISH sur plus de 3 000 CBNPC, et a montré des discordances majeures entre les deux techniques (figure 2) pour 80 sur 150 cas ALK réarrangés. L'IHC dans cette

FLUORESCENCE IN SITU HYBRIDIZATION (FISH)

By Akihiko Yoshida and Marileila Varella-Garcia

Parameter	Recommendation
Time to fixation	As short as possible, not exceeding 1 hr
Fixative	10% neutral buffered formalin
Time of fixation	6 to 48 hr
Preparation	Paraffin-embedded sections, cut at a thickness of 5±1µM
Specimen storage	Tissue blocks (ideal)
Storage time for blocks	Not relevant if in proper conditions
Storage conditions for blocks	Protected from light, heat, and humidity
Storage time for cut sections	Less than 1 month (ideal); older slides require customized protocol
Decalcification	EDTA, if necessary

SIGNAL CLASSIFICATION

Patterns observed in native ALK



Red and blue separated by <2 signal diameters
Classified as negative

Red and blue separated by ≥2 signal diameters
Classified as positive

Patterns observed in split 3'-5' ALK



Red and blue separated by <2 signal diameters
Classified as positive

Red and blue separated by <2 signal diameters
Classified as negative

SPECIMEN CLASSIFICATION

Non-rearranged tumors: rearrangement-positive cell rate <1.5% of cells

Rearranged tumors: rearrangement-positive cell rate ≥1.5% of cells

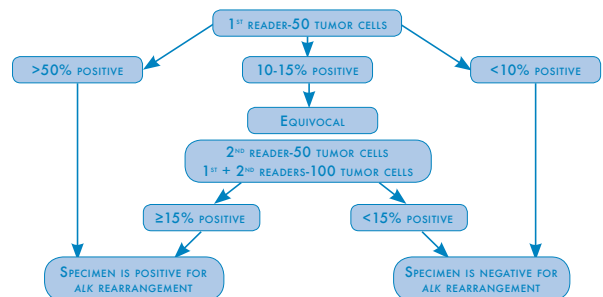
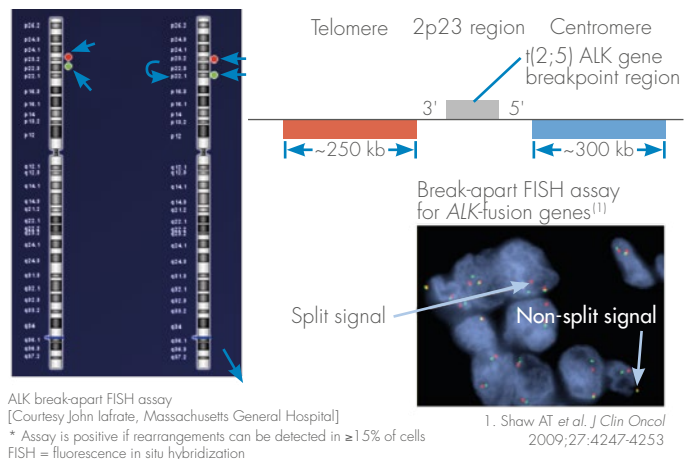


Figure 1 : Atlas ALK Testing chapitre 3. Lecture par un premier puis second lecteur d'au minimum 50 à 60 cellules tumorales chacun ; dans le cadre de FISH de type « break apart », deux sondes verte et orange vont s'hybrider avec les régions correspondant aux points de cassure situés de part et d'autre du locus de ALK. En cas de translocation/inversion, le partenaire de ALK va se mettre en 5' du domaine kinase de ALK entraînant soit une persistance uniquement de la sonde en 3' du gène (signaux rouges isolés) soit un éloignement des deux sondes (« split »), les deux signaux s'éloignant d'une distance équivalente à deux signaux⁽²⁾.

étude présente une sensibilité moins bonne que la FISH mais beaucoup de cas discordants présentent aussi un pourcentage limite de cellules réarrangées (entre 1,5 à 20 %) et un nombre élevé de mutations EGFR ou K-Ras associées à un réarrangement de ALK, ce qui est rarement décrit dans la littérature.

Une autre étude, canadienne⁽⁴⁾ a comparé la qualité du testing ALK réalisé de façon concomitante par plusieurs laboratoires et montré une bonne concordance entre l'IHC et la FISH et des pratiques homogènes entre ces différents laboratoires. Une deuxième étude multicentrique française (sur 13 centres)⁽⁵⁾ a comparé les trois techniques IHC, FISH et RTqPCR sur 140 ALK FISH positifs et 400 négatifs. Les techniques IHC et FISH apparaissent peu discordantes (2,4 % de discordances et seulement 1,3 % si on fait abstraction des cas « *borderline* » avec une FISH entre 10 et 20 %). Cette étude montre des discordances centres dépendants. Les deux anticorps D5F3 et 4A5 sont assez équivalents, avec une sensibilité supérieure du D5F3 et une spécificité supérieure du 5A4. À noter aussi que la RT PCR est peu performante avec 36 % de faux négatifs. Une étude de type Contrôle Qualité⁽⁶⁾ réalisée dans 173 labos a comparé les images FISH et TMA FISH/IHC. Elle met en avant l'amélioration du rendement après une phase d'apprentissage dans les analyses IHC et FISH et lorsqu'un nombre important de noyaux sont analysés par FISH. Toutes ces études confirment par ailleurs les précédentes publications cliniques et montrent que les réarrangements du gène ALK surviennent préférentiellement chez les sujets non ou petits fumeurs, plus souvent des femmes et plus souvent chez des sujets un peu jeunes que les autres patients atteints de CBNPC.

Le bilan de l'INCa

L'année 2011 a été peu performante en ce qui concerne le nombre d'adénocarcinomes testés vis-à-vis du réarrangement de ALK sur les plateformes INCa (1 500 tests ALK par an en France) mais en 2013 la courbe rejoint celle des tests EGFR (23 336 tests EGFR et 18 660 tests ALK sachant que certains centres pratiquent le *testing* séquentiel de EGFR avant celui de ALK), démontrant que les patients du territoire sont bien pris en charge pour ce test. La recommandation proposée sous la forme d'un algorithme diagnostique (figure 3) est de screener les patients par l'IHC et de confirmer par FISH. Le problème essentiel reste celui des faux négatifs de l'IHC et de

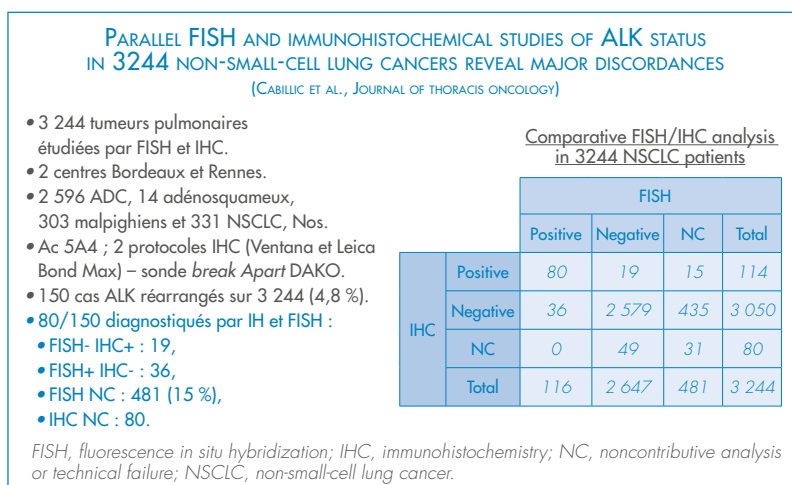


Figure 2 : Parallèle FISH et IHC.

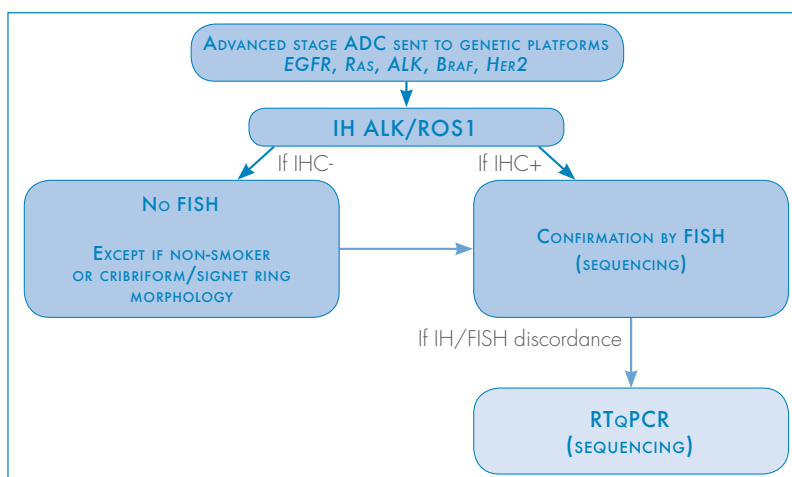


Figure 3 : Algorithme diagnostique.

faux positifs de FISH, d'où l'importance du dialogue avec le clinicien notamment pour les faux négatifs de l'IHC ; il attirera l'attention du biologiste/pathologiste sur le statut non-fumeur des patients potentiellement ALK positifs. Ne pas hésiter à recontrôler une technique par plusieurs anticorps éventuellement, et de recompter les FISH, et par plusieurs intervenants.

1. IASLC Atlas of ALK testing in lung cancer. Edited by MS Taso, FR Hirsch and Y Yatabe.
2. Camidge DR, Kono SA, Flacco A et al. Optimizing the detection of lung cancer patients harboring anaplastic lymphoma kinase (ALK) gene rearrangements potentially suitable for ALK inhibitor treatment. Clin Cancer Res 2010; 16: 5581-5590.
3. Cabilic F, Gros A, Dugay F et al. Parallel FISH and immunohistochemical studies of ALK status in 3244 non-small-cell lung cancers reveal major discordances. J Thorac Oncol 2014; 9: 295-306.
4. Cutz JC, Craddock KJ, Torlakovic E et al. Canadian anaplastic lymphoma kinase study: a model for multicenter standardization and optimization of ALK testing in lung cancer. J Thorac Oncol. 2014 Sep;9(9):1255-63.
5. S Lantuejoul, I Rouquette, H Blons et al. French multicentric validation of ALK rearrangement diagnostic in 547 lung adenocarcinomas. in press dans European Respiratory Journal.
6. Tembuysen L, Tack V, Zwaenepoel K et al. The relevance of external quality assessment for molecular testing for ALK positive non-small cell lung cancer: results from two pilot rounds show room for optimization. PLoS One. 2014 Nov 11;9(11):e112159.