

Thérapies ciblées : comment déterminer la cible?

Myriam Rimmelink, MD, PhD

Service d'Anatomie Pathologique, Bruxelles



- Le cancer du poumon est le responsable majeur du décès par cancer
- 1.4 millions de décès par an dans le monde
- 160000 morts par an aux USA
- 25 à 30% de tous les décès liés au cancer
- Soit plus que les 3 cancers les plus fréquents (colon, prostate et sein)

Mais

Avancées majeures dans la compréhension de la pathogénie du cancer du poumon surtout dans l'adénocarcinome

Avec les découvertes biologiques et thérapeutiques de l'importance des altérations génétiques

En particulier EGFR et ALK

Changement majeur dans la prise en charge

The Journal of Molecular Diagnostics, Vol. 15, No. 4, July 2013



See related Guest Editorial on page 413.

**the Journal of
Molecular
Diagnostics**

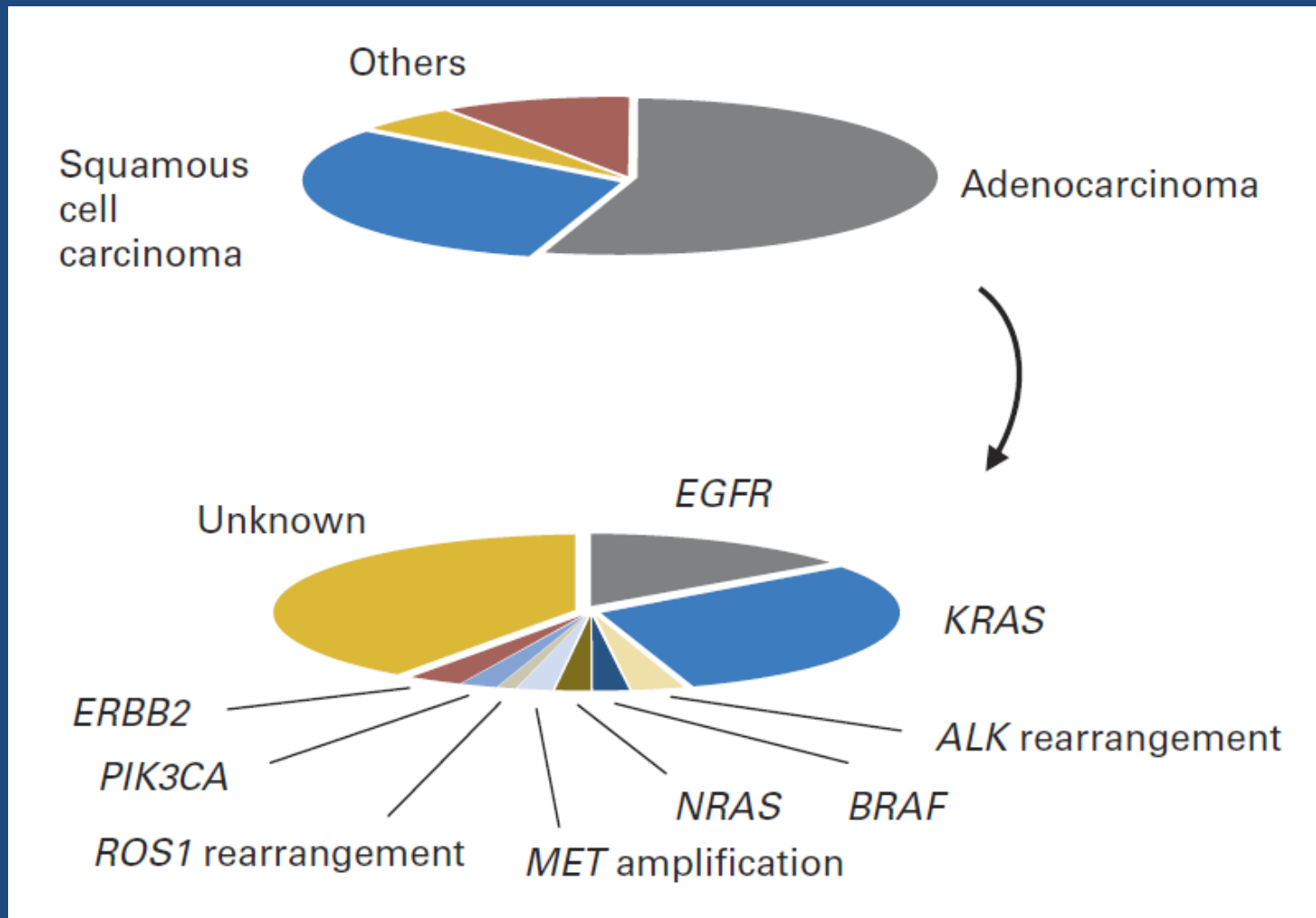
jmd.amjpathol.org

SPECIAL ARTICLE

Molecular Testing Guideline for Selection of Lung Cancer Patients for EGFR and ALK Tyrosine Kinase Inhibitors

Guideline from the College of American Pathologists, International Association for the Study of Lung Cancer, and Association for Molecular Pathology

Neal I. Lindeman,^{*} Philip T. Cagle,[†] Mary Beth Beasley,[‡] Dhananjay Arun Chitale,[§] Sanja Dacic,[¶] Giuseppe Giaccone,^{||} Robert Brian Jenkins,^{**} David J. Kwiatkowski,^{††} Juan-Sebastian Saldivar,^{‡‡} Jeremy Squire,^{§§} Erik Thunnissen,^{¶¶} and Marc Ladanyi^{||||}



Cancer: The Critical Role of Pathology in Personalized Health Care

Eric Walk, MD, FCAP



+



Anatomy/Morphology-Based Disease Classification



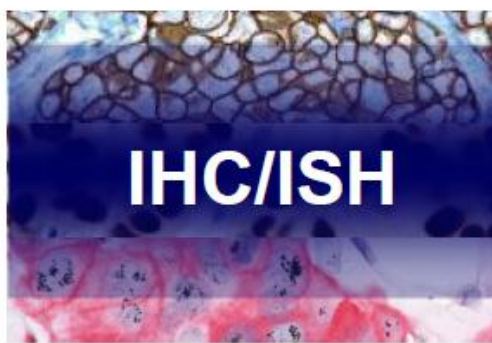
Neoplastic
- Malignant
- Benign
- "Borderline"



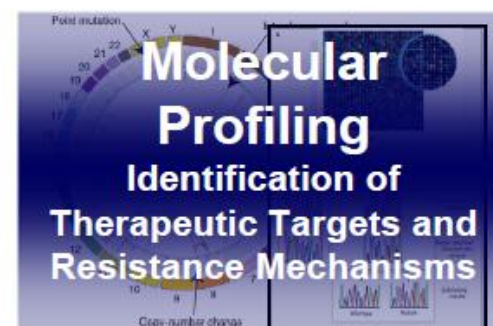
Non-Neoplastic
- Normal
- Physiologic
- Inflammatory



+



+



Clinically Relevant Information Guiding Tx

Diagnosis

- Malignant
- Benign
- "Borderline"

Prognosis

- Risk of recurrence
- Need for adjuvant tx

Therapy Prediction

- Response
- Resistance
- Rational combo tx



ELSEVIER

the **Journal of
Molecular
Diagnostics**

jmd.amjpathol.org

See related Guest Editorial on page 413.

SPECIAL ARTICLE

Molecular Testing Guideline for Selection of Lung Cancer Patients for EGFR and ALK Tyrosine Kinase Inhibitors

*Guideline from the College of American Pathologists,
International Association for the Study of Lung Cancer, and
Association for Molecular Pathology*

Neal I. Lindeman,^{*} Philip T. Cagle,[†] Mary Beth Beasley,[‡] Dhananjay Arun Chitale,[§] Sanja Dacic,[¶] Giuseppe Giaccone,^{||}
Robert Brian Jenkins,^{**} David J. Kwiatkowski,^{††} Juan-Sebastian Saldivar,^{‡‡} Jeremy Squire,^{§§} Erik Thunnissen,^{¶¶} and Marc Ladanyi^{||||}

1. Quand les tests de biologie moléculaire doivent ils être réalisés?
2. Comment tester EGFR?
3. Comment tester ALK?
4. Autres tests en routine?
5. Comment les tests de biologie moléculaires doivent ils être implémentés pour les adénocarcinomes?

Lindeman NI et al, The journal of Molecular Diagnostics, 2014

- **Le clinicien :**

- Informations cliniques
- Choix du site
- Cyto/ histo
- Fixation



- **Le pathologiste**

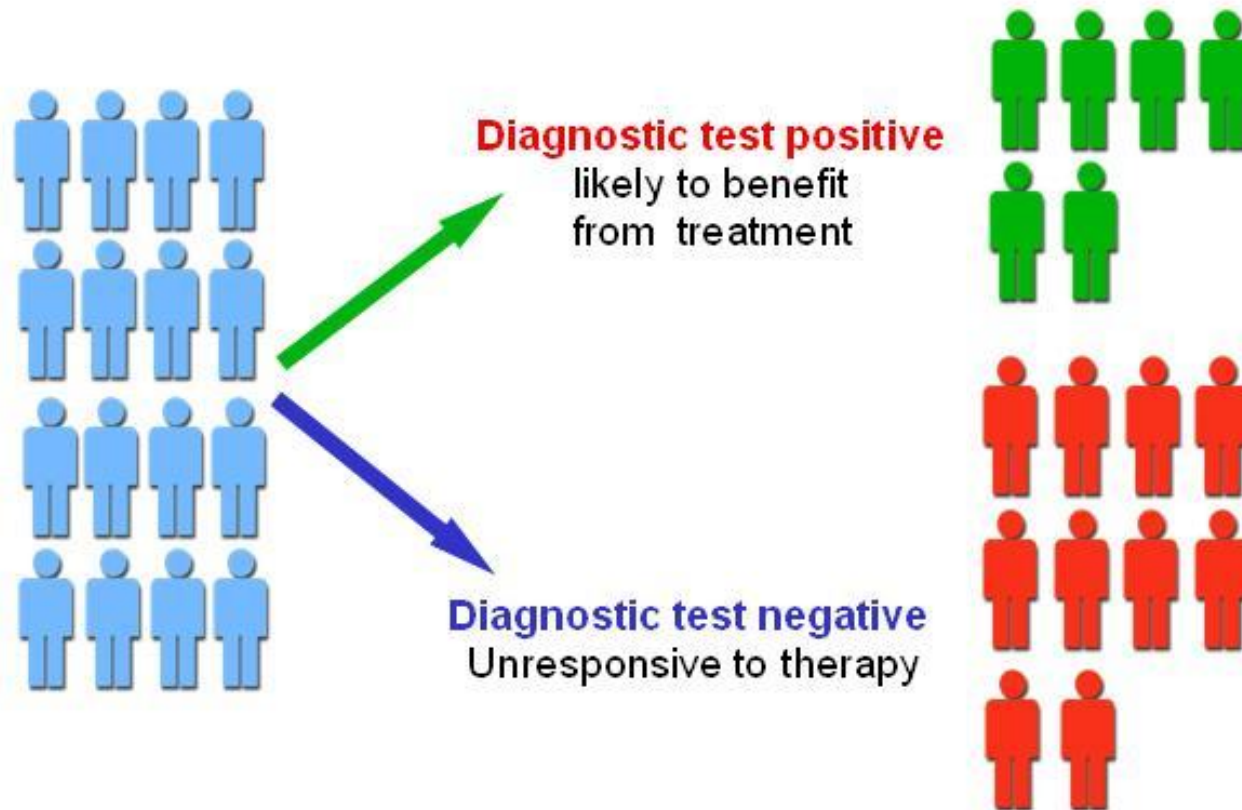
- Diagnostic
- Qualité du prélèvement
- Technique
 - Biologiste moléculaire, technologue



Equipe pluridisciplinaire

Is **My** cancer different?™

Personalised medicine: future vision



The right drug at the right dose to the right patient at the right time

- Quel patient?
 - Critères cliniques? Histologiques?
- Quel type de matériel?
 - Cyto/histo ?
 - Primitif vs métastase ?
 - Quid si plusieurs primitifs?



- Caractéristiques cliniques : AUCUNE
- Les mutations EGFR sont plus fréquentes chez les femmes, non fumeurs, origine asiatique

Am J Clin Pathol 2012;138:332-346

Table 6 Clinicopathologic Characteristics in Relation to *EGFR* Mutation Status in Studies Containing Primarily Non-Asian Patients

	<i>EGFR</i> mutation prevalence, %	<i>EGFR</i> mutation positive	<i>EGFR</i> mutation negative	n (N)
Sex				
Female*	28	859	2239	19 (3098)
Male*	18	397	1768	19 (2165)
Smoking				
Never†	45	666	805	18 (1471)
Ever†	15	569	3154	18 (3723)
History of smoking, pack-years				
0–10‡	39	18	28	1 (46)
11–50‡	8	7	86	1 (93)
>50§	5	3	56	1 (59)
Histology				
Adenocarcinoma§	24	1266	3918	19 (5184)
Squamous¶	5	6	104	9 (110)
Adenosquamous	13	1	7	2 (8)
Large cell**	5	2	37	6 (39)

Table 7 Clinicopathologic Characteristics in Relation to *ALK* Rearrangement Status

	<i>ALK</i> rearrangement prevalence, %	<i>ALK</i> rearrangement positive	<i>ALK</i> rearrangement negative	n (N)
Age with cutoff, years				
≤65 ²⁰	6	13	210	1 (223)
>65 ²⁰	3	6	224	1 (230)
Sex				
Females ^{11,12,15,20}	5	28	579	4 (607)
Males ^{11,12,15,20}	4	30	738	4 (768)
Smoking				
Never ^{11,15,20}	8	30	331	3 (361)
Ever ^{11,15,20}	3	20	652	3 (672)
Ethnicity				
Asian/Pacific ^{11,12,14}	5	35	654	3 (689)
White ^{12,15}	4	22	474	2 (496)
Histology				
Adenocarcinoma ^{9,11,12,15,16,19,20}	5	67	1319	7 (1386)
Squamous ^{9,11,12,16,19,20}	0.2	1	522	6 (523)
Adenosquamous ^{11,12,19}	0	0	19	3 (19)
Differentiation				
Well ¹¹	1	1	97	1 (98)
Not well ¹¹	6	10	145	1 (155)

Most studies contained primarily patients with adenocarcinoma.

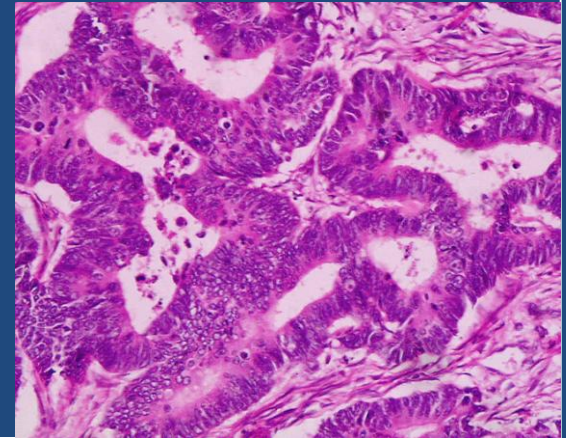
n, number of studies; N, number of patients.

La présence d'une translocation de ALK est plus fréquente chez les jeunes non fumeurs

7 octobre 2014

Lindeman NI et al, *The Journal of Molecular Diagnostics*, 2013

- Adénocarcinomes (TOUS les sous types)
- Carcinomes mixte avec une composante adénocarcinome
- Exclus :
 - Absence de composante adénocarcinome
 - Ex : SCC purs,
 - SCLC pur,
 - LCC sans composante ADC en IHC



- **Attention si matériel quantitativement limité (biopsie, cytologie)**
- **La composante ADC ne peut être exclue**
- **Les tests peuvent être réalisés même si SCC OU SCLC**
- **Chez un patient jeune, non fumeur**

Erik Thunnissen^{a,*}, Keith M. Kerr^b, Felix J.F. Herth^c, Sylvie Lantuejoul^d, Mauro Papotti^e, Robert C. Rintoul^f, Giulio Rossi^g, Birgit G. Skov^h, Birgit Weynandⁱ, Lukas Bubendorf^j, Grünberg Katrien^a, Leif Johansson^k, Fernando López-Ríos^l, Vincent Ninane^m, Włodzimierz Olszewskiⁿ, Helmut Popper^o, Saulea Jaume^p, Philipp Schnabel^q, Luc Thiberville^r, Florian Laenger^s

Immunohistochemistry flow chart NSCLC

HE	Squamous cell carcinoma		NOS		Adenocarcinoma	
↓ Additional stain	P63 +	TTF1 - Mucin -	P63 -	TTF1 - Mucin -	P63 -	TTF1 + and/or Mucin +
↓ Diagnosis	Squamous cell carcinoma		NOS/ AdSq		Adenocarcinoma	
			↓		↓	
			Mutation analysis EGFR/KRAS			

Fig. 2. Diagnostic algorithm for immunohistochemical support in NSCLC diagnosis.

The challenge of NSCLC diagnosis and predictive analysis on small samples.

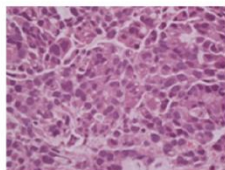
Practical approach of a working group[☆]

Erik Thunnissen^{a,*}, Keith M. Kerr^b, Felix J.F. Herth^c, Sylvie Lantuejoul^d, Mauro Papotti^e, Robert C. Rintoul^f, Giulio Rossi^g, Birgit G. Skov^h, Birgit Weynandⁱ, Lukas Bubendorf^j, Grünberg Katrien^a, Leif Johansson^k, Fernando López-Ríos^l, Vincent Ninane^m, Włodzimierz Olszewskiⁿ, Helmut Popper^o, Saulea Jaume^p, Philipp Schnabel^q, Luc Thiberville^r, Florian Laenger^s

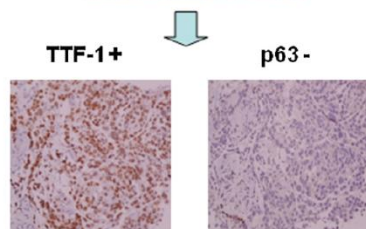
E. Thunnissen et al. / Lung Cancer 76 (2012) 1–18

NSCLC, nos

Level 1

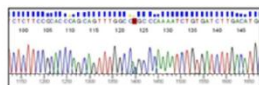


Level 2

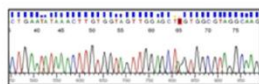
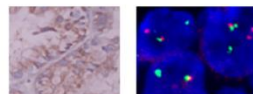


NSCLC, favor adenocarcinoma

Level 3

EGFR mutational analysis
(KRAS, optional)EGFR mut
L858R

Wild-type

KRAS mut
G12CALK rearrangement (IHC/FISH)
ALK+If negative, further tests
(BRAF, HER2)

5. Predictive testing

Attention à l'épargne tissulaire!!!

Erik Thunnissen^{a,*}, Keith M. Kerr^b, Felix J.F. Herth^c, Sylvie Lantuejoul^d, Mauro Papotti^e, Robert C. Rintoul^f, Giulio Rossi^g, Birgit G. Skov^h, Birgit Weynandⁱ, Lukas Bubendorf^j, Grünberg Katrien^a, Leif Johansson^k, Fernando López-Ríos^l, Vincent Ninane^m, Włodzimierz Olszewskiⁿ, Helmut Popper^o, Sauleda Jaume^p, Philipp Schnabel^q, Luc Thiberville^r, Florian Laenger^s

3. Pathology strategy

La meilleure stratégie pour prendre en charge des prélèvements de petite taille pour des cas suspectés de cancer du poumon est basé sur des informations cliniques

Table 1

Five items with essential clinical information for pathology diagnosis.

Sample site(s)
Whether the clinical suspicion is on primary tumour/metastasis
Question diagnosis? If appropriate: also predictive test(s)?
Previous relevant surgical, oncological, radiotherapeutic treatment, if any
Smoking history (never, ex (pack years, years since quitting), current smoker (pack years, years of smoking)

Ces informations sont utiles pour le pathologiste pour

- 1/ déterminer les priorités dans l'approche diagnostique
- 2/ déterminer si un diagnostic spécifique est requis,
- 3/ prévoir les investigations nécessaires et anticiper l'utilisation d'IHC et des tests de biologie moléculaires,
- 4/ prévenir l'utilisation inutile de tissu pour des tests qui ne sont pas requis ou intéressants étant donné la clinique .

The challenge of NSCLC diagnosis and predictive analysis on small samples.

Practical approach of a working group[☆]

Erik Thunnissen^{a,*}, Keith M. Kerr^b, Felix J.F. Herth^c, Sylvie Lantuejoul^d, Mauro Papotti^e, Robert C. Rintoul^f, Giulio Rossi^g, Birgit G. Skov^h, Birgit Weynandⁱ, Lukas Bubendorf^j, Grünberg Katrien^a, Leif Johansson^k, Fernando López-Ríos^l, Vincent Ninane^m, Włodzimierz Olszewskiⁿ, Helmut Popper^o, Sauleda Jaume^p, Philipp Schnabel^q, Luc Thiberville^r, Florian Laenger^s

3. Pathology strategy

LUNG CANCER diagnostic / predictive steps

Cancer in the lung: primary vs metastases



Primary lung cancer: NSCLC – SCLC
Staging M+



NSCLC: adenocarcinoma vs squamous cell carcinoma



Adenocarcinoma KRAS / EGFR mutation
negative: ALK
BRAF?/ NRAF?
PI3KCA?

Squamous cell carcinoma FGFR1?
DDR2?
PI3KCA?

L'histoire clinique est essentielle pour envisager si la tumeur pourrait être métastatique

L'exclusion d'une origine métastatique est une perte de temps, de tissus et de ressources du laboratoire

Il ne faut pas faire de « reflex testing » pour faire un diagnostic différentiel entre une tumeur primitive et une métastase sans informations cliniques pertinentes

Fig. 1. Schematic approach to lung cancer workup for diagnosis and prediction.

Type de matériel : primitif vs métastase?

1.4: Recommendation

To determine *EGFR* and *ALK* status for initial treatment selection, primary tumors or metastatic lesions are equally suitable for testing.

Table 10 Summary of Studies of the Concordance of *EGFR* Mutations in Primary Versus Metastatic Tumors in the Same Patient

Metastatic lesions	Primary tumor	
	<i>EGFR</i> +	<i>EGFR</i> –
<i>EGFR</i> +	108	6
<i>EGFR</i> –	11	183

Discordance rare, signification clinique incertaine (prob technique ds ganglion)
Le choix doit être basé sur la qualité (richesse tumorale)

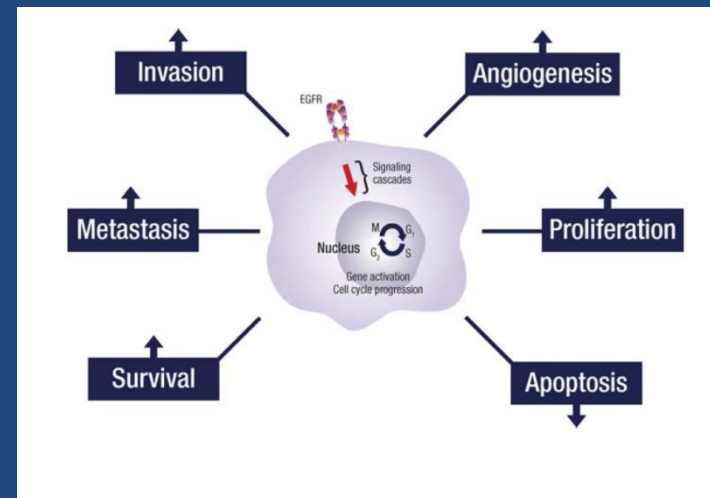
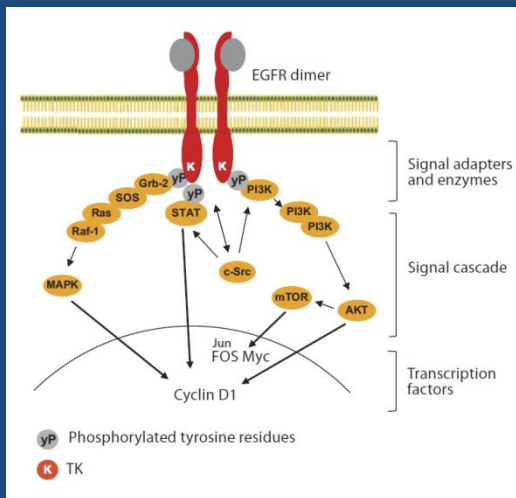
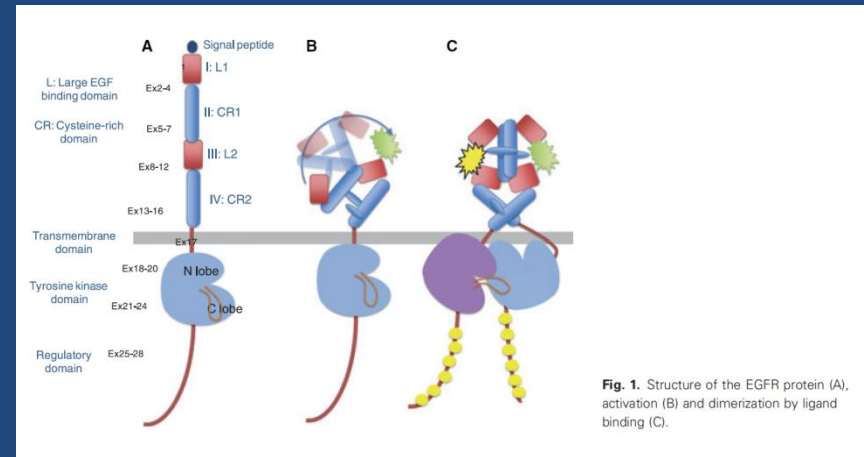
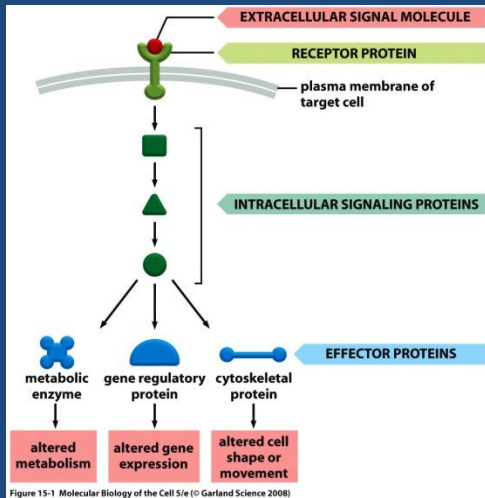
Type de matériel : primitif vs métastase?

- Un patient présentant de multiples tumeurs primitives
- Chaque tumeur doit être testée
- Il ne faut pas par contre tester différentes zones d'une même tumeur

- Au moment du diagnostic pour les stades IV
- Au moment de la progression / récurrence pour les autres stades
- Ou au moment du diagnostic en fonction des décisions locales

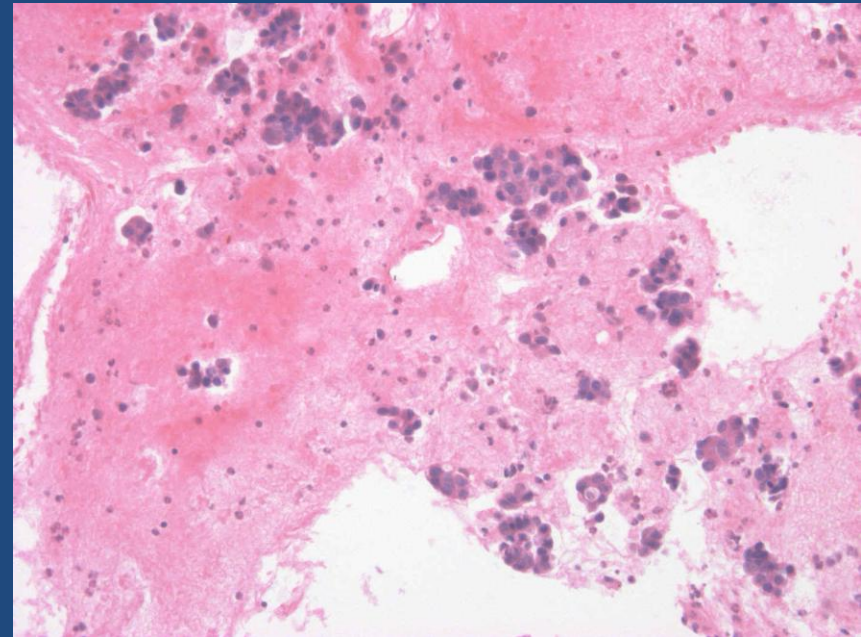
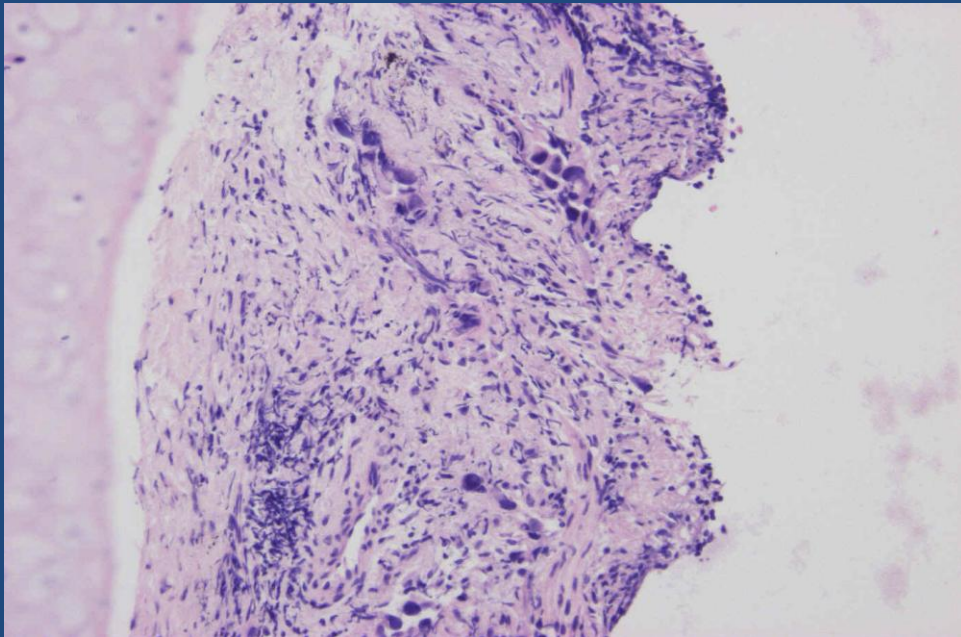
- Les résultats EGFR et ALK doivent être obtenus endéans les 15 j post arrivée du prélèvement au laboratoire de biologie moléculaire (10 jours ouvrables)

EGFR epidermal growth factor receptor



Mutations in exons 18-21 of the EGFR gene, coding for the receptor's internal TK domain, activate the receptor independently of extracellular ligand binding and are referred to as « activating mutations »

- Type de matériel :
 - Fixé au formol (10%) et enrobé dans la paraffine (FFEP)
 - Frais
 - Fixation à l'alcool
 - PAS de décalcifiant, ni Bouin
- Cytologie (bloc tissulaire)/ Histologie
- Temps de fixation 6 à 48 h
- POURCENTAGE EN CELLULES TUMORALES



- Avantage de la cytologie : possibilité de réaliser, dans une tumeur donnée, des prélèvements sériés au cours du temps.
- But :
 - évaluer l'efficacité de la thérapie ciblée via la caractérisation moléculaire
 - Identifier des « genetic shifts » d'ADC mutants au cours du traitement Tki (T790M)

QUANTITÉ DE MATÉRIEL TUMORAL

- Avant les analyses de biologie moléculaire, le contenu en cellules tumorales de l'échantillon doit être déterminé afin d'évaluer la fiabilité du résultat .
- Crucial : ratio entre le nombre de cellules malignes par rapport aux cellules normales.
- Détermination du pourcentage en cellules tumorales (cellularité)
→ dissection manuelle (microdissection?)

- Un échantillon doit contenir de 200 à 400 cellules tumorales
-
- Rarement atteint en routine!!!
- 50% de cellules tumorales mais des résultats peuvent être obtenus avec 10 à 20 % de cellules tumorales

REVIEW

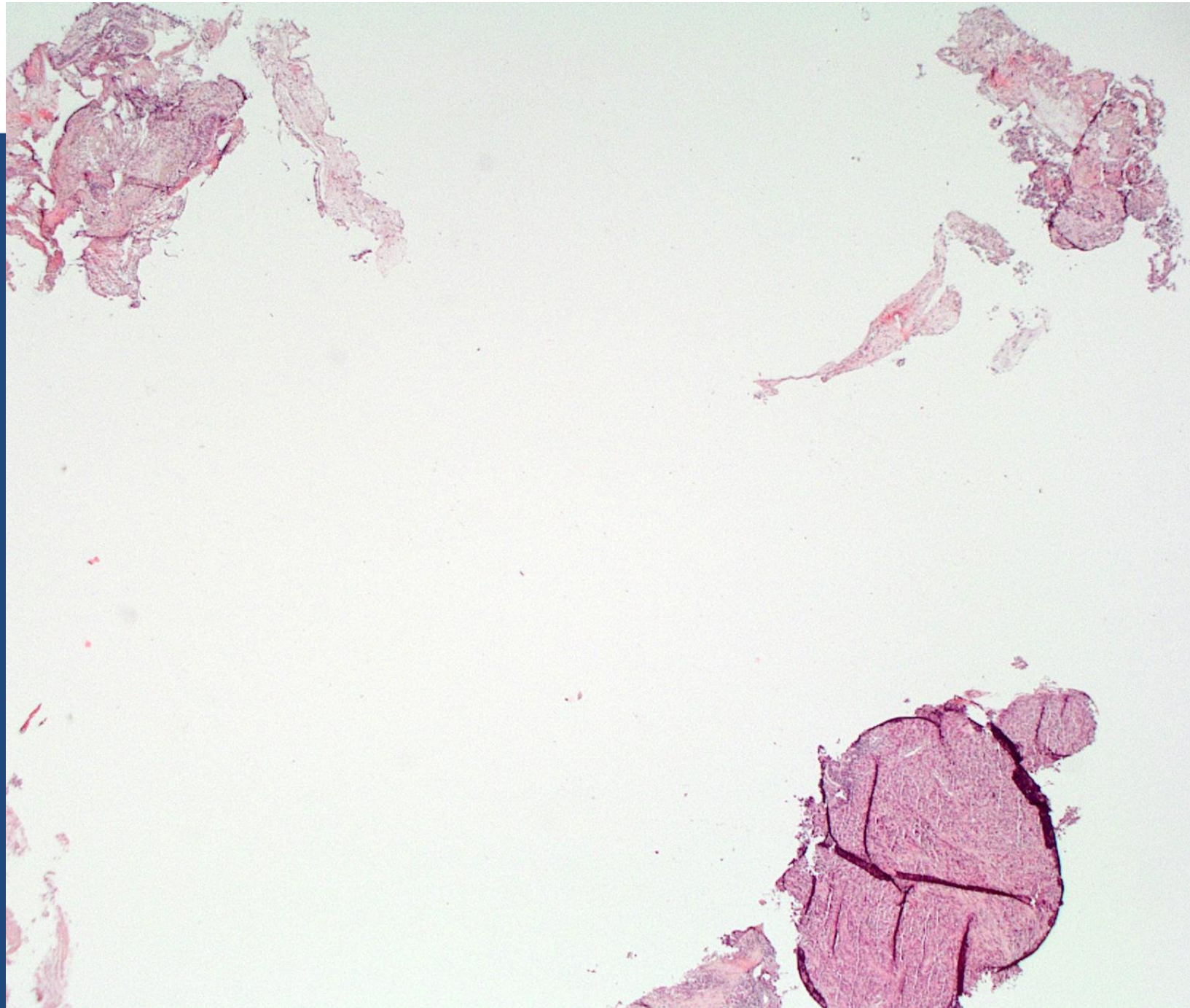
Personalized medicine for lung cancer: new challenges for pathology

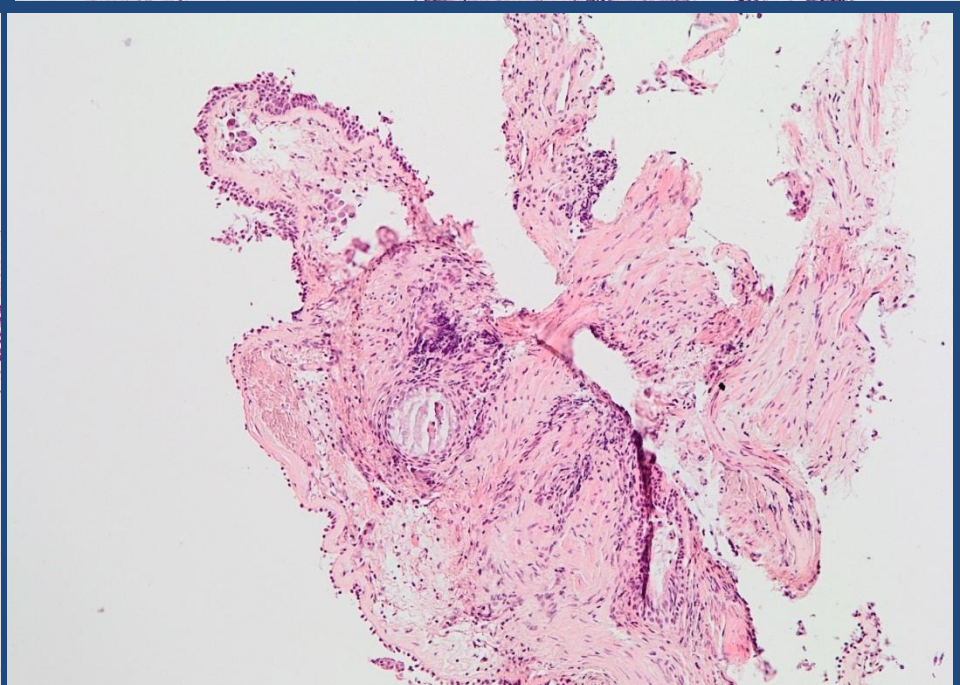
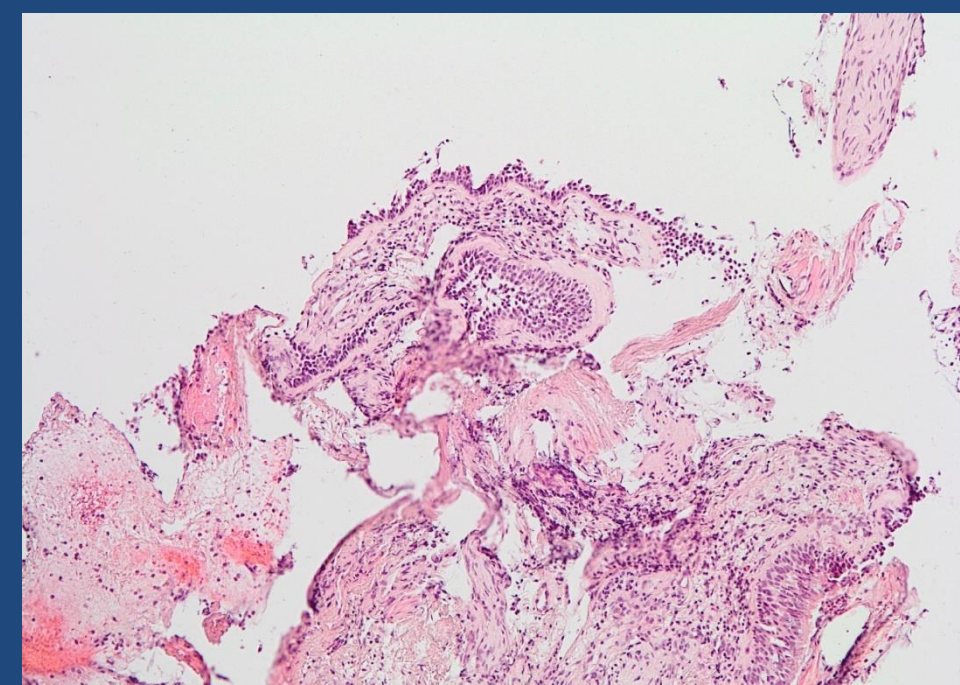
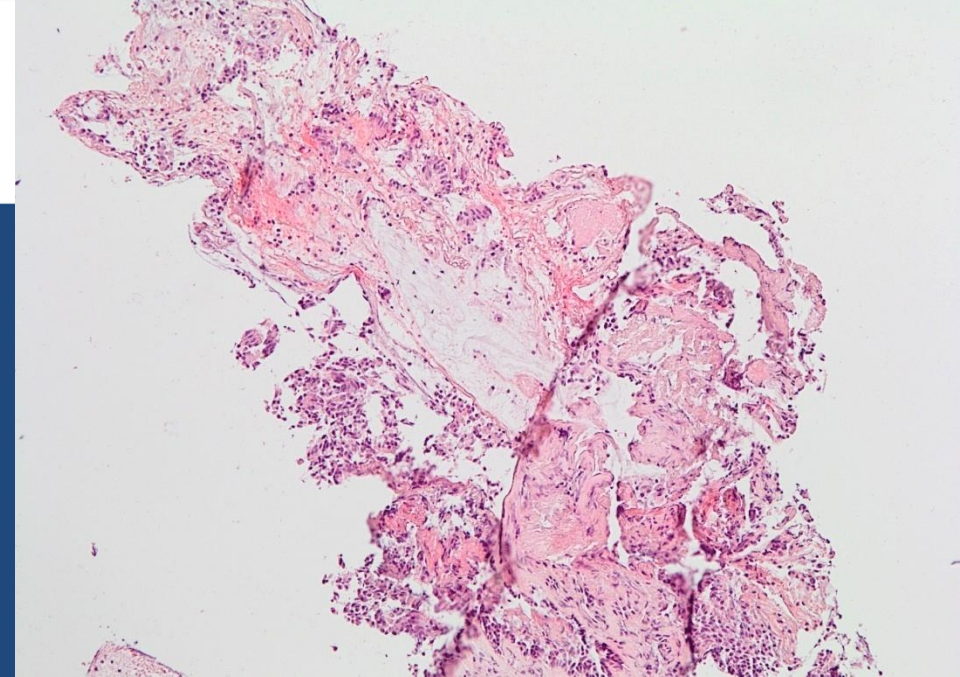
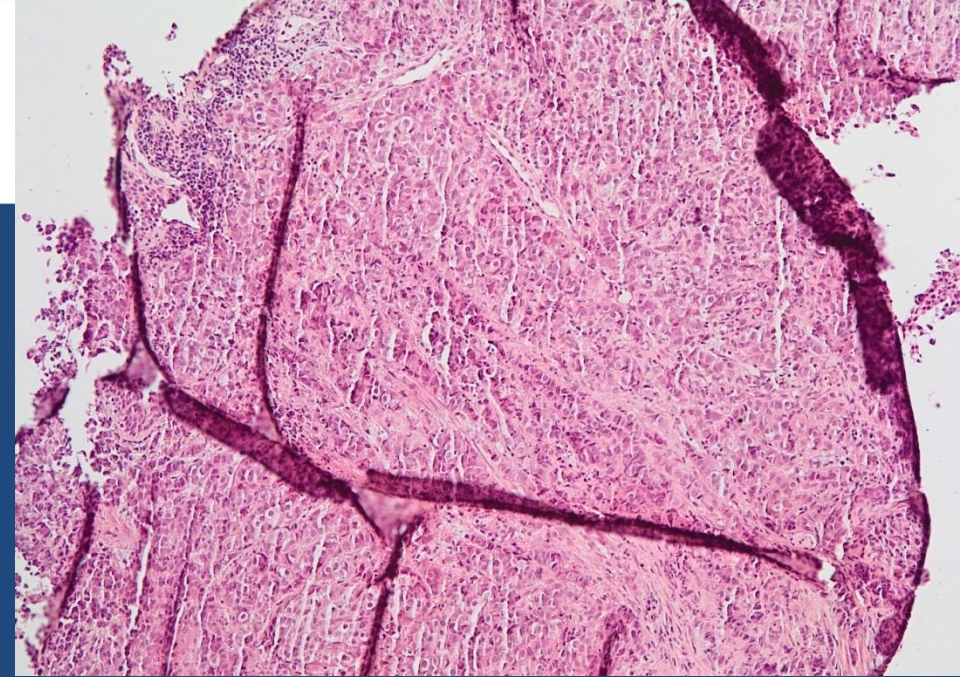
Keith M Kerr

Aberdeen University Medical School, Aberdeen Royal Infirmary, Foresterhill, Aberdeen, UK

- Le pourcentage moyen de tumeur présent dans les biopsies bronchiques est d'un peu plus que 20% quand un diagnostic de SCC ou ADC est diagnostiqué, mais de 10% pour les cas de NSCLC-NOS
- Il n'y a pas de tumeur dans 1/3 à 1/2 des tissus prélevés par bronchoscopie pour malignité

36. Coghlin CL, Smith LJ, Bakar S *et al.* Quantitative analysis of tumor in bronchial biopsy specimens. *J. Thorac. Oncol.* 2010; **5**: 448–452.





Consensus for *EGFR* Mutation Testing in Non-small Cell Lung Cancer

Results from a European Workshop

Robert Pirker, MD,* Felix J. F. Herth, MD, PhD, FCCP,† Keith M. Kerr, MD, FRCPath,‡
 Martin Filipits, PhD,* Miquel Taron, PhD,§|| David Gandara, MD,¶|| Fred R. Hirsch, MD,#
 Dominique Grunenwald, MD,** Helmut Popper, MD,†† Egbert Smit, MD, PhD,‡‡
 Manfred Dietel, MD,§§ Antonio Marchetti, MD, PhD,|||| Christian Manegold, MD,¶¶
 Peter Schirmacher, MD,## Michael Thomas, MD, PhD,† Rafael Rosell, MD, PhD,§||
 Federico Cappuzzo, MD,*** and Rolf Stahel, MD†††; on Behalf of the European *EGFR* Workshop Group

Which Biopsy Techniques Should Be Used to Ensure High-Quality Tissue Samples and What Volume of Sample Is Needed?

TABLE 1. Biopsy Techniques

	21-g Needle Aspiration	19-g Needle Aspiration	Transbronchial Biopsy	CT-Guided Needle Biopsy
Total no. of cells per biopsy/ aspiration	≥100	≥150	≥300	≥500
No. of biopsies	4	4	4–5	2–3

Pre-preparation for molecular analysis

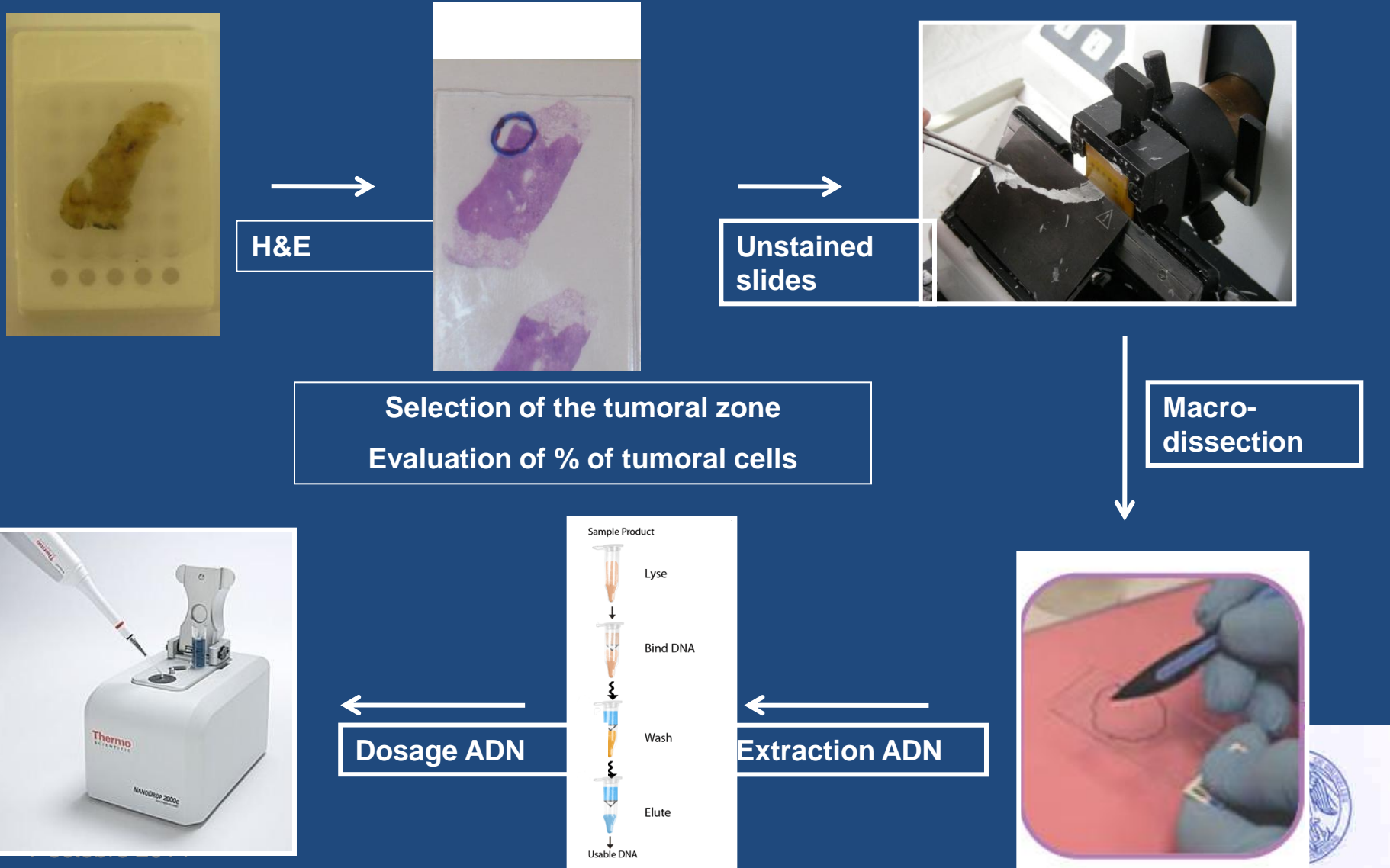


Table 11 Comparison of Sanger Sequencing to Other Methods for the Detection of *EGFR* Mutations

Sanger sequencing versus other methods	Concordance of methods, %	n (N)	Seq-/ other+	Seq+/ other-	Incidence of <i>EGFR</i> mutations, %		RR (95% CI)	P value
					Sanger sequencing	Other method		
PCR-based mutation detection								
Allele-specific PCR/ARMS ¹³⁰	73	1 (83)	18	4	16	33	0.48 (0.27–0.87)	0.01
Real-time PCR ^{119,304}	97	2 (102)	2	1	26	27	0.94 (0.60–1.46)	0.78
Cycleave PCR ^{131,*}	95	1 (195)	1	8	40	36	1.10 (0.85–1.41)	0.47
Post-PCR mutation detection								
Capillary electrophoresis ^{296,304}	98	2 (61)	1	0	16	18	0.91 (0.42–2.01)	0.82
Restriction fragment length polymorphism ¹³³	99	1 (109)	1	0	33	34	0.97 (0.67–1.41)	0.89
INVADER ^{305,†}	86	1 (42)	5	1	43	52	0.82 (0.52–1.29)	0.39
Pyrosequencing ^{159,306}	96	3 (140)	6	0	16	20	0.78 (0.49–1.25)	0.30
Mutation scanning								
Denaturing HPLC ^{139,307}	94	2 (196)	12	0	20	27	0.66 (0.27–1.63)	0.37
Single-stranded conformational polymorphism ⁴⁵	98	1 (375)	8	0	8	10	0.79 (0.51–1.25)	0.32
High-resolution melting analysis ^{121,135,308}	83	3 (321)	54	0	36	53	0.70 (0.46–1.06)	0.09
Loop-hybrid mobility shift assay ³⁰⁹	100	1 (43)	0	0	26	26	1.00 (0.49–2.06)	>0.99
Mutant enrichment								
Peptide nucleic acid/locked nucleic acid amplification ^{301,310}	96	2 (150)	4	2	11	12	0.91 (0.49–1.67)	0.75
COLD PCR ¹³⁸	100	1 (126)	0	0	10	10	1.00 (0.48–2.07)	>0.99
Smart Amplification Process ^{120,132,301}	86	4 (220)	30	0	20	34	0.58 (0.44–0.77)	<0.001

The variation in *EGFR* mutation rate between rows may reflect studies performed in different patient populations (Asian versus non-Asian). No statistical comparisons were performed between rows.

*Cycleave (Takara Bio, Otsu, Shiga, Japan).

†Invader (Hologic, Madison, Wisconsin).

ARMS, amplification refractory mutation system; CI, confidence interval; COLD, coamplification at low denaturation temperature; HPLC, high-performance liquid chromatography; n, number of studies; N, number of patients; PCR, polymerase chain reaction; RR, relative risk, Mantel-Haenszel random effects model, (95% CI); Seq-, negative by Sanger sequencing; Seq+, positive by Sanger sequencing.

Détection dans des échantillons avec au moins 50% de cellules tumorales

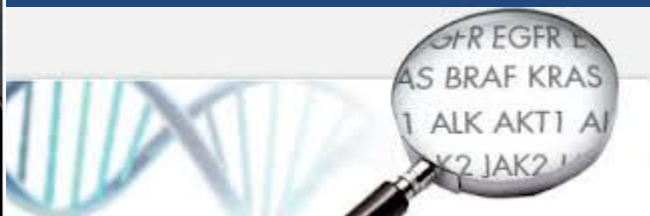
Contrôles interlaboratoires

Pas d'IHC
Pas FISH

NEXT GENERATION SEQUENCING



<i>ABL1</i>	<i>EZH2</i>	<i>JAK3</i>	<i>PTEN</i>
<i>AKT1</i>	<i>FBXW7</i>	<i>IDH2</i>	<i>PTPN11</i>
<i>ALK</i>	<i>FGFR1</i>	<i>KDR</i>	<i>RB1</i>
<i>APC</i>	<i>FGFR2</i>	<i>KIT</i>	<i>RET</i>
<i>ATM</i>	<i>FGFR3</i>	<i>KRAS</i>	<i>SMAD4</i>
<i>BRAF</i>	<i>FLT3</i>	<i>MET</i>	<i>SMARCB1</i>
<i>CDH1</i>	<i>GNA11</i>	<i>MLH1</i>	<i>SMO</i>
<i>CDKN2A</i>	<i>GNAS</i>	<i>MPL</i>	<i>SRC</i>
<i>CSF1R</i>	<i>GNAQ</i>	<i>NOTCH1</i>	<i>STK11</i>
<i>CTNNB1</i>	<i>HNF1A</i>	<i>NPM1</i>	<i>TP53</i>
<i>EGFR</i>	<i>HRAS</i>	<i>NRAS</i>	<i>VHL</i>
<i>ERBB2</i>	<i>IDH1</i>	<i>PDGFRA</i>	
<i>ERBB4</i>	<i>JAK2</i>	<i>PIK3CA</i>	



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

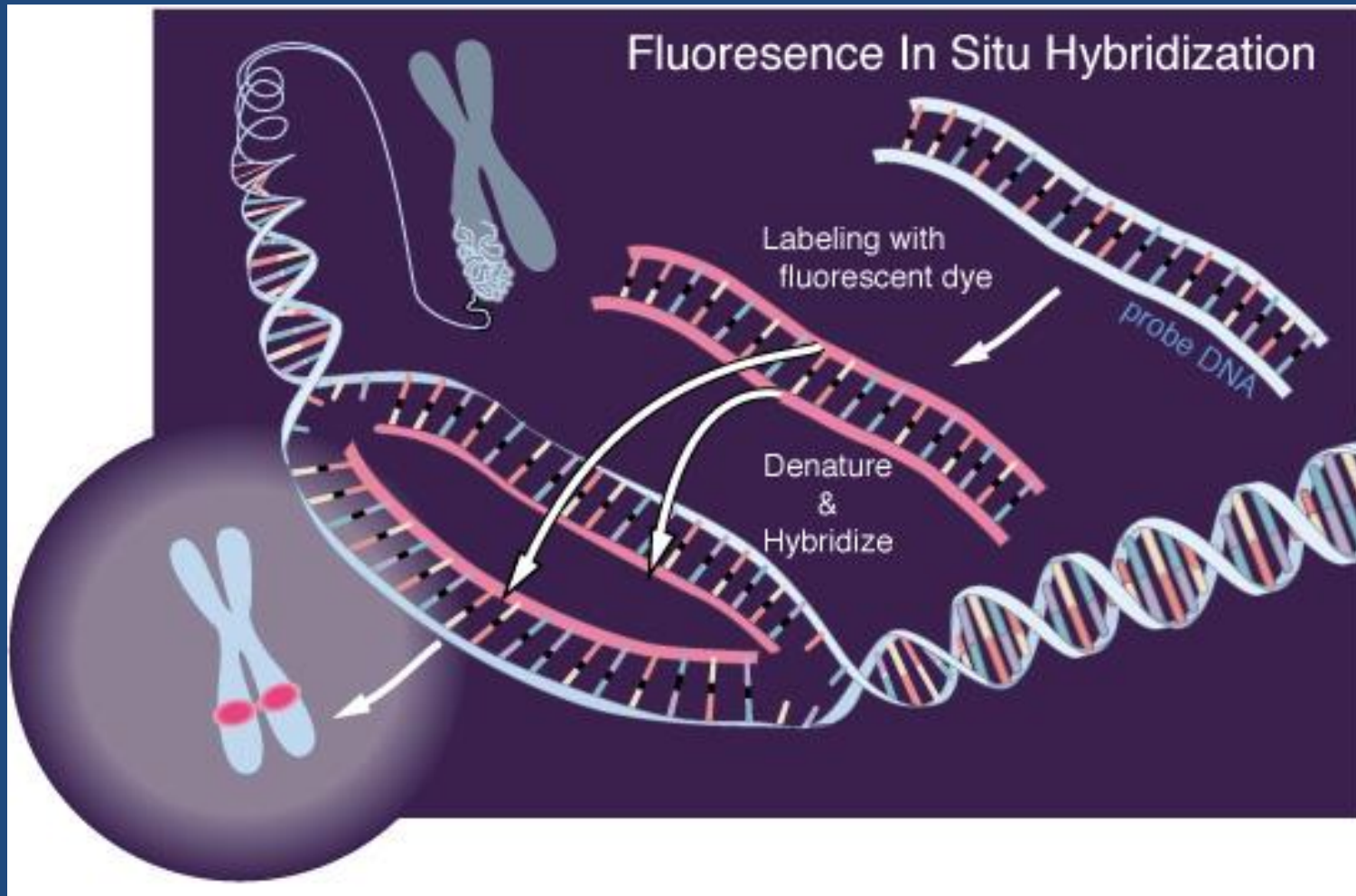
Erik Thunnissen • Lukas Bubendorf • Manfred Dietel •
Göran Elmberger • Keith Kerr • Fernando Lopez-Rios •
Holger Moch • Włodzimierz Olszewski •
Patrick Pauwels • Frédérique Penault-Llorca •
Giulio Rossi

Tests de détection du réarrangement de ALK :

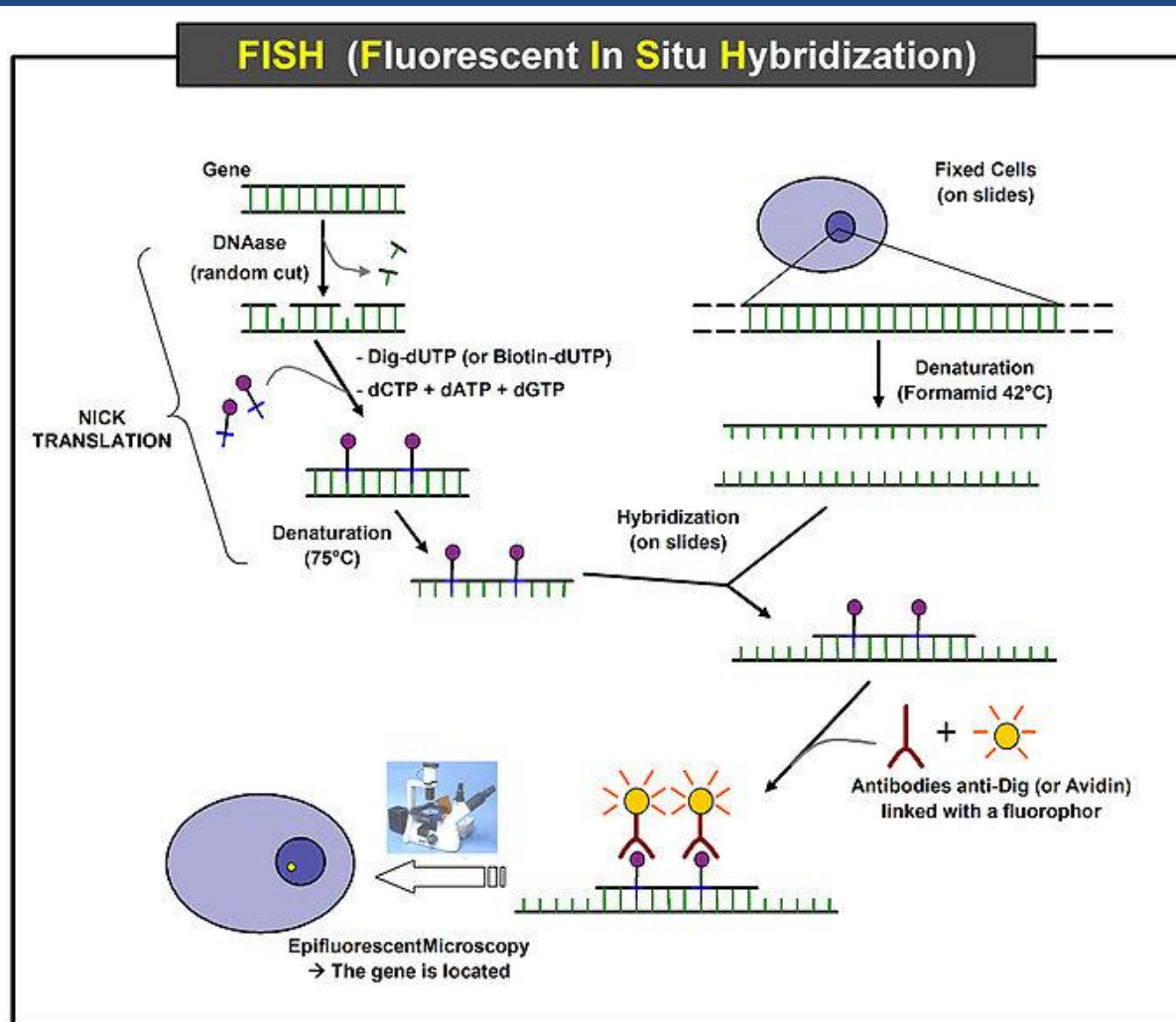
Immunohistochimie;

Fluorescence in situ (FISH)

Reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR)



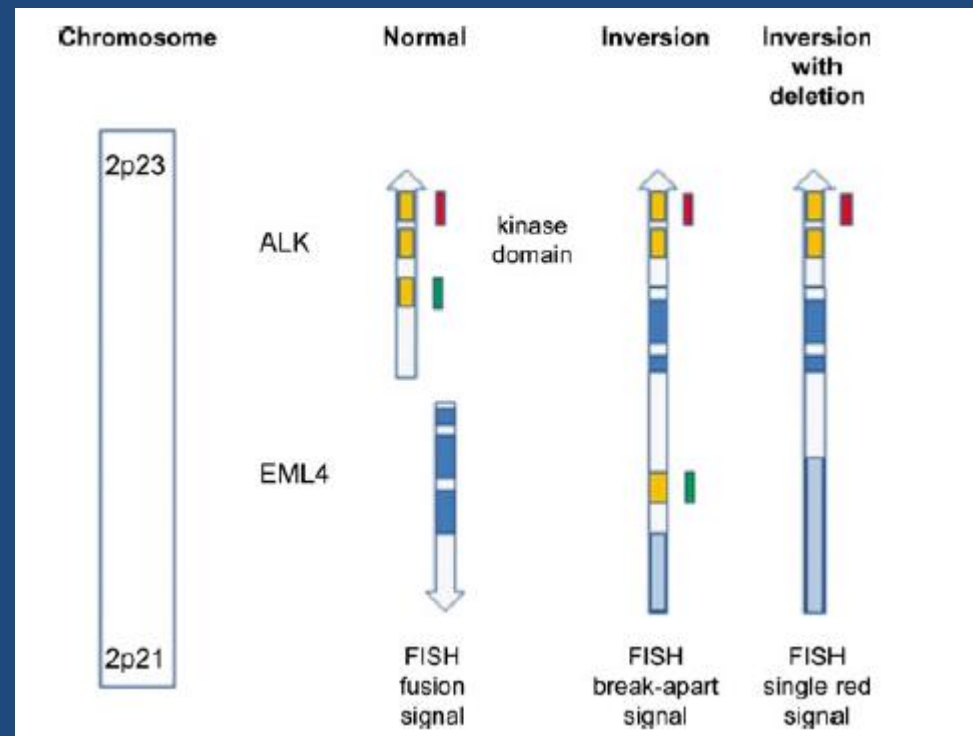
FISH: Principle



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

Erik Thunnissen • Lukas Bubendorf • Manfred Dietel •
Göran Elmberger • Keith Kerr • Fernando Lopez-Rios •
Holger Moch • Włodzimierz Olszewski •
Patrick Pauwels • Frédérique Penault-Llorca •
Giulio Rossi

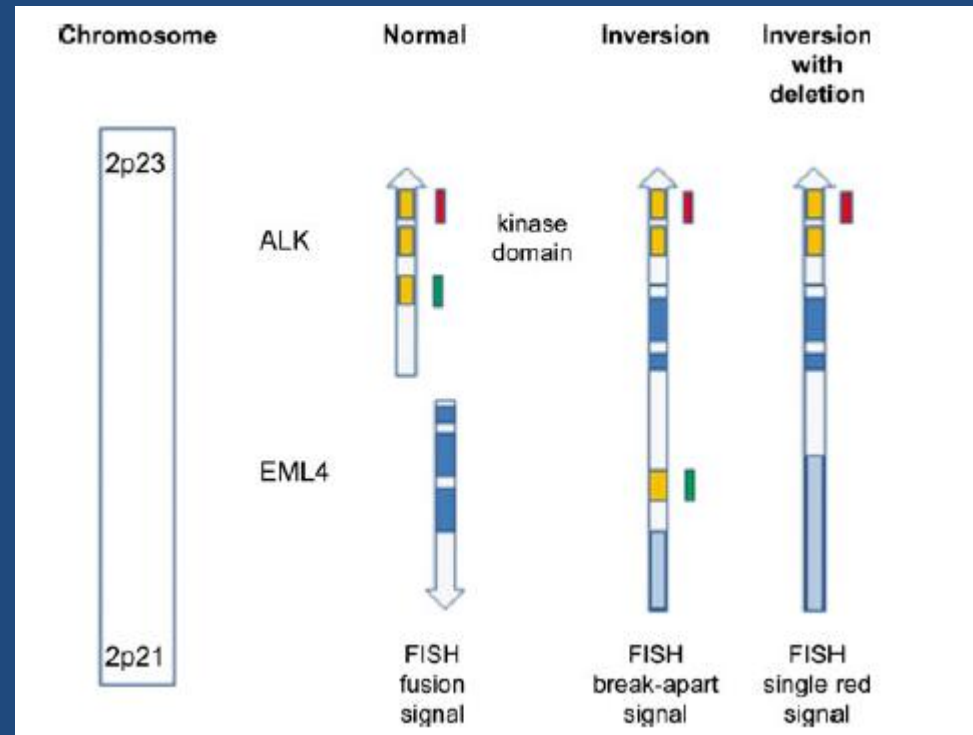
- Signal pattern Vysis ALK Break Apart FISH Kit
- Les 2 sondes sont proches sur le gène ALK
- Si translocation : les 2 sondes sont séparées et distantes
- Si deletion de 5' de ALK : un signal orange seul

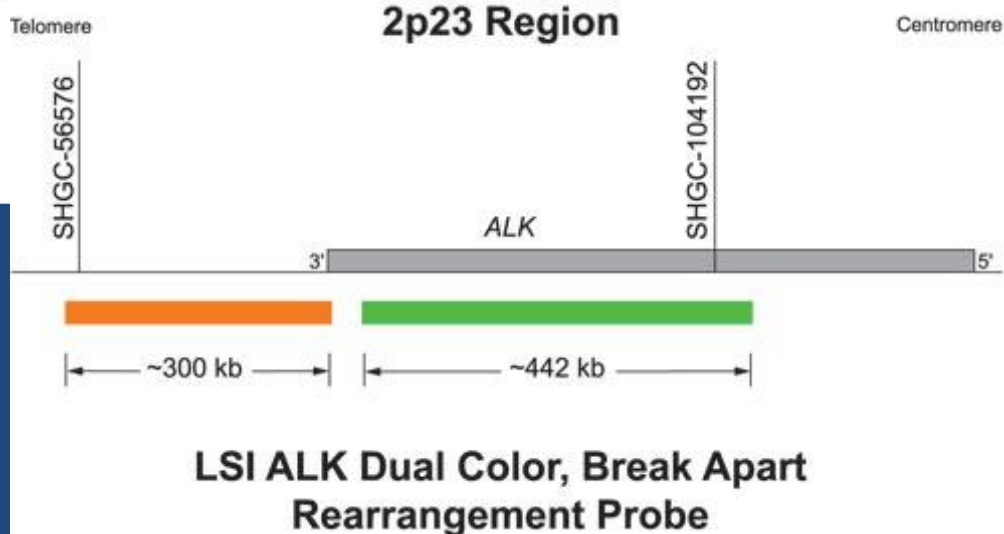


EML4-ALK testing in non-small cell carcinomas of the lung: a review with recommendations

Erik Thunnissen • Lukas Bubendorf • Manfred Dietel •
Göran Elmberger • Keith Kerr • Fernando Lopez-Rios •
Holger Moch • Włodzimierz Olszewski •
Patrick Pauwels • Frédérique Penault-Llorca •
Giulio Rossi

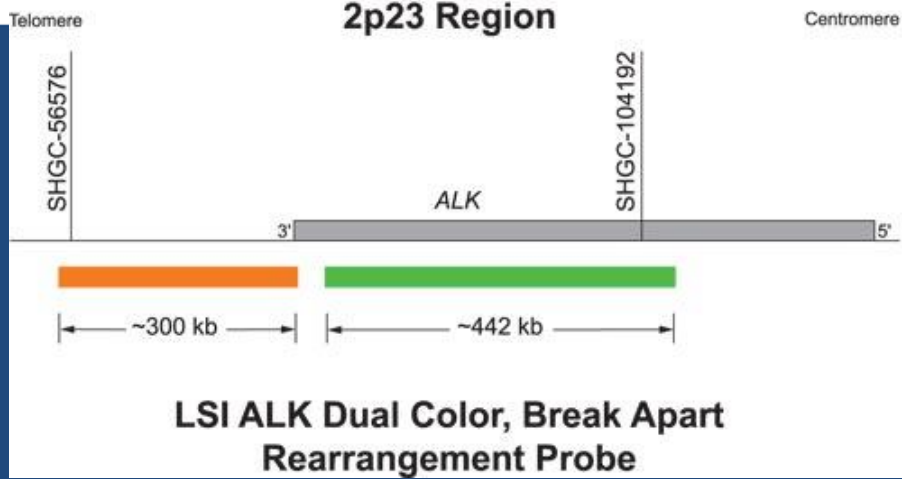
- Une inversion du bras court du chromosome 2 produit une fusion du gène ALK et du gène EML4.
- Ce réarrangement produit une protéine avec une activité kinase activatrice constitutive
- Il y a une dizaine de variants





- Translocation si
 - >15% des cellules tumorales (**50 cellules**) avec split pattern : orange et vert séparés > 2 diamètre des signaux
 - Narrow split signal peuvent être vus en l'absence de réarrangement de ALK
 - Perte signaux verts (données limitées quant au cuttoff → à déterminer selon les laboratoires) (...) selon les études cutoffs de 15%

Détection réarrangement ALK : FISH

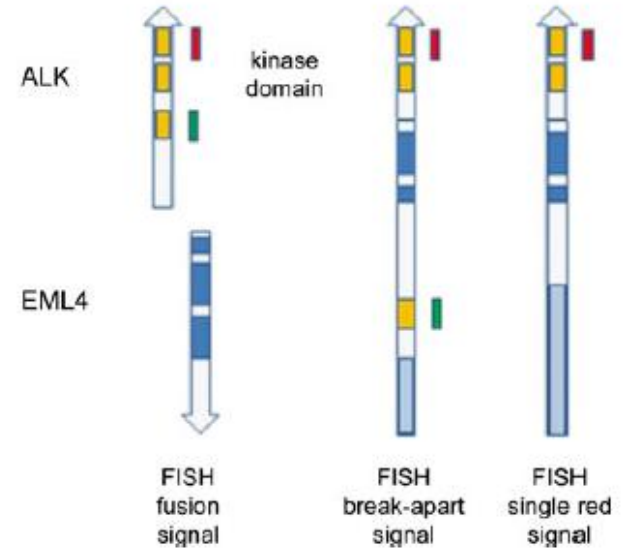


Chromosome

Normal

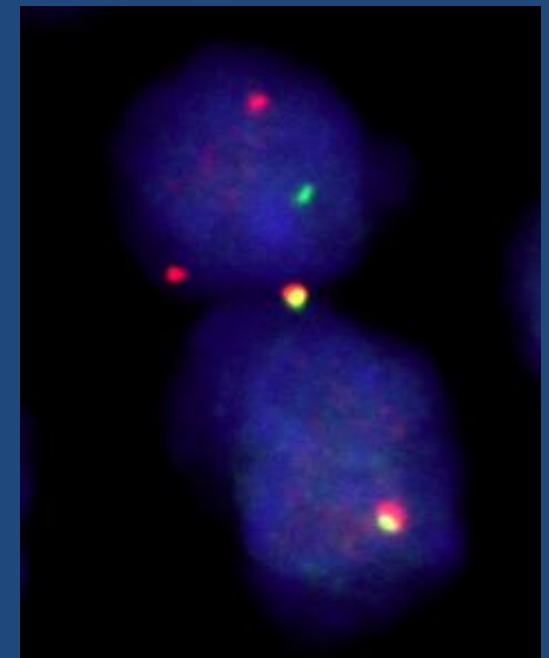
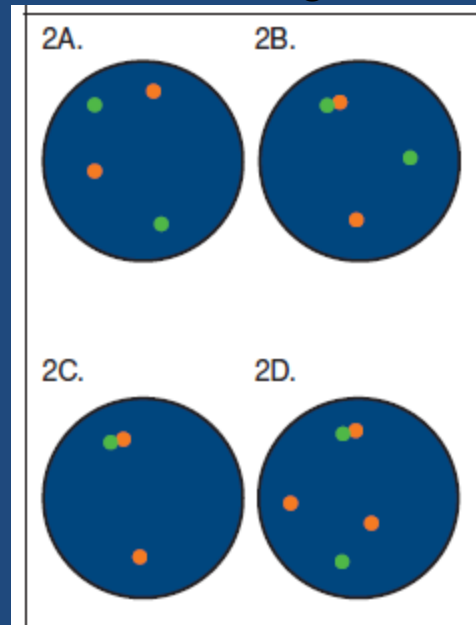
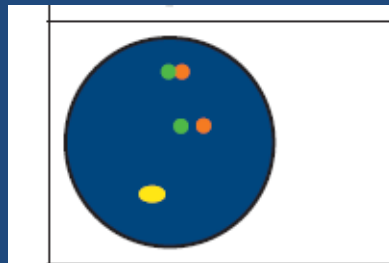
Inversion

Inversion with deletion



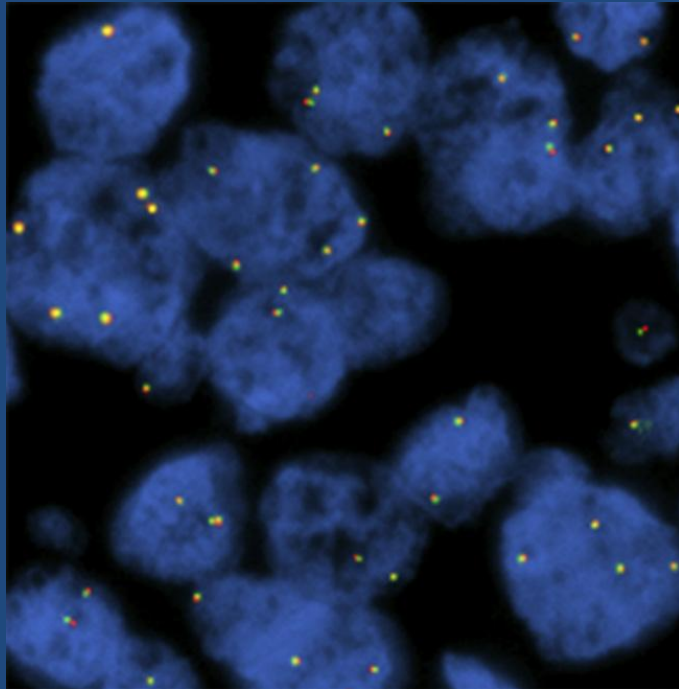
Réarrangement

Normal

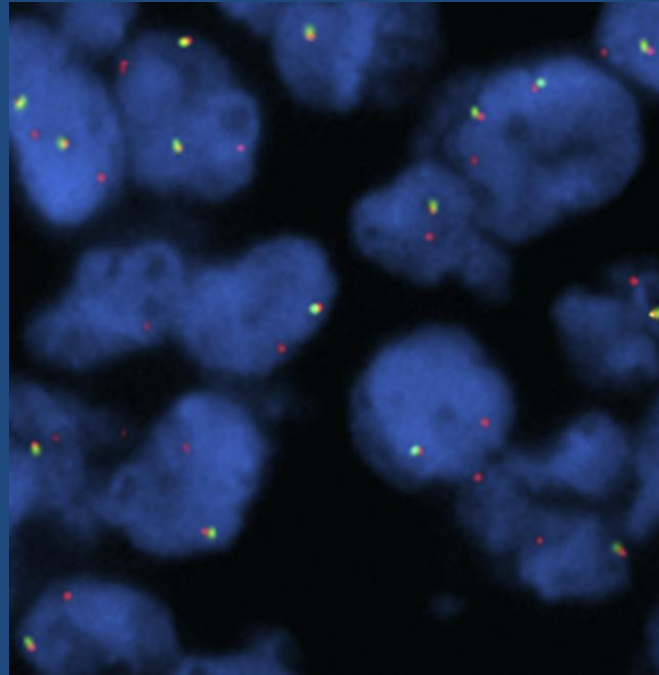


7 octobre 2014

Exemples de FISH ALK



pas de réarrangement



réarrangement

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

Erik Thunnissen • Lukas Bubendorf • Manfred Dietel •
Göran Elmberger • Keith Kerr • Fernando Lopez-Rios •
Holger Moch • Włodzimierz Olszewski •
Patrick Pauwels • Frédérique Penault-Llorca •
Giulio Rossi

Test validé cliniquement :

Vysis/Abbott ALK FISH break apart

scoring par 2 personnes avec un training dans l'analyse FISH dans les tumeurs solides et guidées par un pathologistes avec un training en FISH

Positif : >25% de cellules positives

Négatif : <10%

Entre les deux : deuxième lecture : il faut en moyenne 15% de cellules positives

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

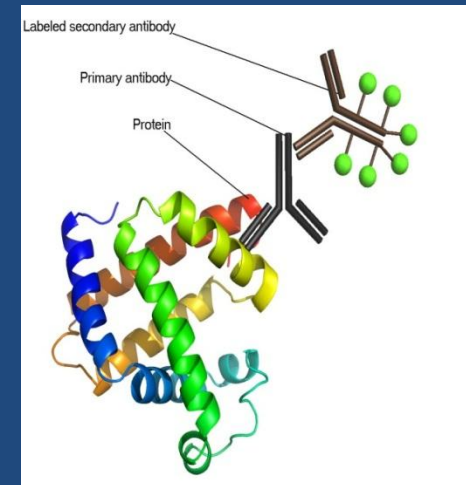
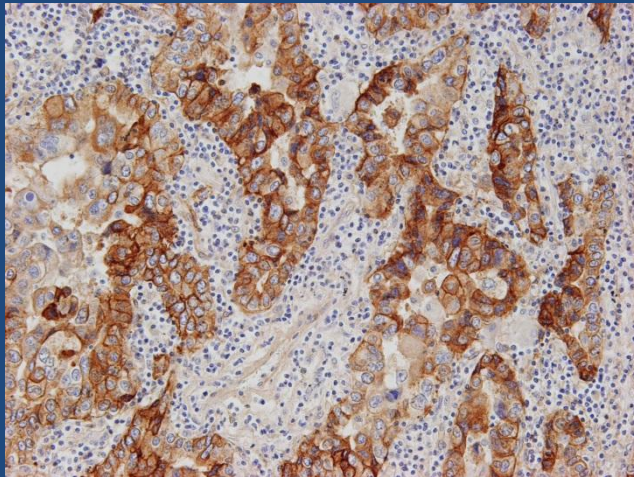
Erik Thunnissen • Lukas Bubendorf • Manfred Dietel •
Göran Elmberger • Keith Kerr • Fernando Lopez-Rios •
Holger Moch • Włodzimierz Olszewski •
Patrick Pauwels • Frédérique Penault-Llorca •
Giulio Rossi

Interprétation difficile !!!

1. La fusion- inversion se passe sur le même chromosome;
2. Dans certains noyaux wild type : on peut avoir une séparation discrète des signaux rouge et vert;
3. Faux positif lors de la coupe

Il faut un entraînement spécifique et de l'expérience pour une interprétation correcte (cette technique doit être effectuée par un nombre limité de personnes au sein du laboratoire afin d'éviter des écarts d'interprétation)

- Le but est la détection de protéines
- Celle-ci est détectée par une réaction colorimétrique via un anticorps



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

Erik Thunnissen • Lukas Bubendorf • Manfred Dietel •

Interviendrait pour le screening

Mise en évidence de la tyrosine kinase qui est la cible du crizotinib

Avantages :

- Peu couteux,
- Rapide,
- Facilement intégré dans un compte rendu,
- Commun à tous les laboratoires d'anatomie pathologique.

Difficultés :

- Préparation du tissu,
- Choix de l'anticorps,
- Système de scoring.

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

Erik Thunnissen • Lukas Bubendorf • Manfred Dietel •

- Phase analytique :
- La concentration en protéine ALK est basse
- 3 anticorps publiés
- Attention différent que celui utilisé pour les lymphomes

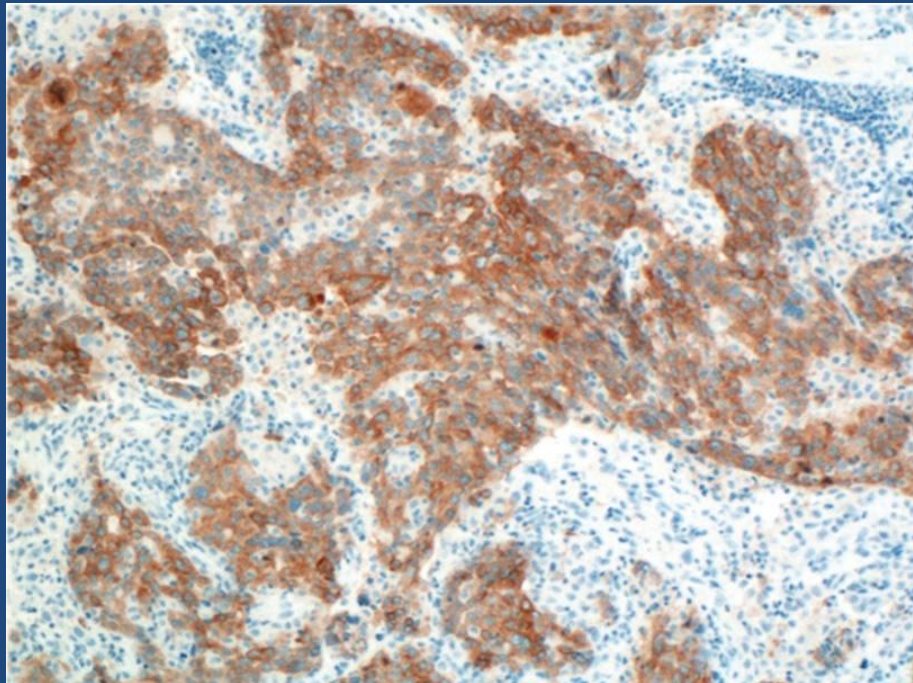
Clone 5A4 (Novocastra, 1/25)

ALK1 (Dako)

D5F3 (Cell Signalling Technology)

Haute VPN, haute VPP

- *Takeuchi K, et al(2009) Clin Cancer Res; Rodig SJ, et al(2009) Clin Cancer Res Yang P, et al(2012) J Thorac Oncol ; Boland JM, et al (2009) Hum Pathol ; Hofman P, et al (2011) Ann Oncol. . Yi ES, et al(2011) . J Thorac Oncol; Paik JH, et al(2011) J Thorac Oncol ; McLeer-Florin A, et al (2012) J Thorac Oncol ; Mino-Kenudson M, et al(2010)*



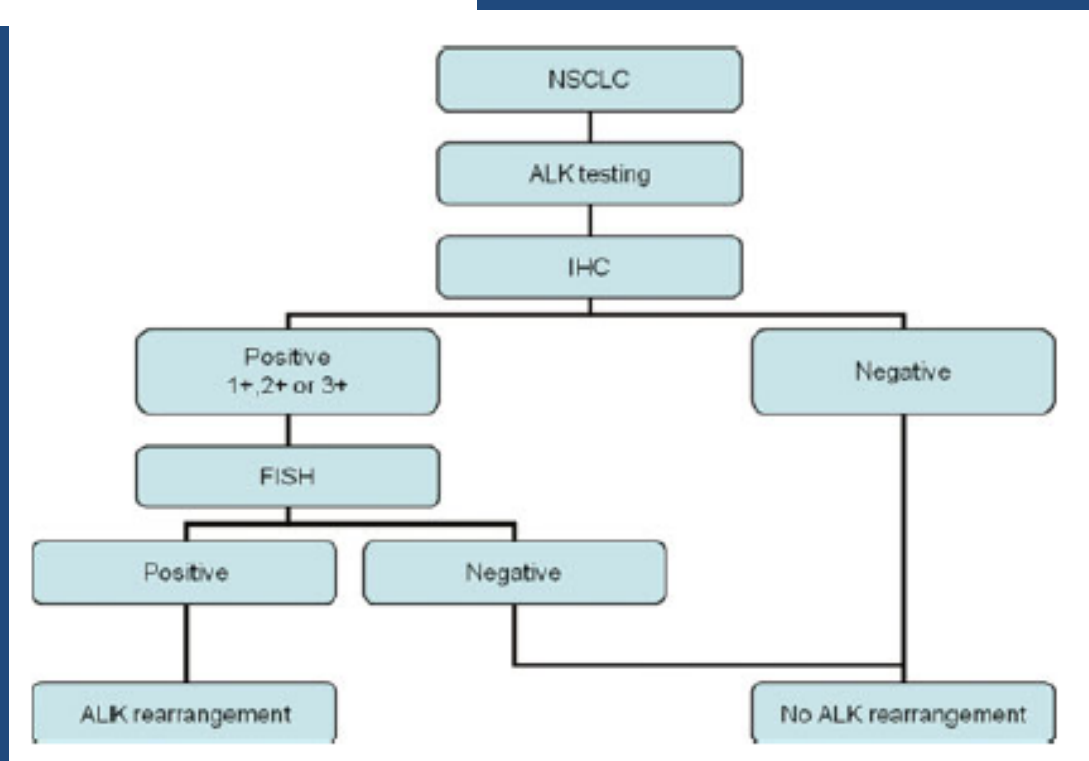
EML4-ALK testing in non-small cell carcinomas of the lung: a review with recommendations

Erik Thunnissen • Lukas Bubendorf • Manfred Dietel •

- Très bonne concordance entre FISH et IHC
- *Takeuchi K, et al(2009) Clin Cancer Res; Rodig SJ, et al(2009) Clin Cancer Res Yang P, et al 2012) J Thorac Oncol ; Boland JM, et al (2009) Hum Pathol ; Hofman P, et al (2011) Ann Oncol. . Yi ES, et al(2011) . J Thorac Oncol; Paik JH, et al(2011) J Thorac Oncol ; McLeer-Florin A, et al (2012) J Thorac Oncol ; Mino-Kenudson M, et al(2010)*

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

Erik Thunnissen • Lukas Bubendorf • Manfred Dietel •
Göran Elmberger • Keith Kerr • Fernando Lopez-Rios •
Holger Moch • Włodzimierz Olszewski •
Patrick Pauwels • Frédérique Penault-Llorca •
Giulio Rossi



Her2	PCR	Trastuzumab Afanitb
BRAF	PCR	Vemurafinib
RET	FISH	Vandenatib
ROS 1	FISH / IHC	Crizotinib
DDR2 (scc)	séquençage	
KRAS	PCR	Contre utilisation TKI
PIK3CA	PCR	
FGFR1(scc)	FISH	
MET	IHC , QPCR	

Gene	Alteration	Frequency in NSCLC
AKT1	Mutation	1%
ALK	Rearrangement	3–7%
BRAF	Mutation	1–3%
DDR2	Mutation	~4%
EGFR	Mutation	10–35%
FGFR1	Amplification	20%
HER2	Mutation	2–4%
KRAS	Mutation	15–25%
MEK1	Mutation	1%
MET*	Amplification	2–4%
NRAS	Mutation	1%
PIK3CA	Mutation	1–3%
PTEN	Mutation	4–8%
RET	Rearrangement	1%
ROS1*	Rearrangement	1%

Table 1. Frequency of mutations and availability of targeted therapies

Key:

Drugs approved in NSCLC.

Drugs approved in NSCLC but for other molecular subtype.

Drugs approved in other cancer.

Drugs in clinical development.

- Tout adénocarcinome même si une limité à une composante
- Autre histologie si jeune , non fumeur et matériel limité
- Cyto/Histo
- Méta/primitif
- Stade IV, progression (autres à discuter en local)
- EGFR (PCR)
- Si wild type IHC ALK
- Si positif FISH

Equipe pluridisciplinaire





MERCI