



Recommandations pour le testing ALK dans les CBNPC

Recommandations émises par la SFP et l'AFAQAP - avis d'experts sollicités : Martine Antoine, CHU de Paris-Tenon, Marie-Pierre Chenard, CHU de Strasbourg, Nicolas Piton et Jean-Christophe Sabourin, CHU de Rouen.

Avant-propos

Contexte

Le cancer bronchique est la première cause de décès par cancer en France, avec environ 30 000 décès par an. La survie à 5 ans est de l'ordre de 15% tous stades confondus (1). Les CBNPC (carcinomes bronchiques non à petites cellules) représentent 85% des cancers pulmonaires (2). La découverte d'anomalies moléculaires dans ces tumeurs, plus fréquentes dans les adénocarcinomes, conduit à prescrire des thérapies ciblées sur ces anomalies et permet d'améliorer la survie.

Après la description en 2007 du réarrangement du gène *ALK* (3), l'usage de la thérapie anti-ALK (crizotinib) a montré un bénéfice en survie globale et en survie sans récurrence pour les patients dont la tumeur exprime cette anomalie (4), comparée aux chimiothérapies classiques. La fréquence de cette anomalie moléculaire est estimée à 5% (5). La détermination du statut ALK (mise en évidence de la translocation au niveau génique ou d'une surexpression protéique) est un enjeu majeur pour le pathologiste et le clinicien lors du diagnostic de CBNPC.

Aux États-Unis, l'AMM du crizotinib reposait initialement sur un test d'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH) positif. En France, la prescription du médicament nécessite un test « positif » (sans mention à un test spécifique) et l'immunohistochimie (IHC) est une bonne alternative à la technique FISH.

Testing ALK

Deux techniques sont utilisées en France dans les structures d'Anatomie et Cytologie Pathologiques (ACP) pour déterminer le statut ALK : l'IHC qui détecte la surexpression de la protéine sous forme d'un marquage cytoplasmique granuleux et la FISH qui met en évidence le réarrangement intra-chromosomique du gène *ALK*.

L'IHC est une technique simple, rapide et peu coûteuse. Elle est utilisée en première intention et a pour avantage d'être interprétable même quand la cellularité tumorale est minime. Sa validité dépend toutefois de la qualité du pré-analytique, du choix de l'anticorps primaire, de la technique de détection et de l'utilisation d'un témoin positif.

Jusqu'ici, la FISH était utilisée pour la validation des tests IHC positifs et plusieurs études ont montré la bonne concordance entre ces deux tests (6). Nécessitant un équipement et une expertise spécifiques, elle

est de ce fait réservée à un nombre limité de structures d'ACP. Le temps technique et de lecture rallonge en outre le délai de prescription des traitements.

Il existe plusieurs anticorps anti-ALK. Tous ne sont pas adaptés au screening des cancers du poumon où le taux d'expression protéique est faible. L'utilisation du clone ALK1 (ou SP8) est ainsi à proscrire dans cette indication. Les clones 5A4 et D5F3 sont validés dans la littérature et sont utilisables sur toutes les plateformes. Néanmoins, l'obtention de protocoles « maison » optimaux nécessite des adaptations au cas par cas et est souvent facilitée par l'adjonction d'un système d'amplification. L'utilisation du clone D5F3 avec le kit de détection Optiview® et le kit d'amplification Optiview® (kit Ventana® IVD) donne accès à un test entièrement automatisé, mais est réservée aux structures équipées d'une plateforme Ventana®. Ce test très sensible, classé IVD (*in vitro diagnostic*), permet une évaluation binaire reproductible de la coloration (statut positif ou négatif). Dans les cas positifs, avec les clones D5F3 et 5A4, le marquage est habituellement observé dans la grande majorité ou la totalité des cellules tumorales. Pour les techniques utilisant une amplification par la tyramide, il convient d'être vigilant à ne pas faire de faux positifs liés au marquage aberrant des macrophages, de la nécrose, de mucines extracellulaires ou des pneumocytes hyperplasiques, ou à la présence dans la tumeur de filets nerveux ou cellules ganglionnaires marqués. A l'inverse, les adénocarcinomes avec cellules riches en mucine ont souvent un signal plus faible, d'où un risque de faux négatif.

La technique de FISH utilise habituellement des sondes de « séparation » (*break-apart* ou *split*) qui permettent de certifier la présence d'un réarrangement mais pas d'identifier le gène partenaire. La technique de FISH ne peut être interprétée que sur un prélèvement comportant un nombre suffisant de cellules tumorales (100 noyaux intacts). Le seuil de positivité préconisé est de 15% de cellules réarrangées (ce seuil est lié à la difficulté de discriminer un noyau tumoral d'un noyau d'une cellule non tumorale en FISH et n'est pas lié à l'hétérogénéité intra-tumorale).

Assurance qualité

Les tests d'évaluation externe de la qualité (EEQ) réalisés dans différents pays (AFAQAP, NordiQC, QUIP, UK-NEQAS) ont apporté des informations précieuses quant aux protocoles optimaux en immunohistochimie. Certains tests intègrent des cas ALK+ de faible intensité, d'autres uniquement des cas ALK+ forts et négatifs. Tous confirment la validité des clones D5F3 et 5A4 (et d'un clone plus récent OT11A4 dans le dernier test du NordiQC) et montrent une amélioration des résultats à chaque nouveau test. À titre d'exemple, pour l'AFAQAP, le taux de résultats adéquats est passé de 53% en 2014 à 91% en 2015 sur les cas ALK+ fort et les cas négatifs, avec un taux de marquages adéquats assez comparable pour les clones D5F3 et 5A4. Les protocoles optimaux des deux tests d'EEQ réalisés en France sont disponibles sur le site de l'AFAQAP.

Algorithmes

Un algorithme récent d'une équipe européenne (7) vise à s'affranchir du contrôle systématique par FISH des cas positifs en immunohistochimie. Schématiquement :

- un test IHC ALK de score 3+ (intensité forte) avec un kit ou un protocole « maison » suffit pour indiquer une thérapie ciblée ;
- un test de score 2+ ou 1+ (situation moins fréquente avec un test utilisant un système d'amplification) nécessite de rechercher un réarrangement d'ALK par technique FISH avant la mise en route d'un traitement ;
- un test négatif en IHC ne nécessite pas de contrôle FISH et il n'y a pas d'indication de traitement ciblé ;
- un test FISH peut être réalisé à la demande des cliniciens sur des cas particuliers.

Références

1. Epidémiologie des cancers - Les chiffres du cancer en France. *Institut National du Cancer 2016*. <http://www.e-cancer.fr/Professionnels-de-sante/Les-chiffres-du-cancer-en-France/Epidemiologie-des-cancers>
2. Locher C, Debieuvre D, Coëtmeur D, Goupil F, Molinier O, Collon T *et al.* Major changes in lung cancer over the last ten years in France: the KBP-CPHG studies. *Lung Cancer 2013;81:32-8*.

3. Soda M, Choi YL, Enomoto M, Takada S, Yamashita Y, Ishikawa S *et al.* Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature* 2007;448:561-6.
4. Solomon BJ, Mok T, Kim D-W, Wu Y-L, Nakagawa K, Mekhail T *et al.* First-line crizotinib versus chemotherapy in ALK-positive lung cancer. *N Engl J Med* 2014;371:2167-77.
5. Barlesi F, Mazieres J, Merlio JP, Debievre D, Mosser J, Lena H *et al.* Routine molecular profiling of patients with advanced non-small-cell lung cancer: results of a 1-year nationwide programme of the French Cooperative Thoracic Intergroup (IFCT). *Lancet* 2016;387:1415-26.
6. IASLC atlas of ALK testing in lung cancer. *IASLC press office* 2013. <https://www.iaslc.org/publications/iaslc-atlas-alk-testing-lung-cancer>
7. Marchetti A, Di Lorito A, Pace MV, Iezzi M, Felicioni L, D'Antuono T *et al.* ALK protein analysis by IHC staining after recent regulatory changes: a comparison of two widely used approaches, revision of the literature, and a new testing algorithm. *JTO* 2016;11:487-495.

Recommandations

- La recherche du statut ALK doit être systématique pour tout nouveau cas d'adénocarcinome broncho-pulmonaire, primitif ou métastatique, (ou de CBPNP non épidermoïde).
- Le test utilisé en 1^{ère} intention est l'IHC, à réaliser dès que le diagnostic est posé.
- La pratique de l'IHC ALK à visée théranostique implique de participer à un EEQ annuel.
- Le matériel utilisable peut être histologique ou cytologique (étalement, cytologie en phase liquide, cytobloc).
- La fixation des prélèvements tissulaires (y compris osseux) doit se faire dans du formol tamponné 10%, pendant au moins 6 h.
- Afin de ne pas compromettre une technique FISH éventuelle, il faut éviter d'utiliser des produits à base d'acides pour décalcifier les biopsies osseuses (préférer l'EDTA), ou choisir de fixer un fragment tissulaire non osseux à part.
- Pour les petits prélèvements, il faut veiller à économiser le matériel et prévoir des lames non déparaffinées stockées à 4°C, ou conserver les rubans de paraffine.
- Vu l'absence de contrôle interne, il convient d'ajouter un témoin positif sur chaque lame testée (CBNPC ALK+ connu ou paroi d'appendice normal, contenant des plexus nerveux ALK+ de façon physiologique).
- Les anticorps primaires actuellement validés et recommandés sont les clones D5F3 et 5A4 (le clone OT1A4 plus récent semble prometteur mais demande encore à être validé). Ils donnent de bons résultats sur les différentes plateformes à condition de bien adapter les protocoles. Le recours à une amplification par la tyramide dans les protocoles « maison » ou l'utilisation du kit D5F3-Optiview® (IVD) facilite l'optimisation des résultats.
- Un résultat IHC avec un marquage fort (score 3+) suffit à indiquer un traitement ciblé et ne requiert pas de contrôle FISH.
- Une absence de marquage en IHC (score 0) contre-indique l'utilisation d'une thérapie ciblée anti-ALK. Le rajout d'un témoin positif sur la lame testée permet de valider la technique IHC et il n'est alors pas nécessaire de réaliser un contrôle par FISH.
- Les cas douteux en IHC, c'est à dire avec une intensité de marquage faible ou modérée (score 1+ ou 2+) doivent être contrôlés par technique FISH.
- La technique FISH ne peut être interprétée que sur un prélèvement comportant un nombre suffisant de cellules tumorales (au moins 100 noyaux intacts). Le seuil de positivité est de 15% de cellules réarrangées. La lecture des lames FISH nécessite une expertise particulière.