



L'immunohistochimie la FISH et autres ..ISH pour

Cours du GOLF
Strasbourg
Novembre 2015
Dr I Rouquette



Pourquoi en parler ici?

Diagnostic correct = thérapeutique adaptée

- Aide au diagnostic sur biopsie **IHC**
- AMM crizotinib: recherche réarrangement ALK **IHC +FISH**
- Essais cliniques : recherche réarrangement ROS1, amplification CMET, amplification FGFR1 **IHC +FISH**
- Immunothérapie: PDL1, PDL2, CD8, PD1? **IHC**



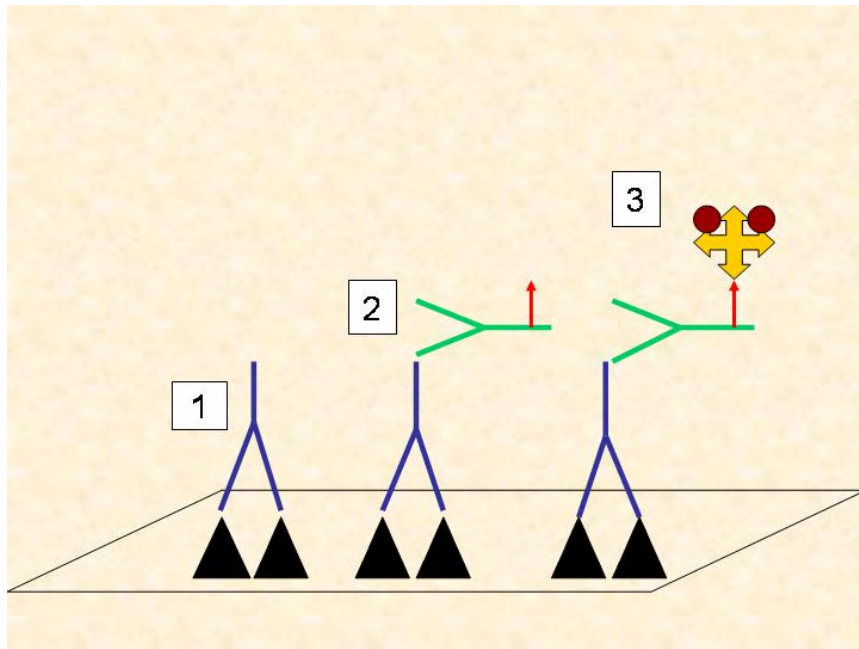
➤ **L'examen immunohistochimique :**

- **Détection d'un antigène** sur une coupe tissulaire
- **Anticorps spécifique** de l'antigène
- **Révélation** de la réaction antigène anticorps par une **réaction enzymatique** donnant un précipité de couleur



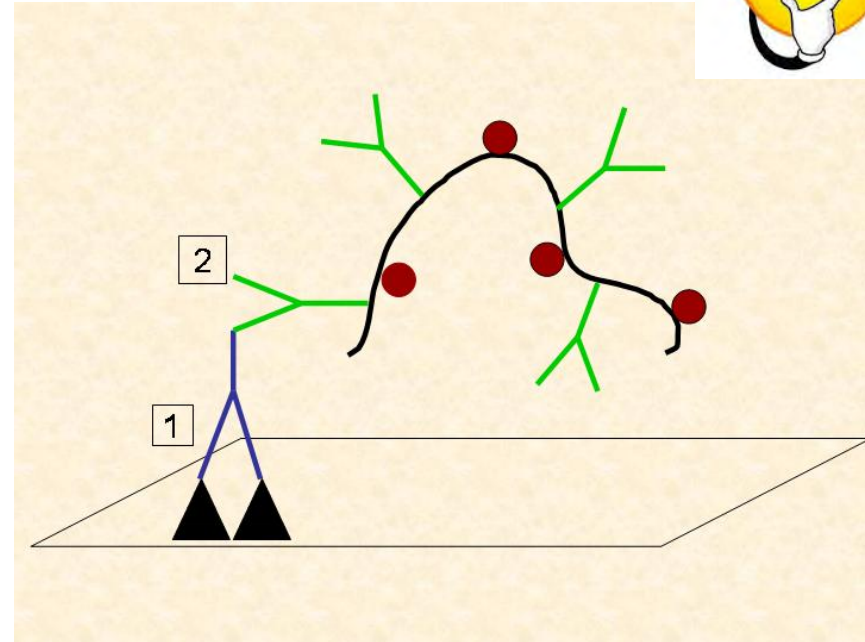
- **Epitopes:** parties de l'Ag reconnues par l'Ac
- **Affinité:** intensité de la liaison Ag/Ac
- **Avidité de l'Ac** fonction du nombre d'épitopes reconnus
- **Anticorps polyclonal:**
Mélange d'Ac reconnaissant différents épitopes de l'Ag
Avidité élevée, spécificité moindre
- **Anticorps monoclonal:**
Produit d'un clone de lymphocytes B :
Reconnait un seul épitope, spécificité élevée

Comment ça marche?



Streptavidine biotine peroxydase

- 1 Fixation anticorps primaire antigène
- 2 Fixation anticorps secondaire porteur d'une molécule de biotine
- 3 Fixation au complexe streptavidine peroxydase

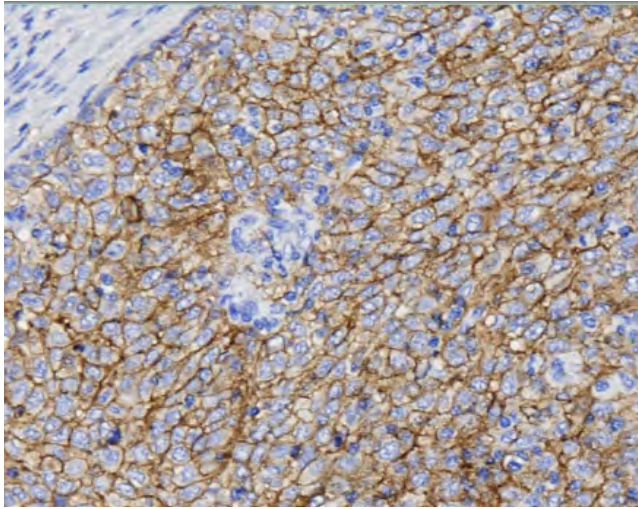


Amplification du signal par polymère

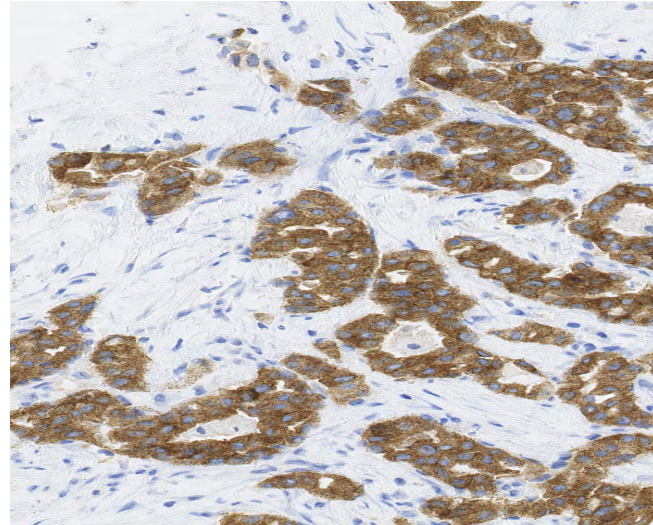
- 1 Fixation anticorps primaire antigène
- 2 Fixation anticorps secondaire fixé à un polymère inerte porteur d'anticorps secondaires et de peroxydase (multiplication du nombre de molécules réactives)

« kit Envision »

**R
E
S
U
L
T
A
T**

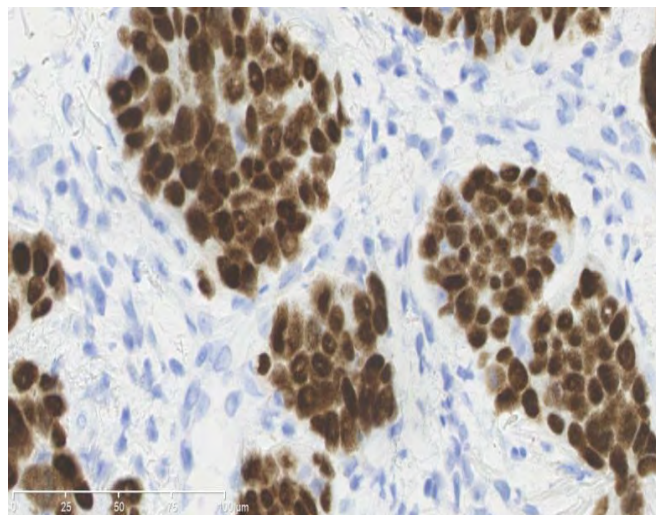


Marquage membranaire



Marquage cytoplasmique

Marquage nucléaire



Contraintes

- La réaction doit être **spécifique**: bloquer les sites de fixation non spécifiques, bloquer peroxydases endogènes
- L'**intensité** du signal obtenu dépend du nombre de molécules colorées visibles.
- On peut **amplifier** ce signal :
 - Prétraitement des coupes déparaffinées (chaleur , enzymes)
 - Augmentation du temps d'incubation
 - Création d'un complexe qui multiplie les molécules d'enzyme attachées de façon non covalente à l'anticorps (tyramide)
- **Impact du préanalytique**: fixateur, délai de fixation, température paraffine, décalcification

Recommandations pathologistes

Formol neutre tamponné: fixateur de référence

Acidité délétère pour les sites antigéniques et pour l'ADN

Eviter AFA

Pas de sous-fixation!!! (jamais < 6 h)

Décalcifiant = acide: rincer les pièces

T° paraffine

Impact des colorants (éosine, autres)



Indications de l'immunohistochimie en 2015:

- Approcher au plus près le **diagnostic sur biopsie** (IASLC/ATS/ERS puis OMS 2015)
- Rechercher les **réarrangements et amplifications**:
 - ALK: AMM Crizotinib
 - ROS1, CMET, etc: Essais cliniques
- **Immunothérapie**:
 - sélection patients éligibles?
 - Quel(s) anticorps?

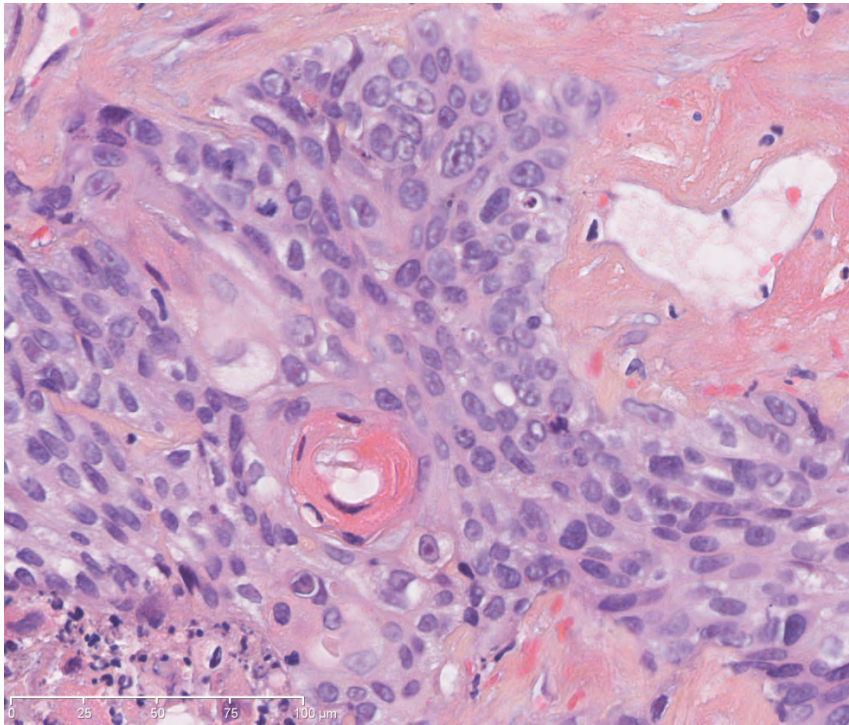
Immunohistochimie sur biopsie

- La morphologie ne permet pas de classer la tumeur.
- La morphologie fait évoquer une différenciation neuroendocrine,
- Un doute existe sur l'origine primitive ou secondaire (sein chez la femme ++, colon, etc ,,)

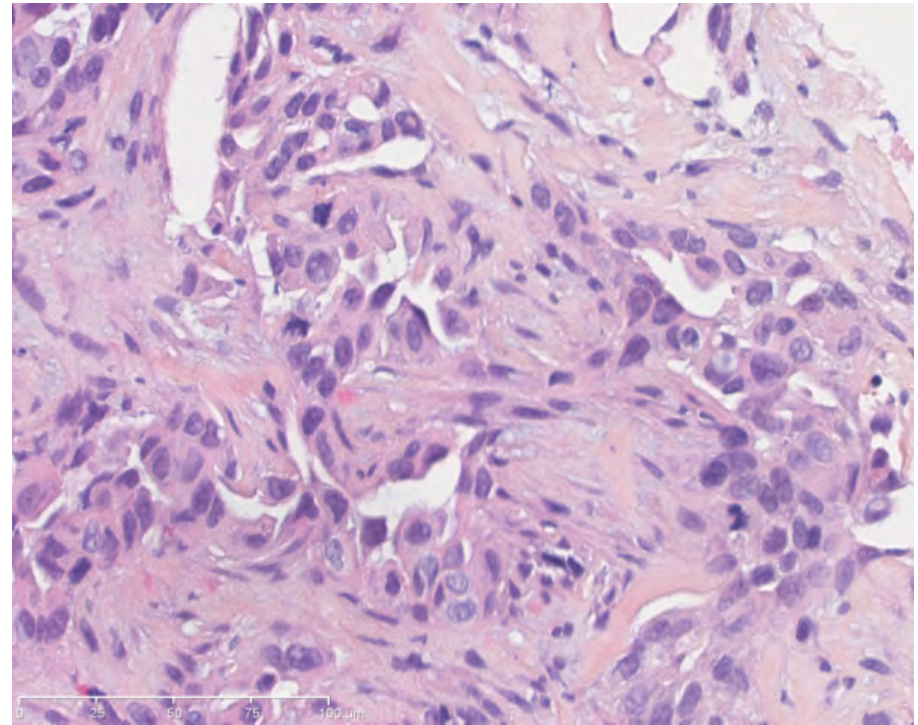
Immunohistochimie sur biopsie

- Panel standard: **P40 /TTF1 (CK5/6 + P63)**
- Différenciation morphologique endocrine:
**chromogranine, synaptophysine, CD56,
TTF1, Mib1.**
- Sein: RE, RP, HER2, GATA3
- Colon CK7, **CK20**, TTF1
- Rein CK7, CD10

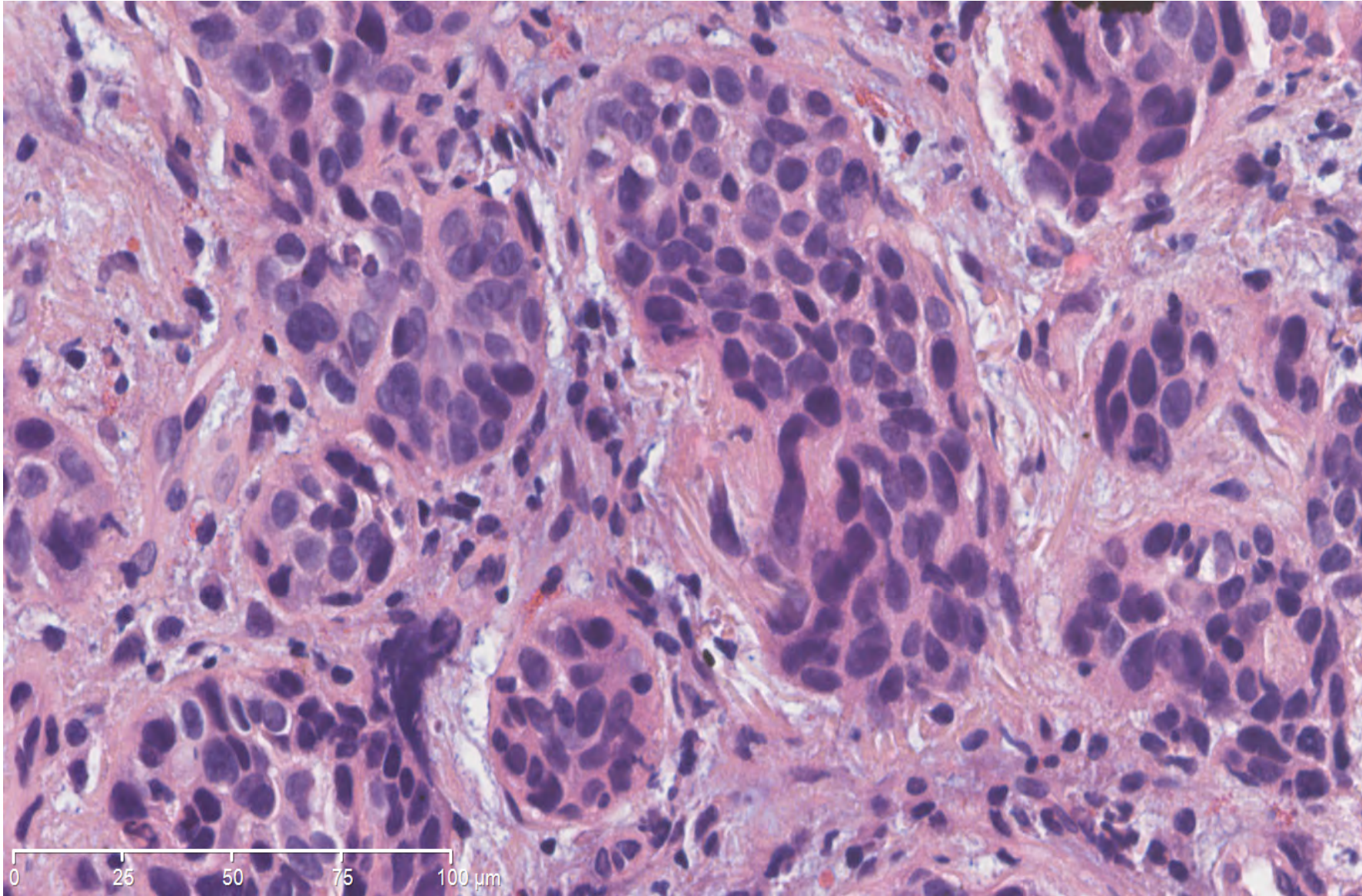
OMS 2015 morphologie

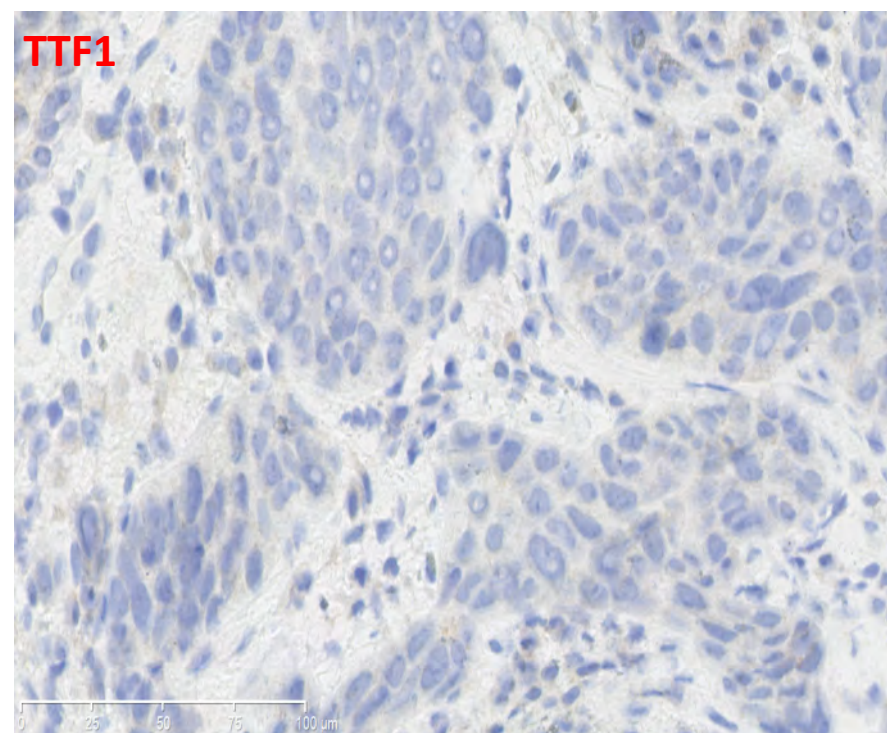
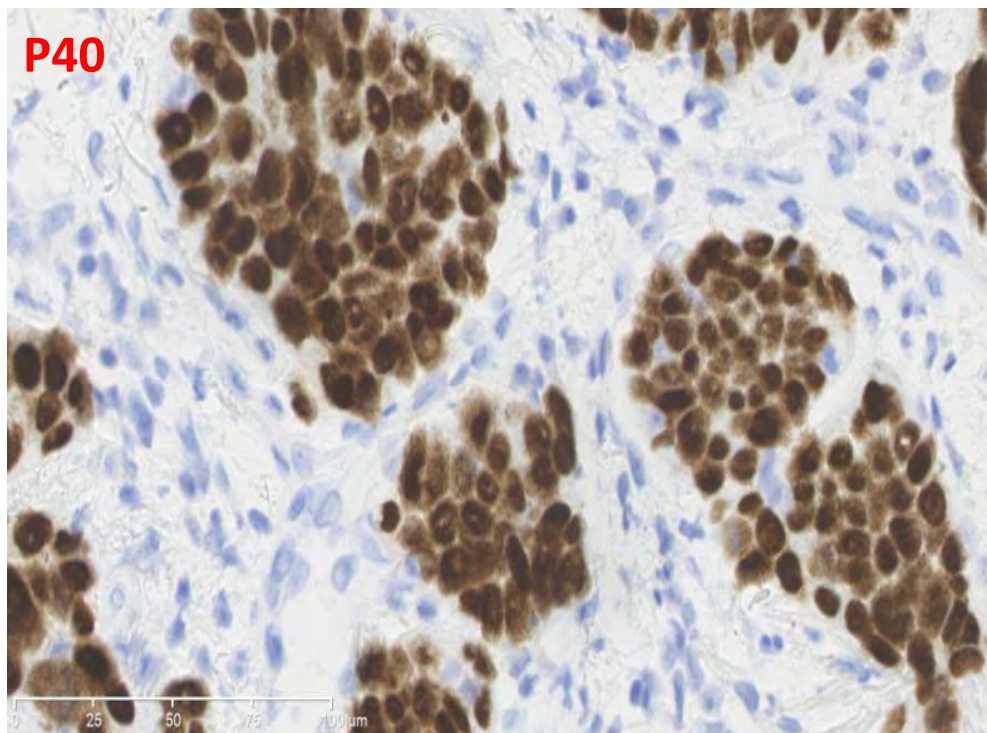


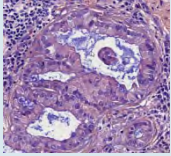
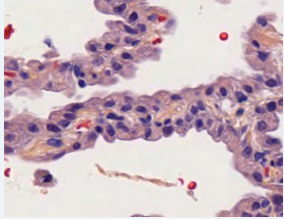
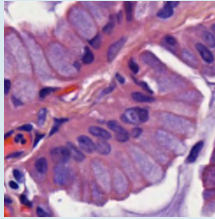
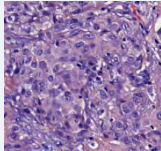
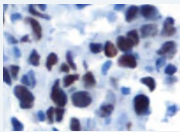
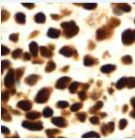
Epidermoïde
Dyskératose

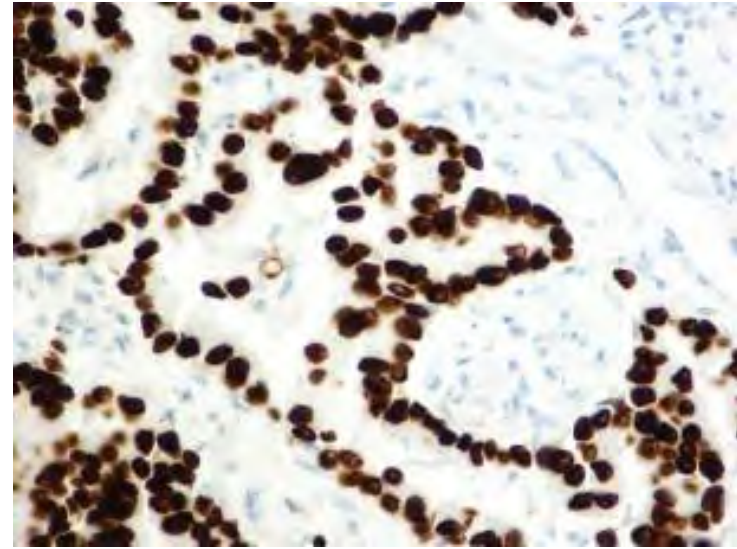
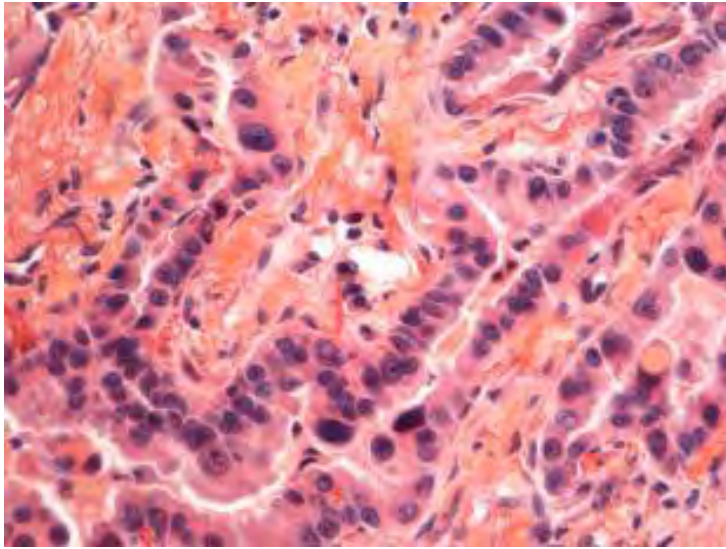


Adénocarcinome
Glandes

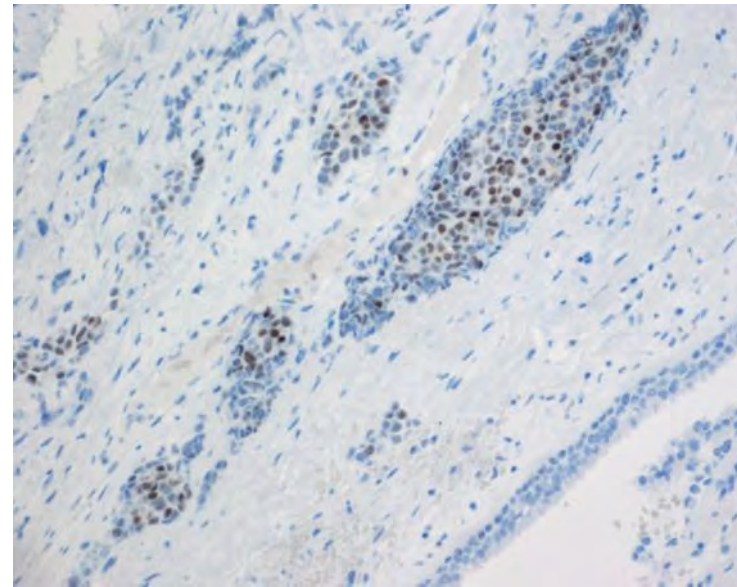
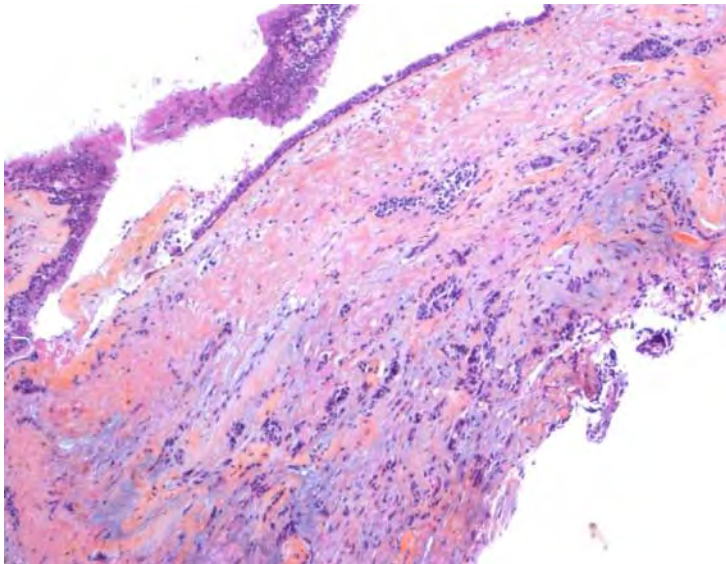




OMS 2015	Morphologie/colorations /IHC	Petits prélèvements
Adénocarcinome Pattern prédominant	Morphologie adénocarcinome 	Adénocarcinome Décrire les patterns présents
<ul style="list-style-type: none"> Invasif à prédominance lépidique in situ microinvasif 		Adénocarcinome avec aspect lépidique (préciser qu'un composant invasif ne peut être exclu)
Adénocarcinome mucineux invasif		Adénocarcinome mucineux invasif Si lépidique pur: adénocarcinome mucineux avec aspect lépidique
Adénocarcinome invasif (composant solide)	CBNPC TTF1+  	CBNPC en faveur d'un adénocarcinome
Carcinome épidermoïde		Carcinome épidermoïde
Carcinome épidermoïde	CBNPC P40+ 	CBNPC en faveur d'un épidermoïde
Carcinome à grandes cellules	Pas d'argument morpho ou immuno	CBNPC sans autre indication

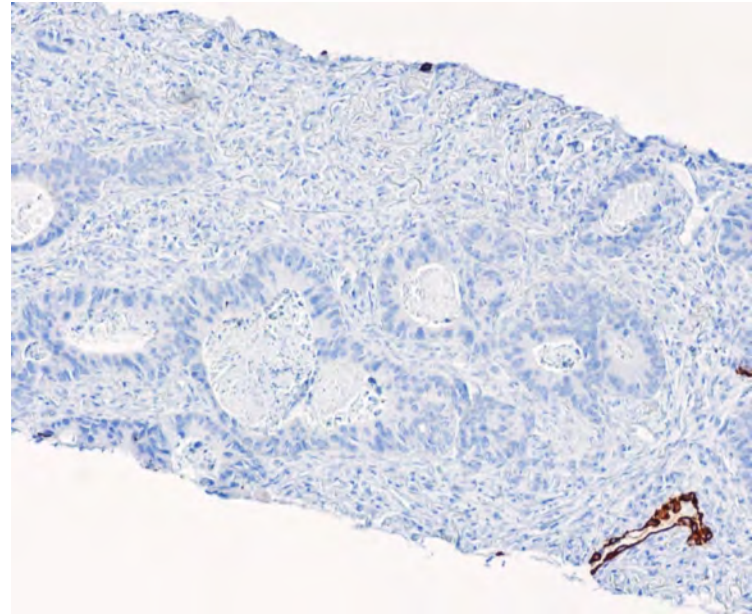
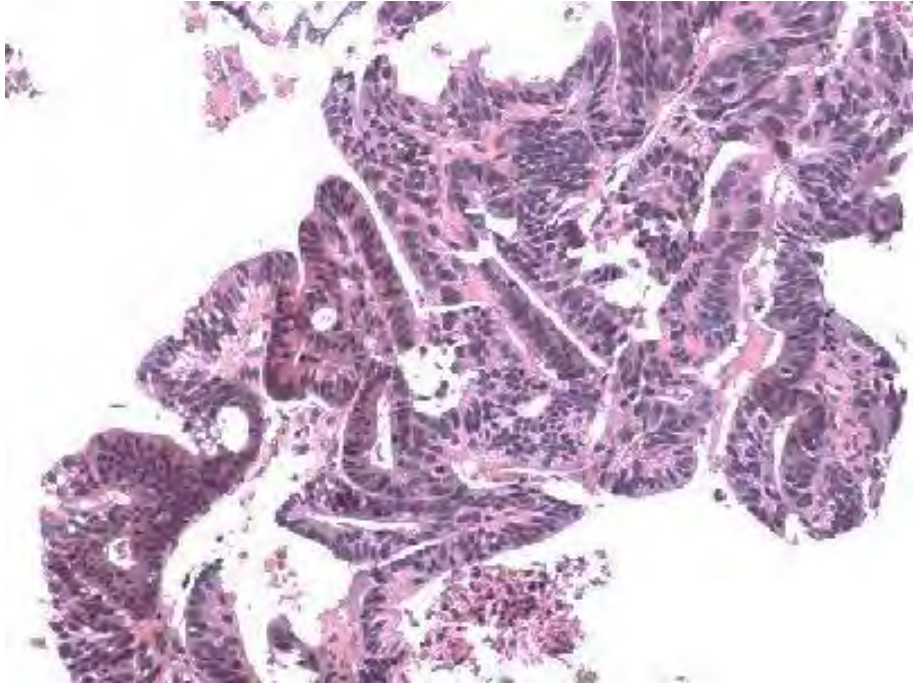


TTF1

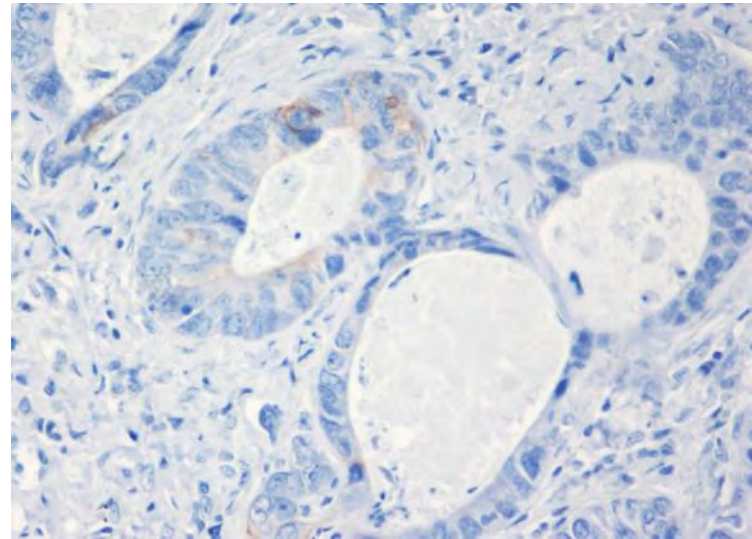


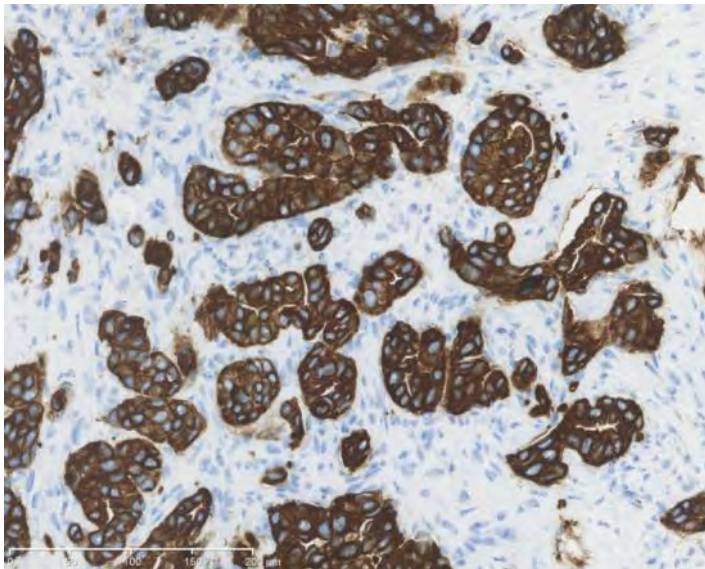
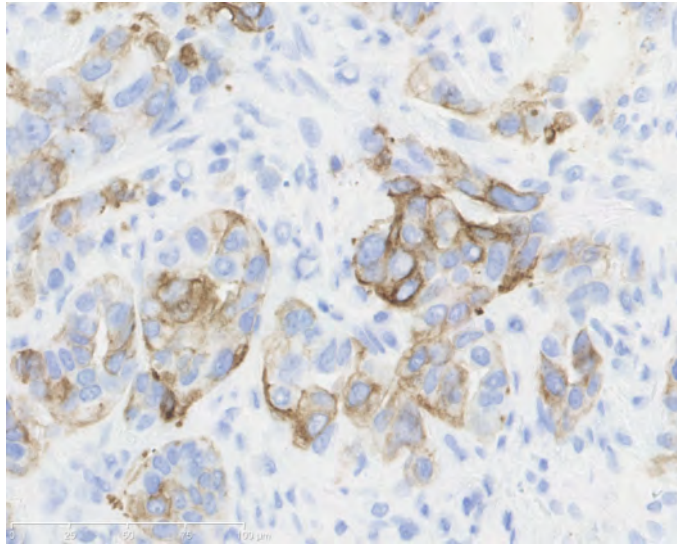
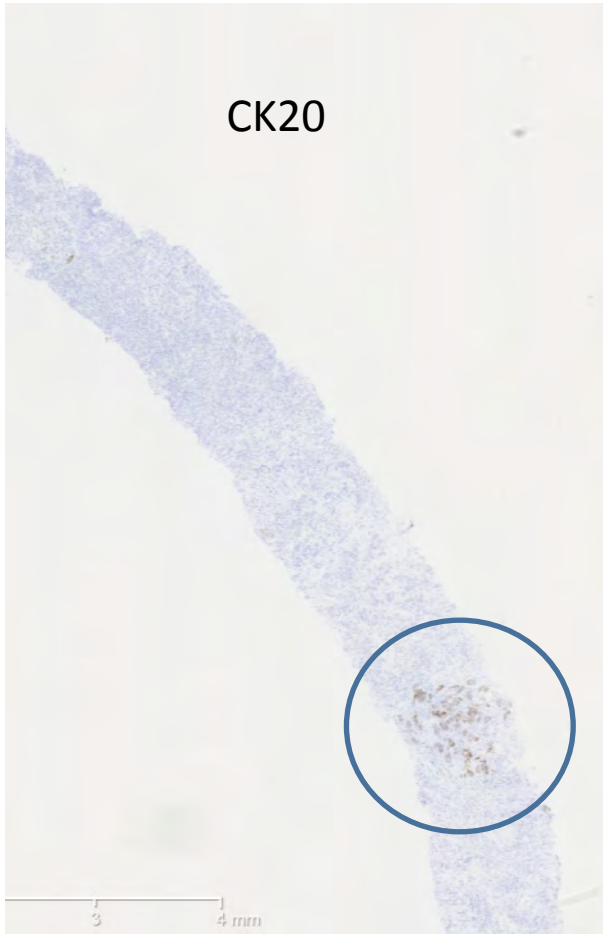
RE

CK7

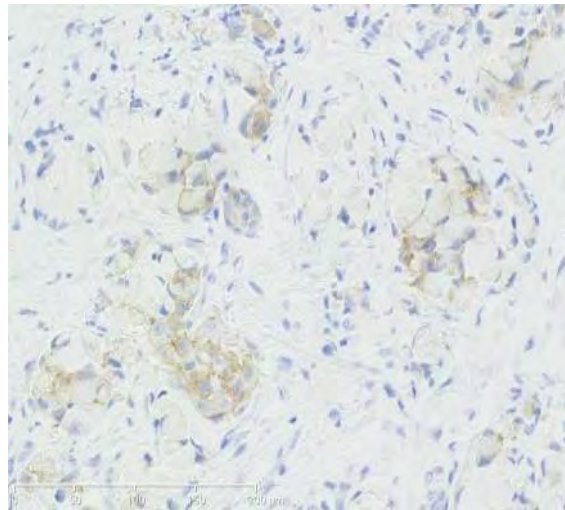
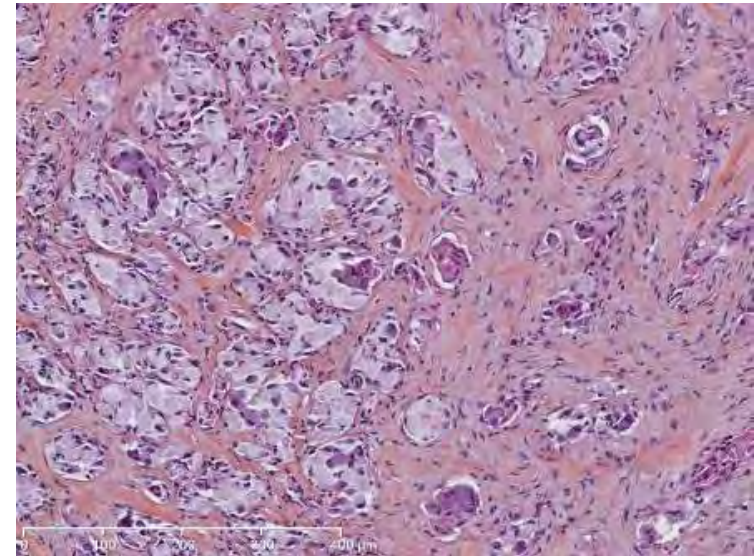


CK20



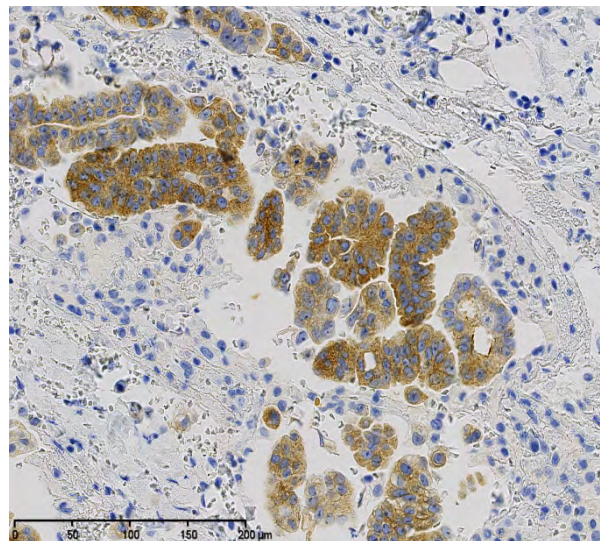


AMM crizotinib: détection des réarrangements de ALK

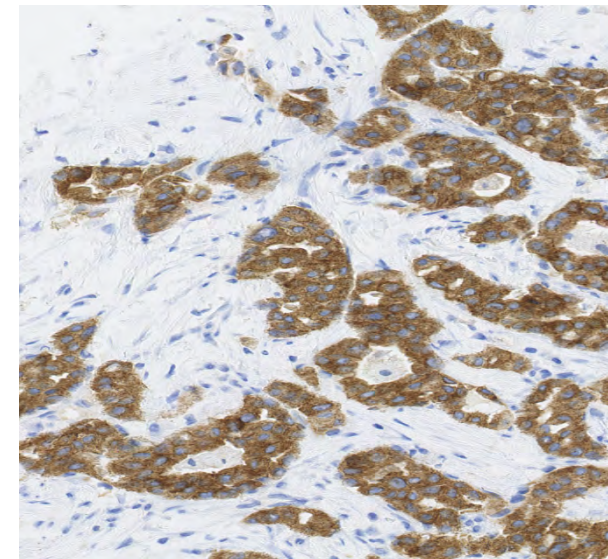


1+

2+



3+



FISH dès qu'un signal positif est observé (>10% de cellules tumorales positives):

Deux clones 5A4 D5F3

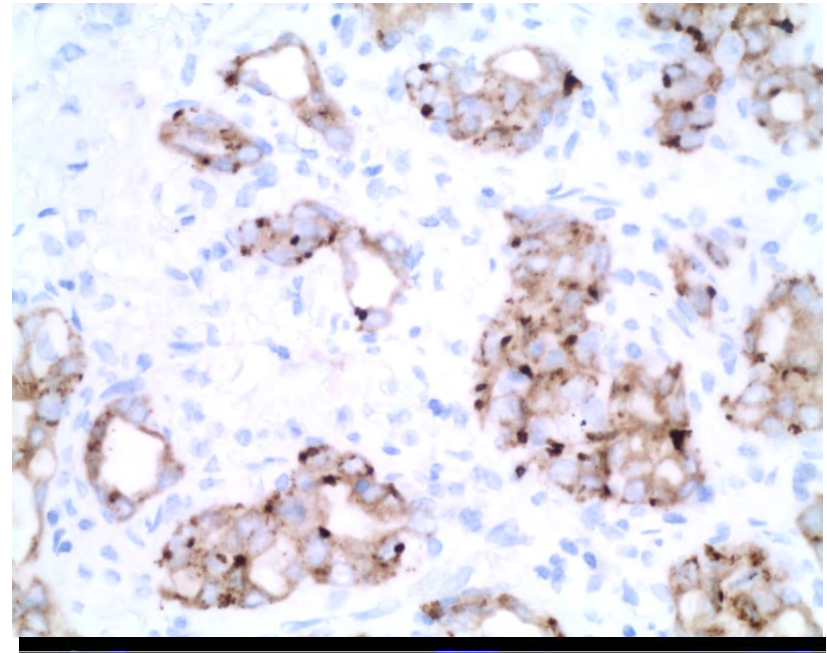
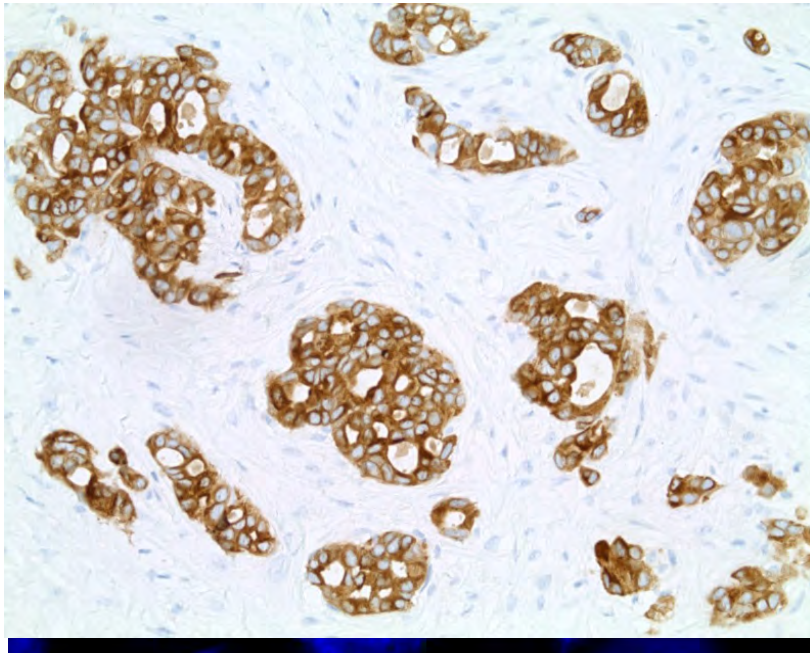
Réarrangement de Ros

**Anticorps
clone D4D6**

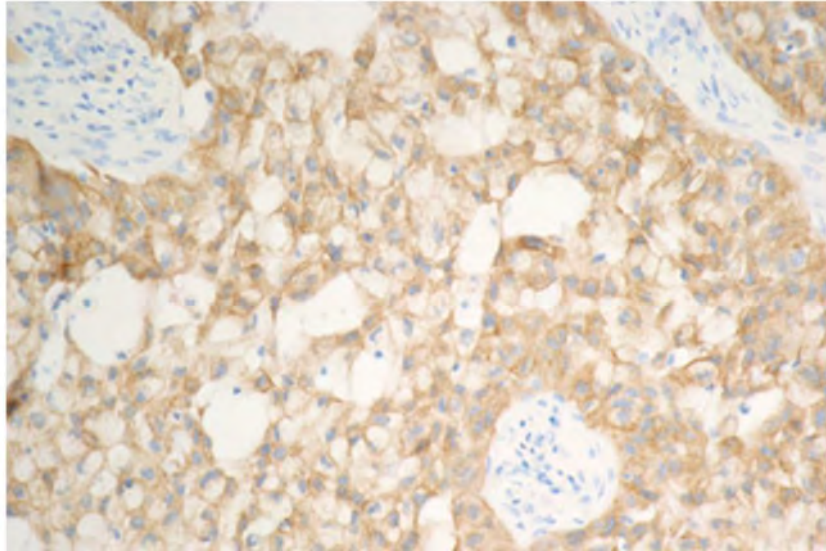
Seuil de positivité

FISH dès qu'un signal positif est observé (>10% de cellules tumorales positives):

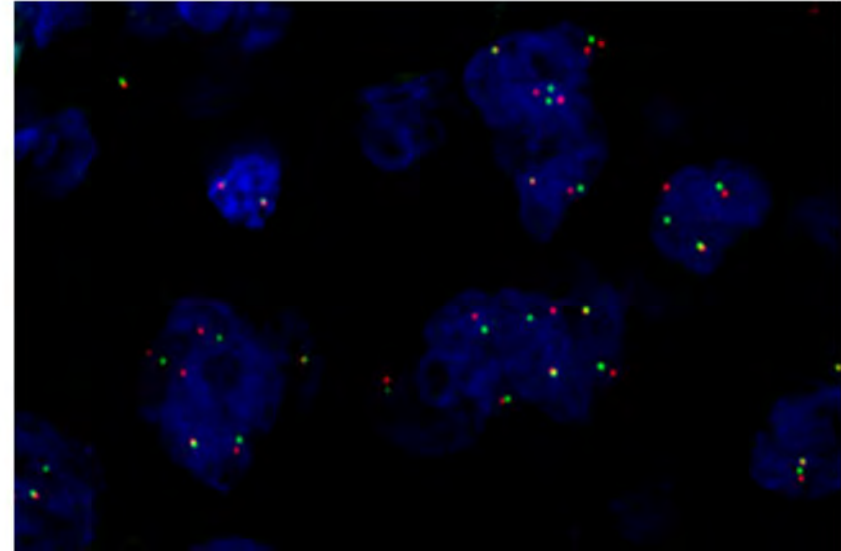
- Score 1+, 2+ ou 3+



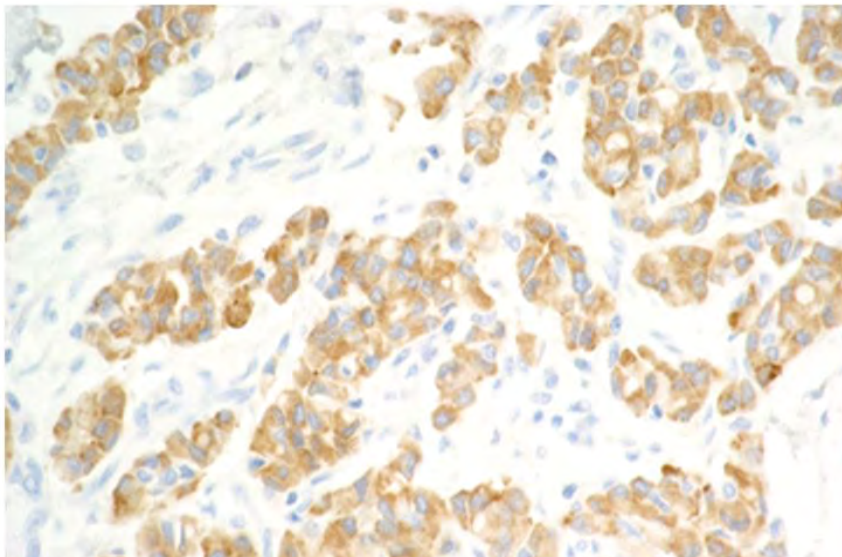
IHC ALK ++ diffuse cytoplasmique



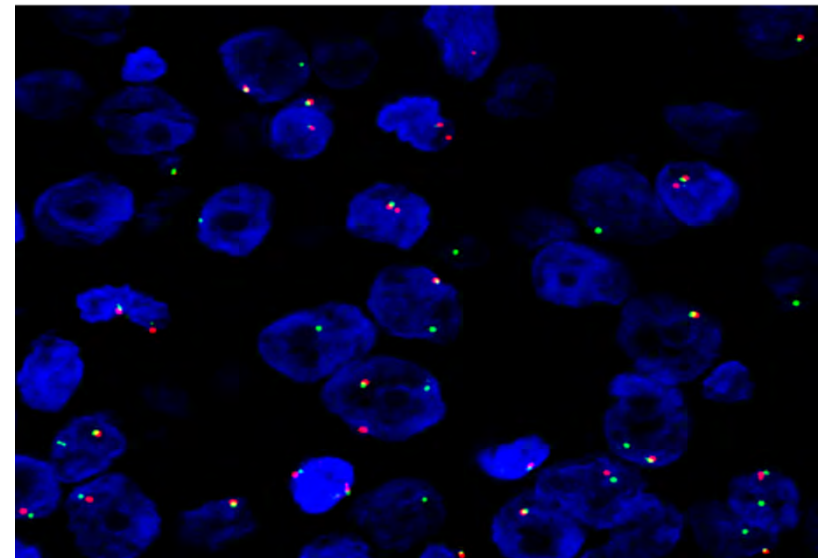
séparation 5' / 3'



IHC ROS1 ++ diffuse cytoplasmique



Séparation et perte sonde en 5' points verts isolés



L'hybridation in situ



- Une **technique moléculaire** reposant sur les propriétés d'appariement spécifique des nucléotides complémentaires
- L'anomalie génétique recherchée est dite « **séquence cible** »
- **La sonde** est la séquence complémentaire spécifique **fluorescente, chromogénique** ou **métallographique** qui va s'hybrider sur la séquence cible pour donner
- **Un résultat visuel** sur coupe tissulaire

- Un brin d'ADN = un enchaînement de nucléotides

- Un nucléotide = Base azotée (A, T, G, C)
+ désoxyribose
+ groupements phosphates

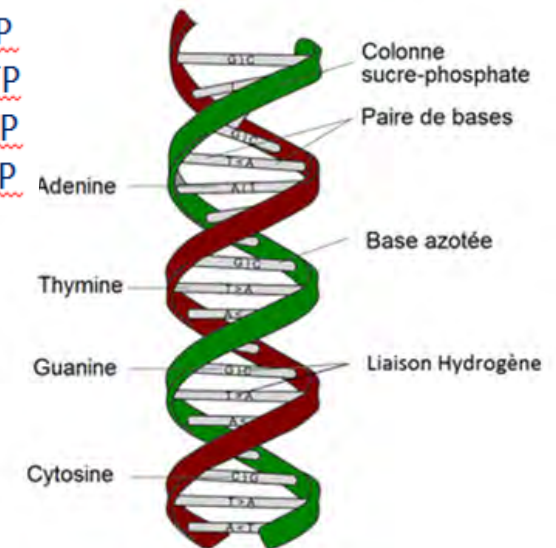
dATP
dGTP
dCTP
dTTP

- Les bases sont complémentaires

- Adénine Thyminine
- Guanine Cytosine

- L'Uridine base de l'ARNm peut s'apparier à la place de la Thyminine

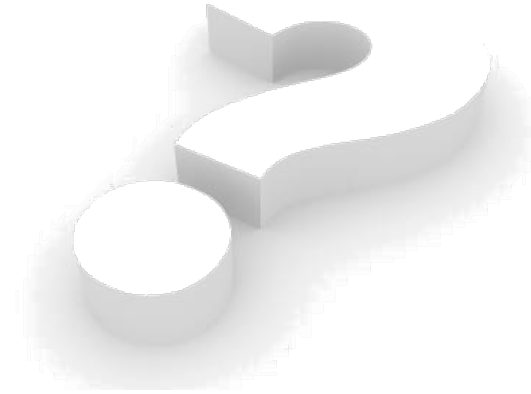
- On utilise cette propriété pour marquer les sondes





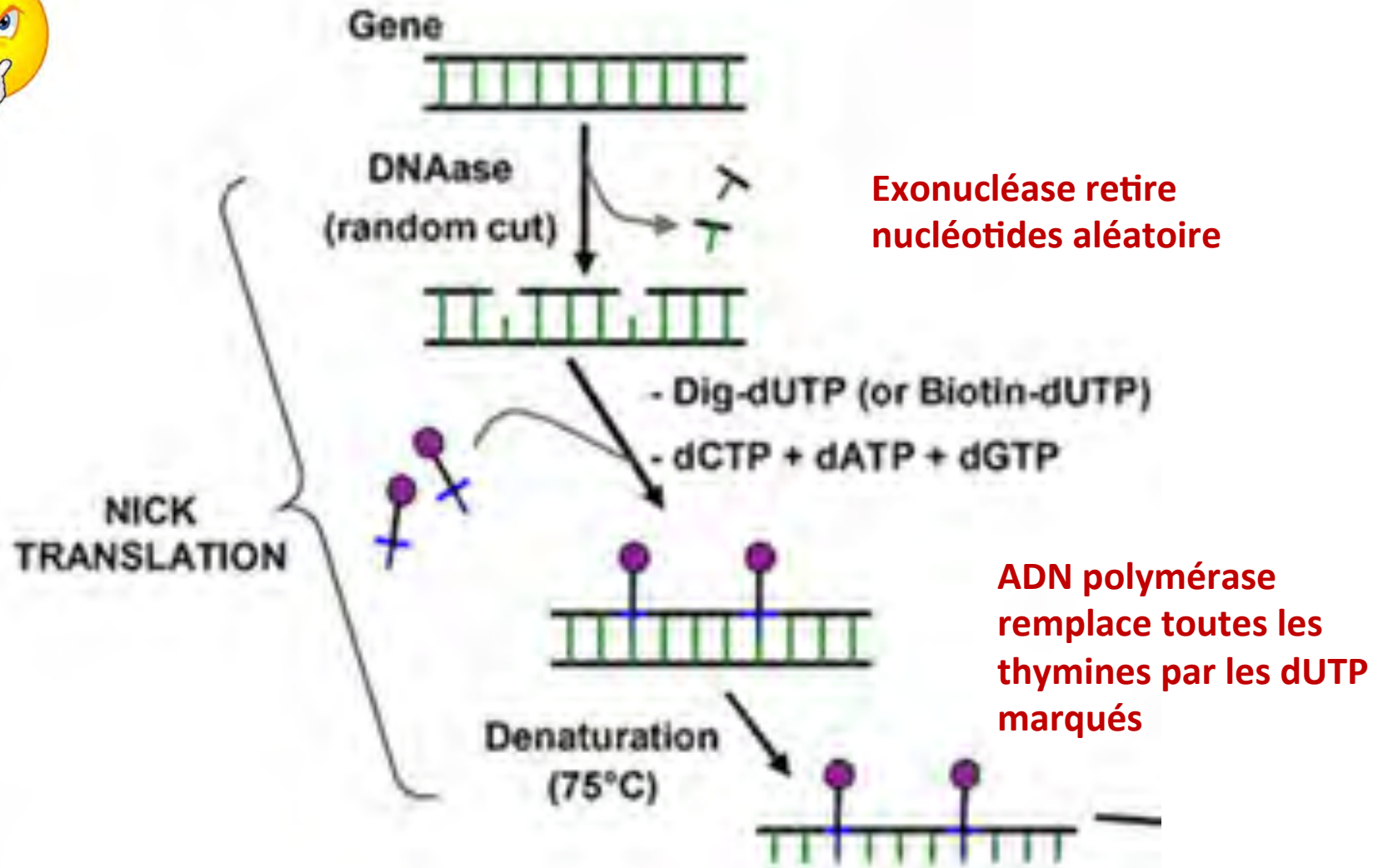
- **Amplification**: augmentation du nombre de copies du gène
- **Délétion**: excision d'un fragment d'ADN
- **Inversion**: changement d'orientation d'un segment d'ADN
- **Fusion de gènes**: résulte d'un réarrangement avec double cassure de deux gènes et transposition de l'un dans l'autre
- **Aneuploïdie**: nombre anormal de chromosomes dans une cellule
- **Polyploïdie**: multiplication par un nombre entier du nombre de chromosomes d'une cellule

QU'EST-CE QUE CA VEUT DIRE?

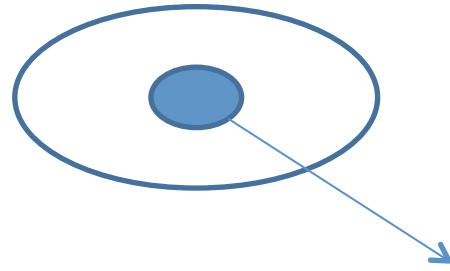


- FISH: **F**luorescent **I**n **S**itu **H**ybridization
- BDISH: **B**rightfield **D**ual probe ISH
- CISH: **C**hromogenic **I**n **S**itu **H**ybridization
- SISH: **S**ilver **I**n **S**itu **H**ybridization
- DDISH: **D**ual color **D**ual hapten brightfield **I**n **S**itu **H**ybridization

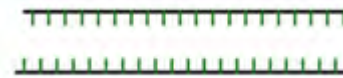
1 Préparation de la sonde:



Hybridation, Révélation, Lecture



Cellule sur coupe tissulaire



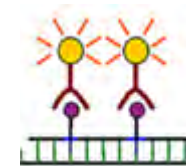
chauffage

Dénaturation: séparation des
deux brins d'ADN

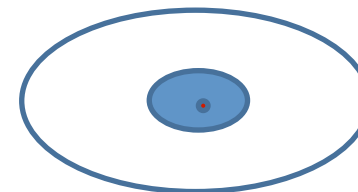
Sonde dénaturée
monobrin marquée par la
digoxigénine ou la biotine



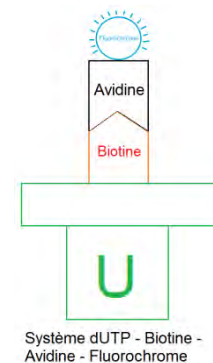
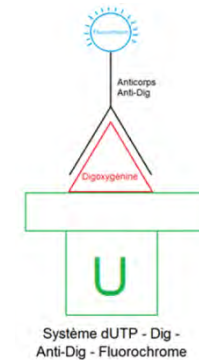
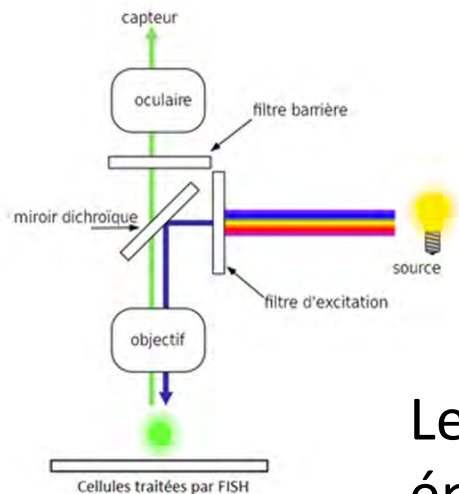
Hybridation



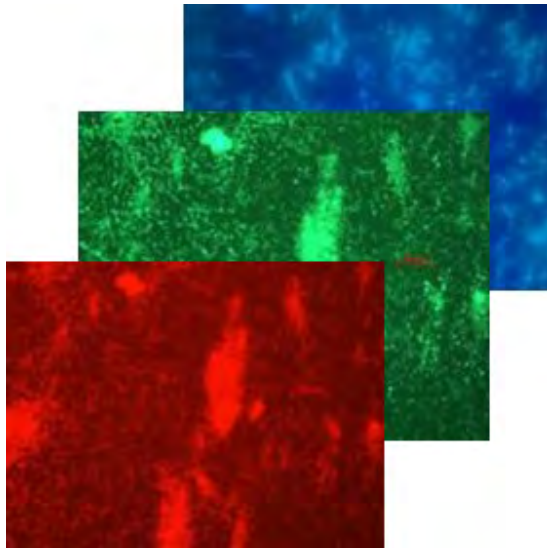
Révélation



Lecture Microscope à
épifluorescence



- Filtre DAPI $\lambda_{\text{excitation}} 365\pm 12 \text{ nm} / \lambda_{\text{émission}} \geq 397 \text{ nm}$
- Filtre Rhodamine-rfp $\lambda_{\text{excitation}} 546\pm 12 \text{ nm} / \lambda_{\text{émission}} \geq 590 \text{ nm}$
- Filtre FITC-gfp $\lambda_{\text{excitation}} 475\pm 40 \text{ nm} / \lambda_{\text{émission}} 530\pm 40 \text{ nm}$



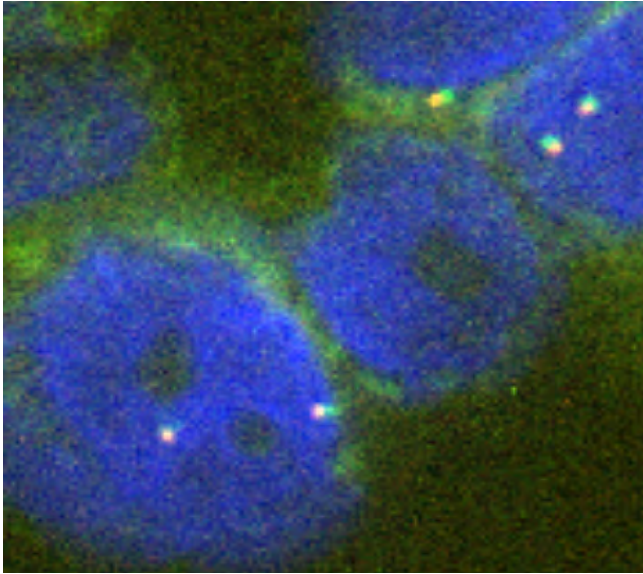
Fluorescein	495	519
BODIPY-FL	503	512
TRITC	547	572
X-Rhodamine	570	576
Lissamine Rhodamine B	570	590
Texas Red	589	615
Allophycocyanin (APC)	650	660
APC-Cy7 conjugates	650,755	767

Le bon filtre pour la bonne sonde Lecture longue (30 min par cas)

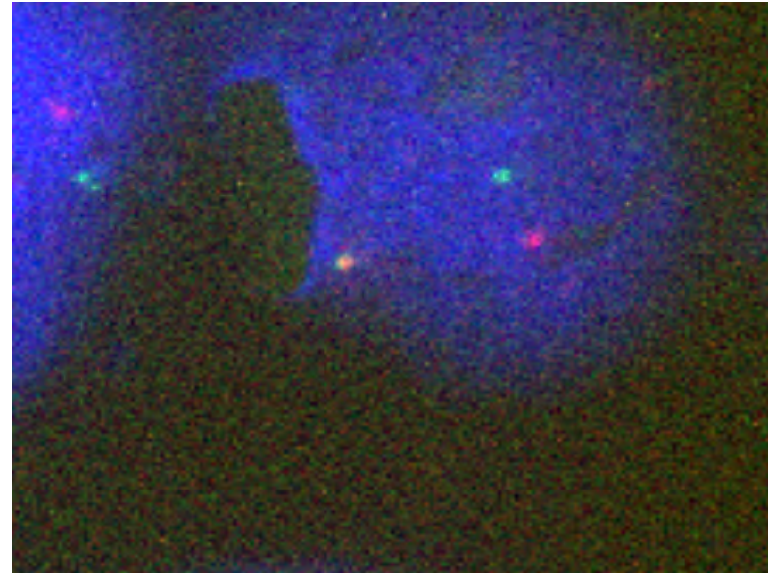
Spectrum Orange Gold.
Excitation: 547 nm
Emission: 572 nm
Equivalent: Rhodamine

Sonde split DAKO: **texas red** / **FITC**
Sonde split Abbott: **orange gold** / **FITC**

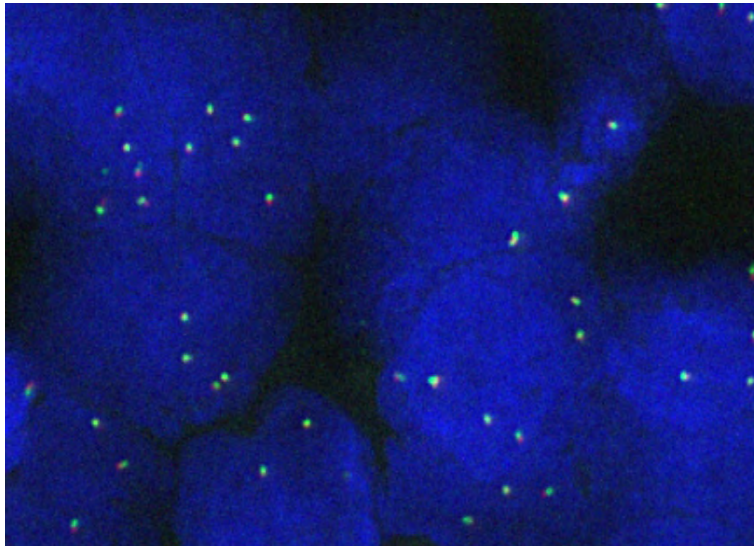
Aspect normal



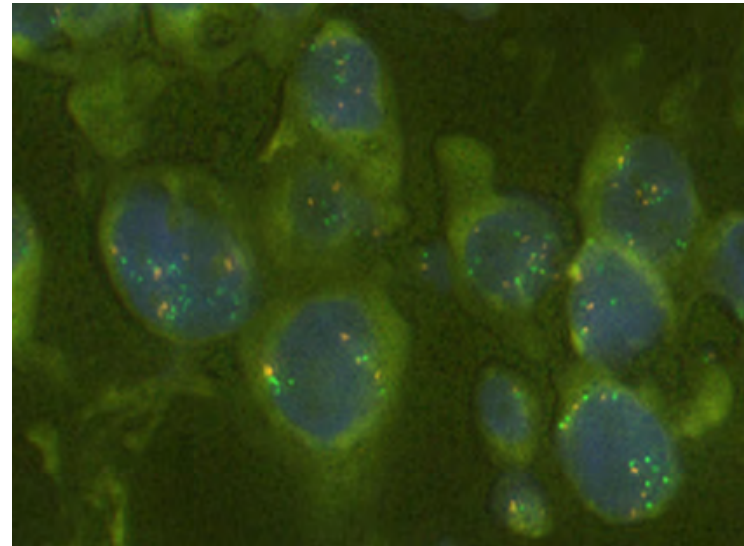
Séparation



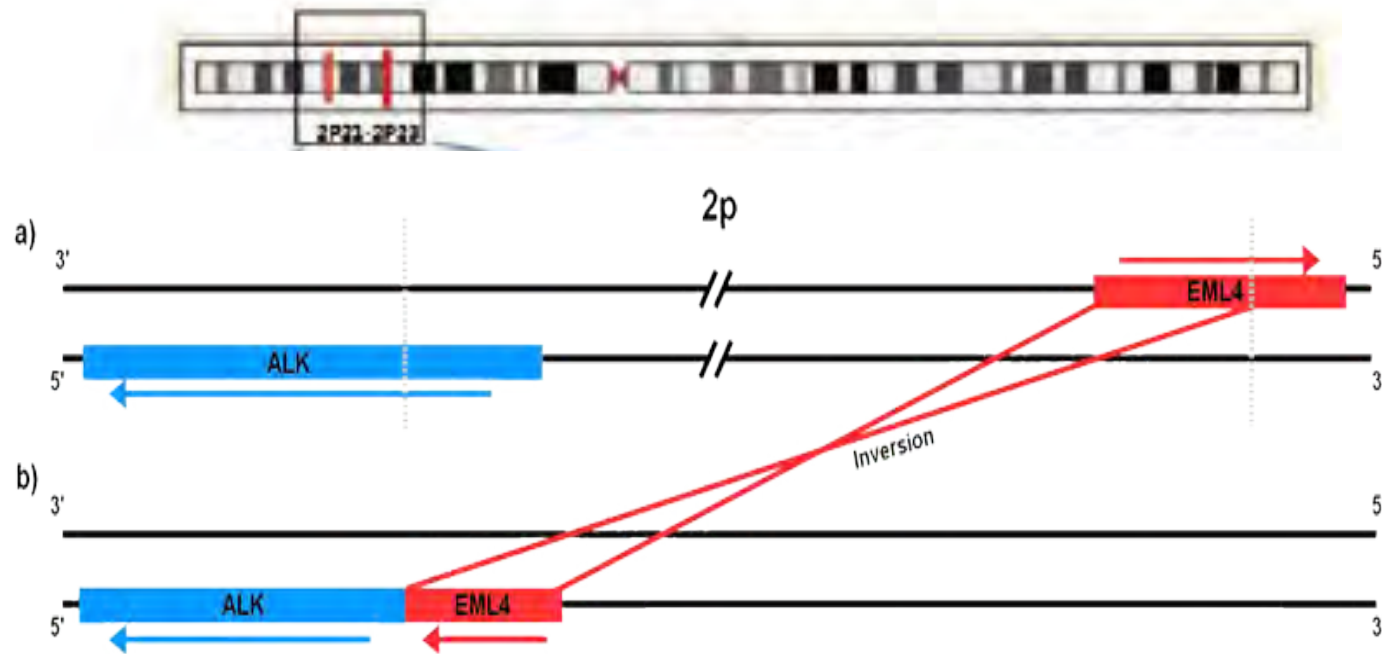
Polysomie



Amplification



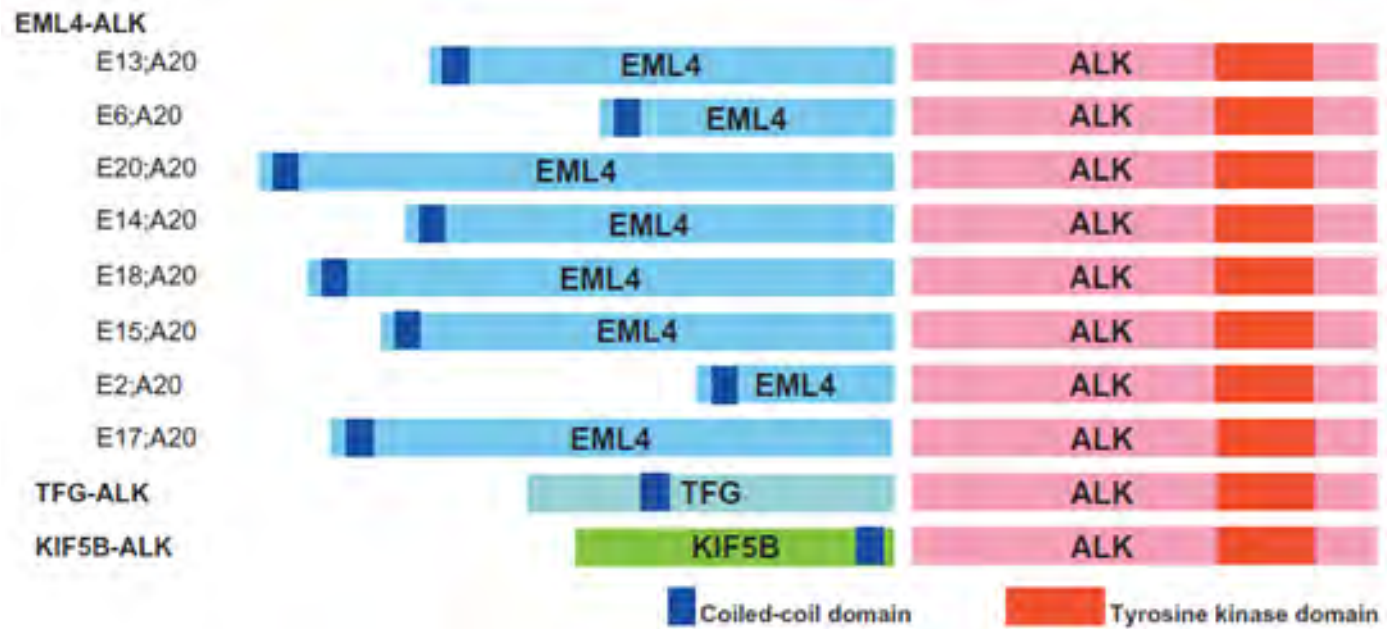
Diagnostic d'un réarrangement du gène ALK:



Inversion bras court du chromosome 2

Fusion exons 1-13 d'EML4 /exons 20-29 de ALK
(région codant pour la TK ALK)

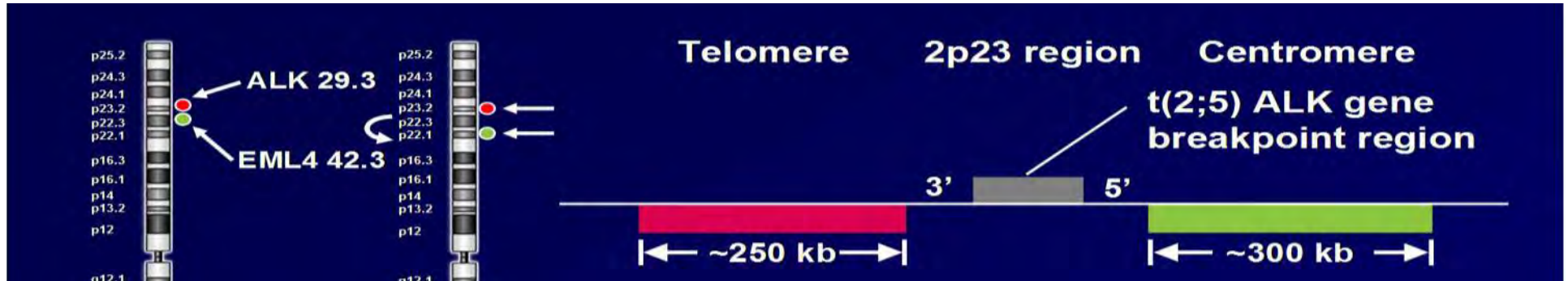
GENE DE FUSION



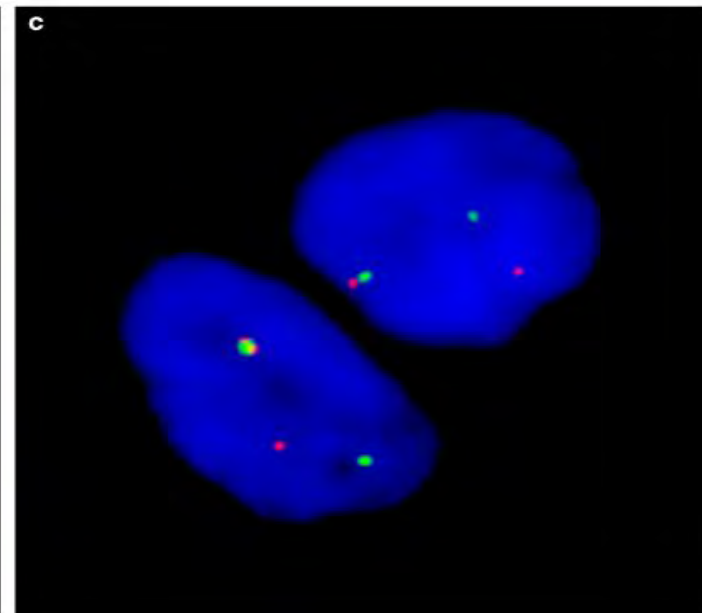
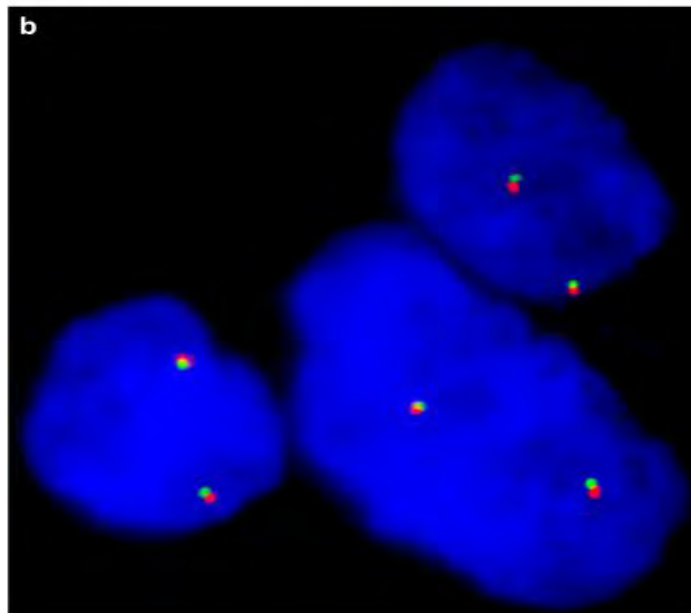
Variants les + fréquents

- V1 33%
- V3a/b 29%
- V2 9%

Technique FISH



On n'identifie que la cassure d'ALK (partenaire?)



Lecture

- Région tumorale préalablement sélectionnée par le pathologiste
- Au moins 100 noyaux intacts (pb petites biopsies)
- Distance split \geq diamètre d'un signal
- Seuil de positivité: 15%
- Lecture longue fastidieuse, problème du fading
- Double lecture
- Si doute, vérifier par autre technique

Impact du préanalytique

- **Formol neutre tamponné**

- Attention **durée de fixation** (protocoles week-end). Sous-fixation non rattrapable.

- **Décalcifiant = acide:**

Si plusieurs sites métastatiques éviter de biopsier l'os

Pièces osseuses: rinçage acide, vérifier pH hypercentres

- Impact des colorants éosine: **autofluorescence**

- Ne pas couper les lames trop longtemps avant la FISH et l'IHC, les conserver à 4°C, les protéger.

Impact du préanalytique

- **Formol neutre tamponné**

- Attention **durée de fixation** (protocoles week-end). Sous-fixation non rattrapable.

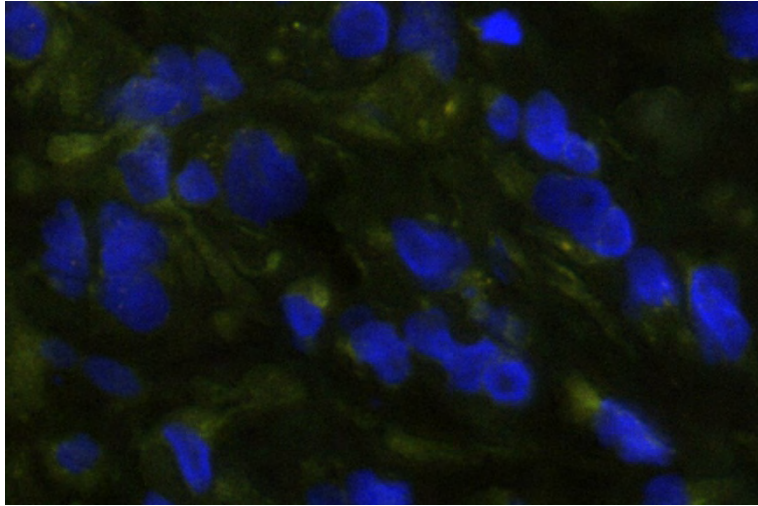
- **Décalcifiant = acide:**

Si plusieurs sites métastatiques éviter de biopsier l'os

Pièces osseuses: rinçage acide, vérifier pH hypercentres

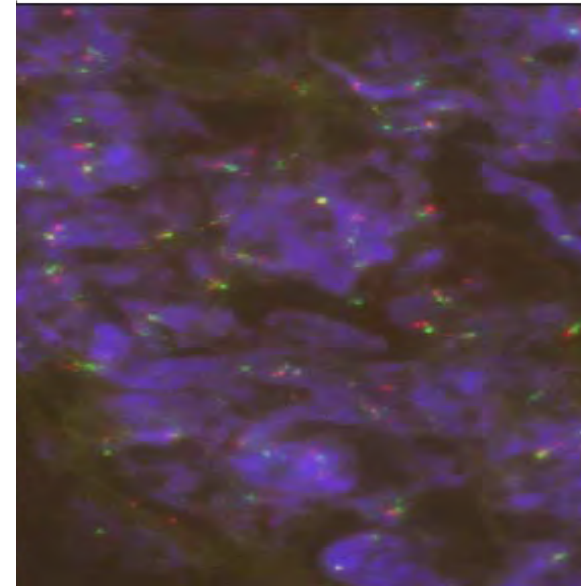
- Impact des colorants éosine: **autofluorescence**

- Ne pas couper les lames trop longtemps avant la FISH et l'IHC, les conserver à 4°C, les protéger.

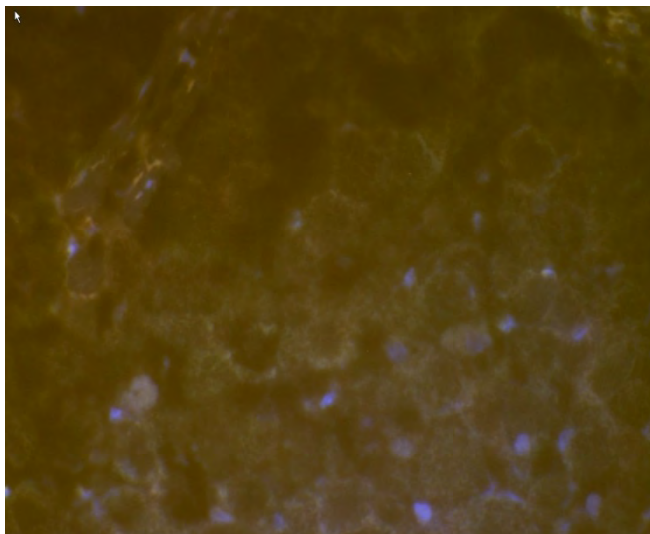


AFA: pas d'hybridation Sous-fixation

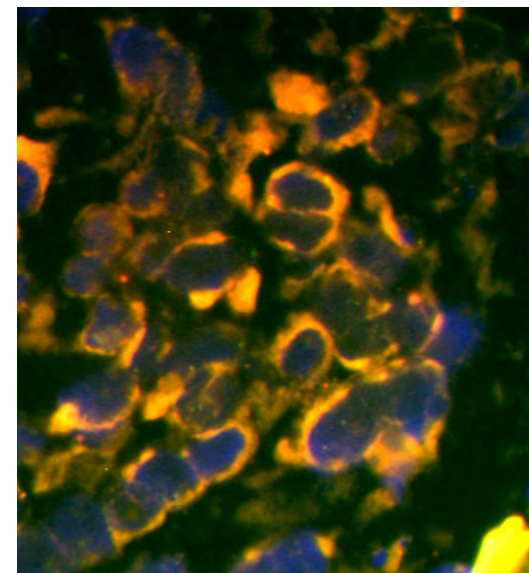
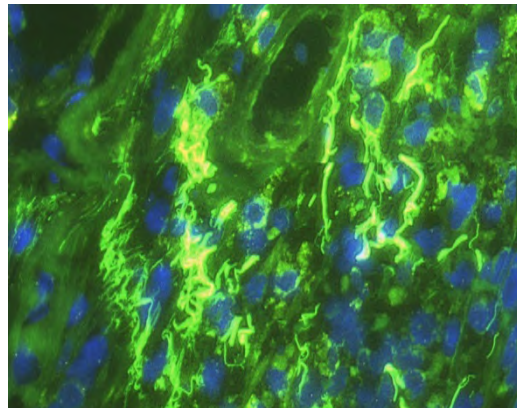
Ecrasements

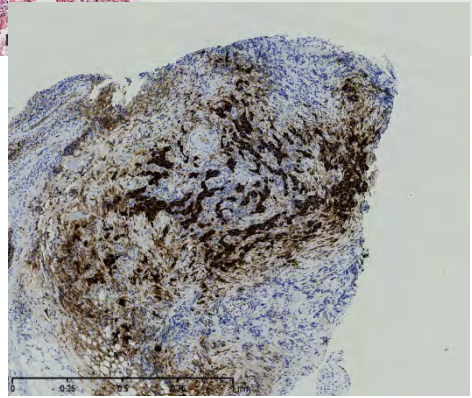
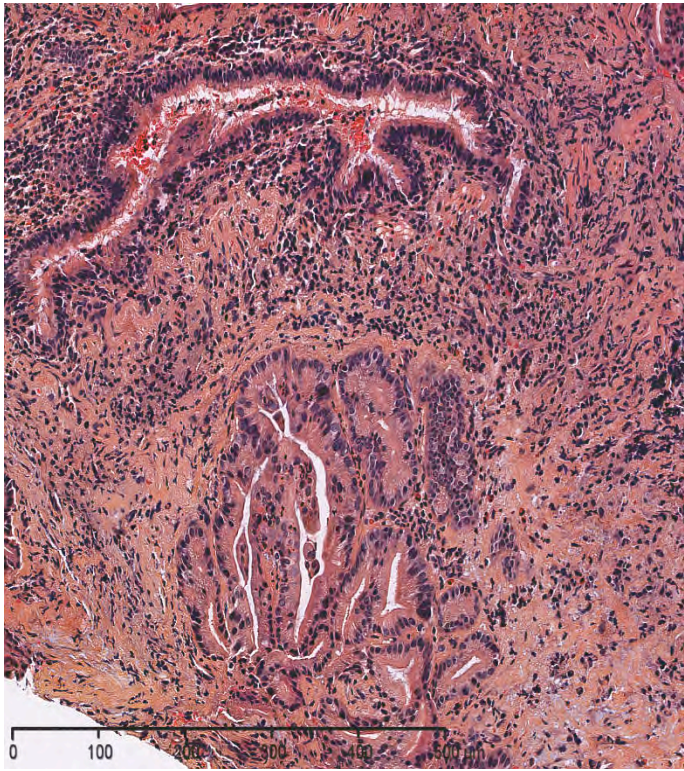
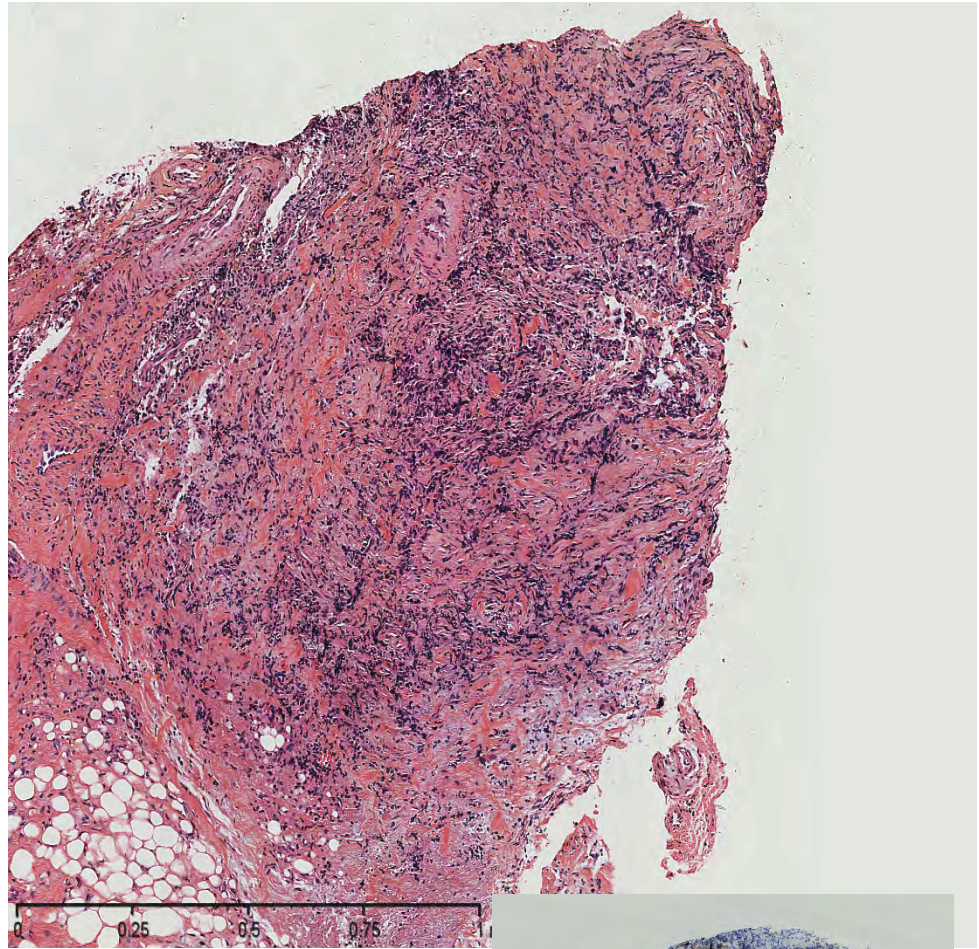
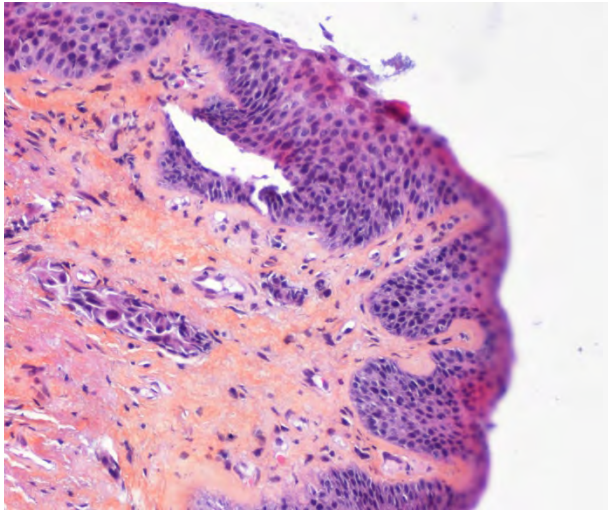


Os décalcification

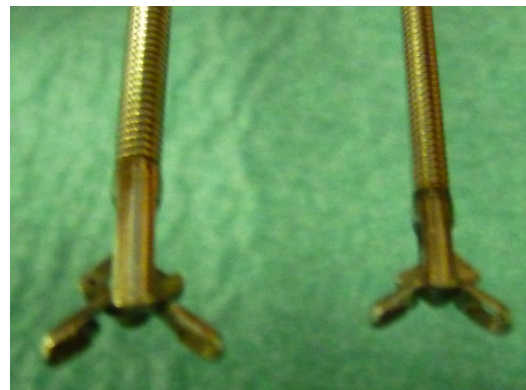
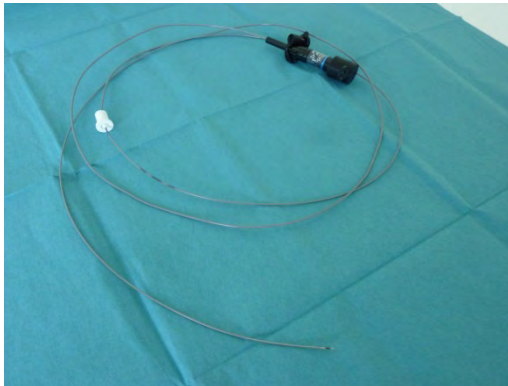


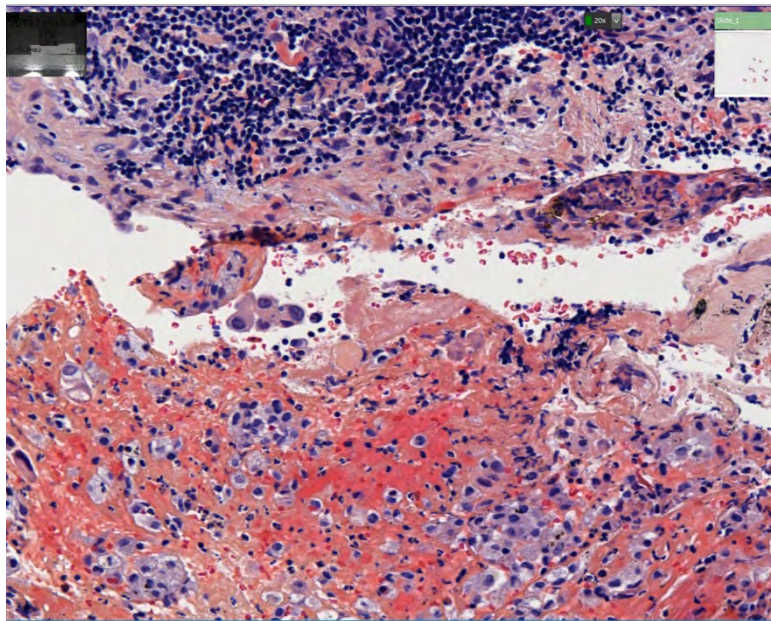
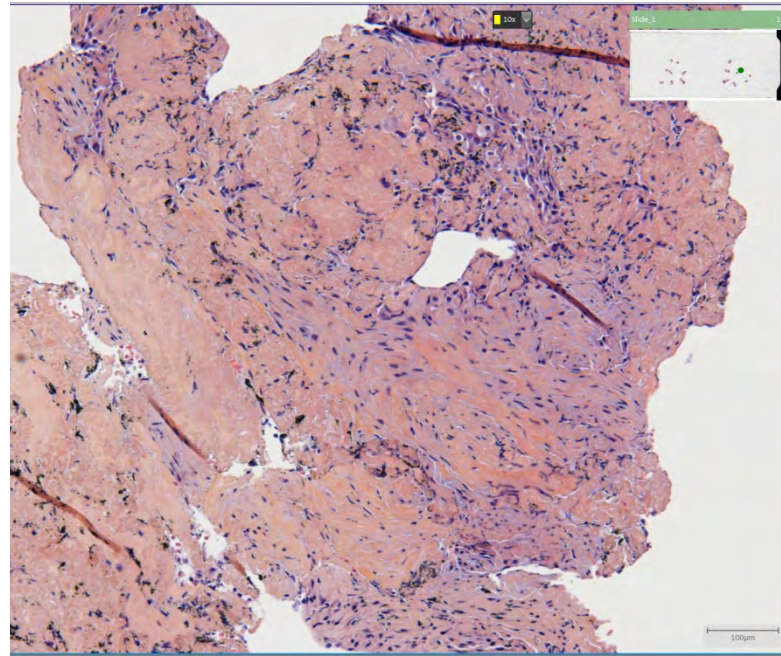
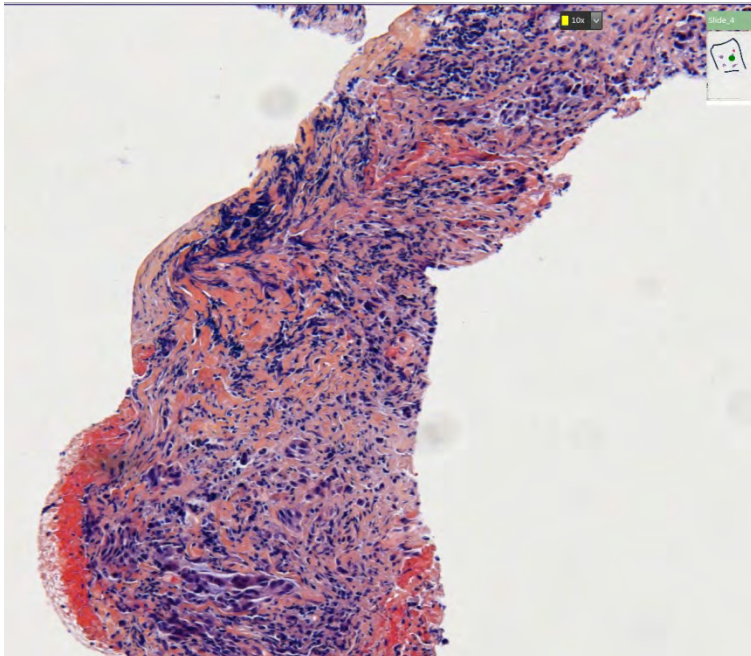
Autofluorescence





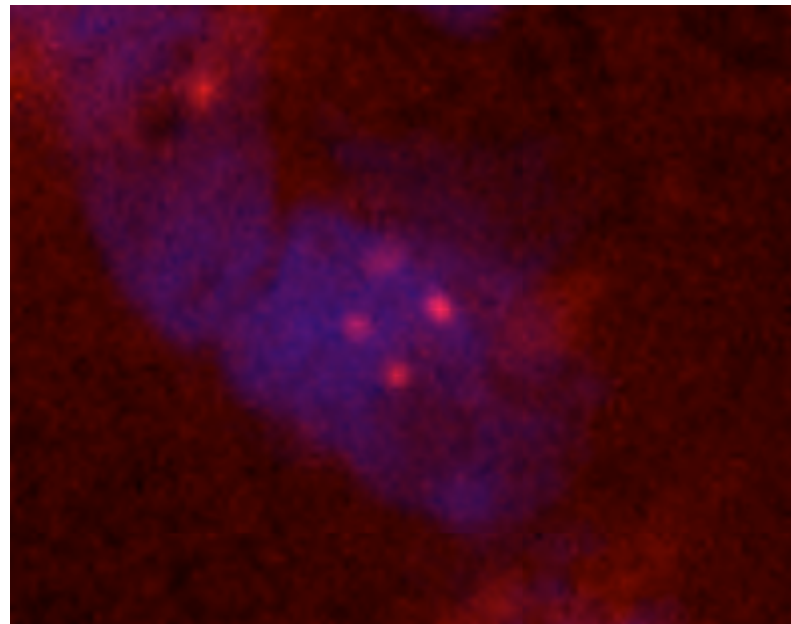
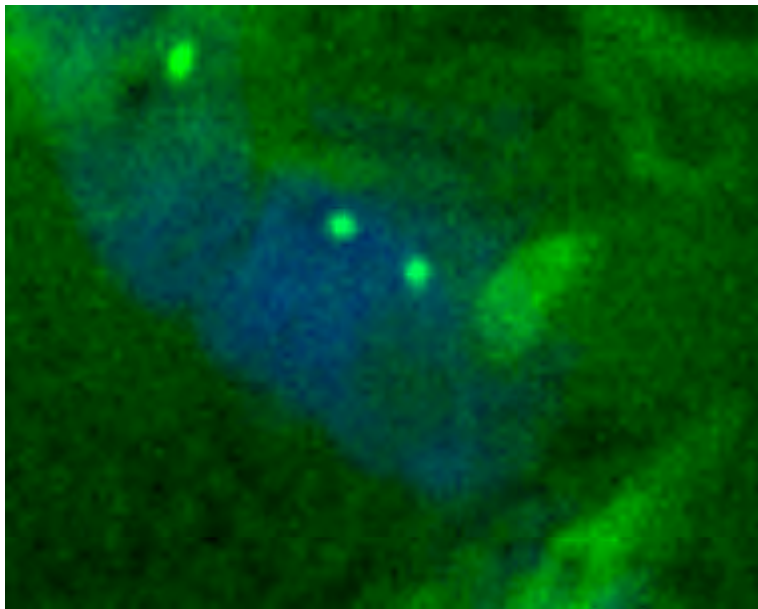
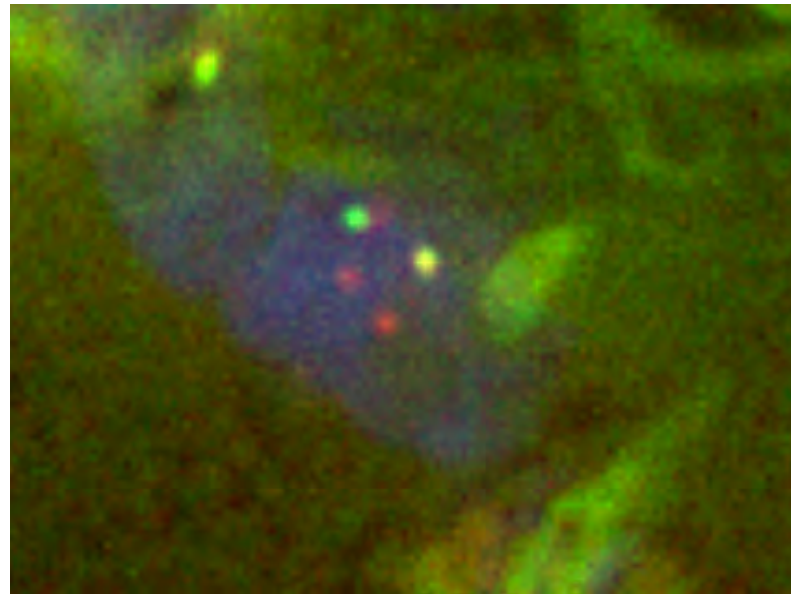
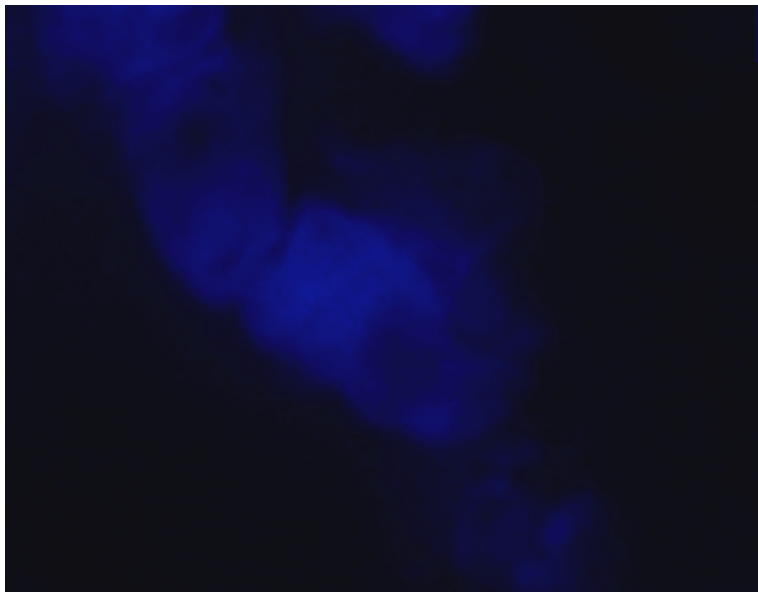
Impact des nouvelles techniques: la minisonde





Optimisation de la lecture

- Systèmes de lecture automatisée des lames en Z dans l'épaisseur de la coupe
- Microscopes+ platine automatisée+ chargeur de lames+ logiciel de traitement d'image
- Scanners de lames adaptés à la FISH
- Intérêt des systèmes permettant l'échange d'images par internet



On SRock DAPI-5060C-000 SRock FITC-2024B-000 SRock SpRed-B-000

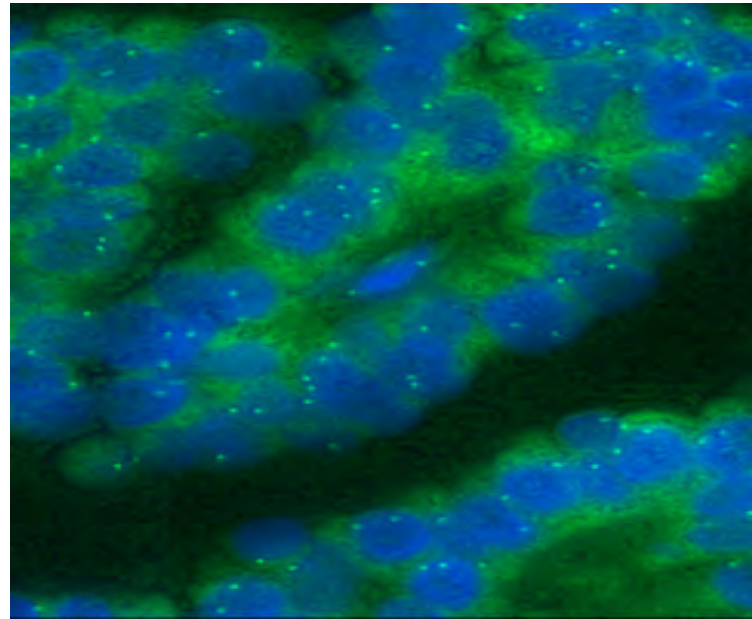
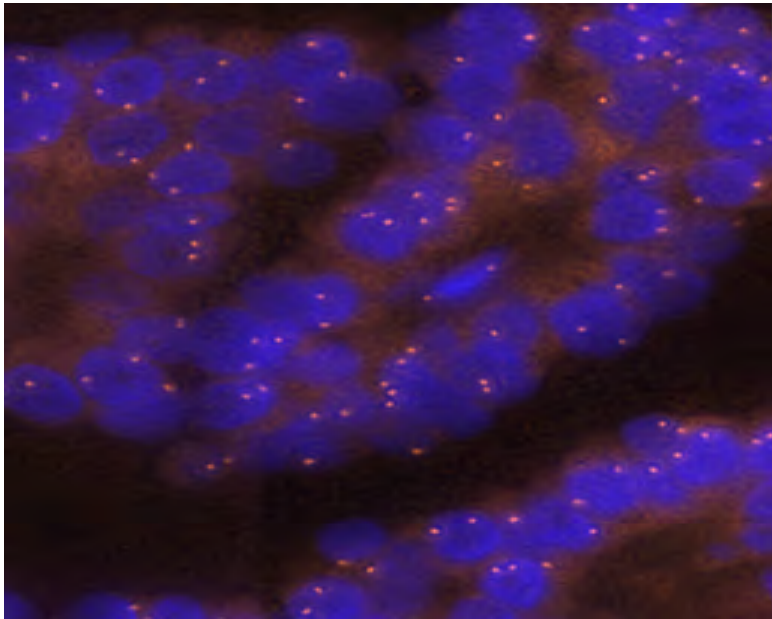
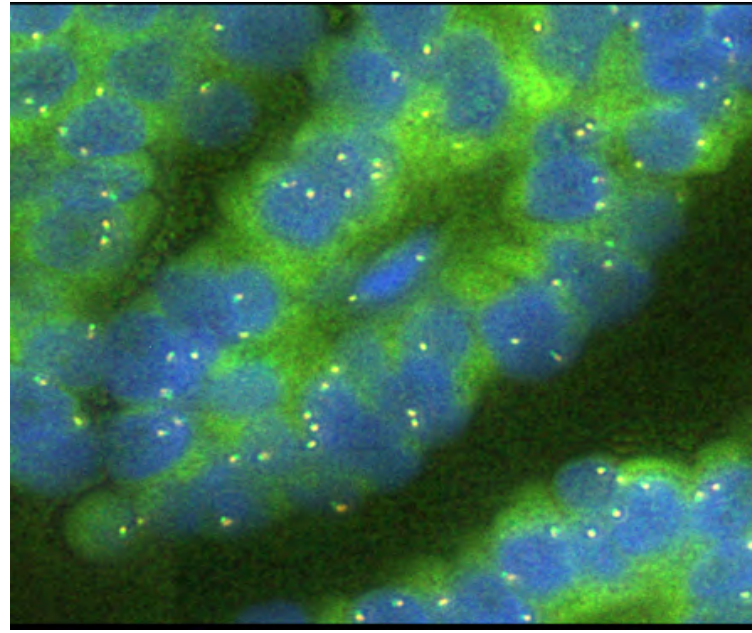
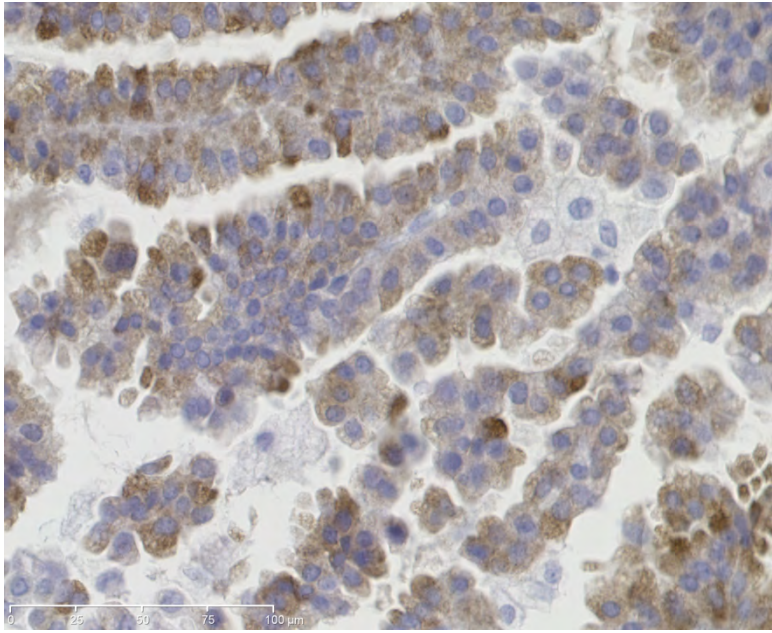
Background color :

+

👤

✂

📄




IQ FISH

Noyaux larges plus faciles à identifier et isoler

➤ Signaux verts et rouges **robustes**

➤ Contage précis

	IQ FISH	DD-ISH
	DAKO	VENTANA
Tampon	Ethylène carbonate	Formamide
Durée d'hybridation	1à 2 heures	6 heures
Toxicité	non	
Tolérance aux variations de préanalytique	+++	++
Robustesse	+++	++

Place du NGS dans la détection des réarrangements?

FISH Testing Misses Drug-Targetable EML4-ALK Rearrangements in Lung Adenocarcinoma *The Oncologist* February 26, 2015

Abel, Haley J. et al. “Detection of Gene Rearrangements in Targeted Clinical Next-Generation Sequencing.” The Journal of Molecular Diagnostics : JMD 16.4 (2014): 405–417.

ILLUMINA



©2012, Illumina Inc. All rights reserved.

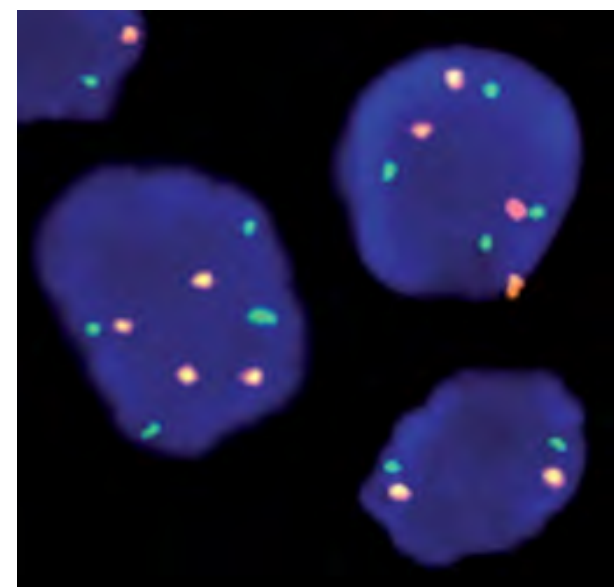
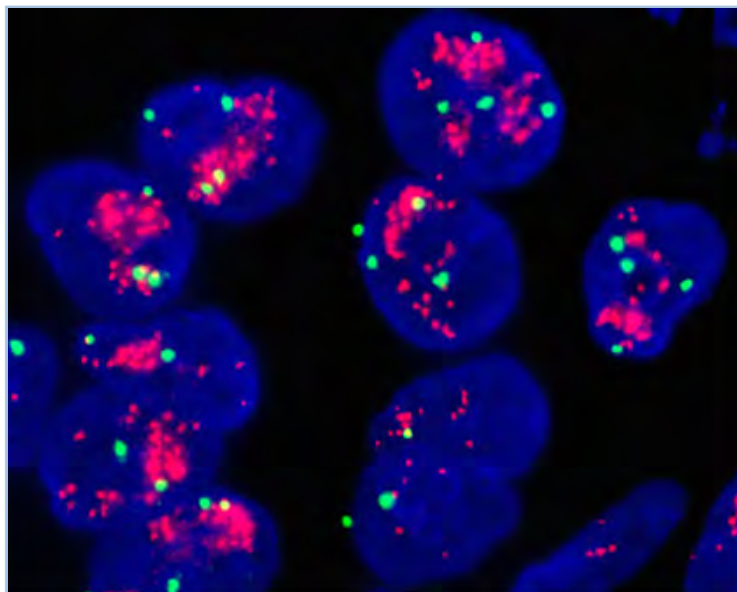
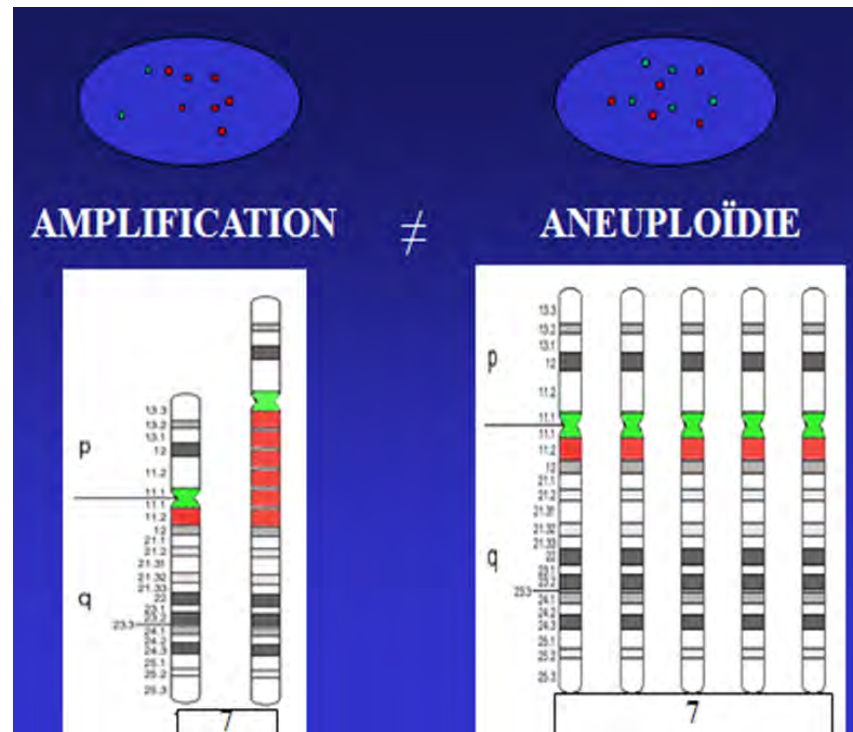
LIFE TECHNOLOGY



Détection d'une amplification CMET, FGFR1

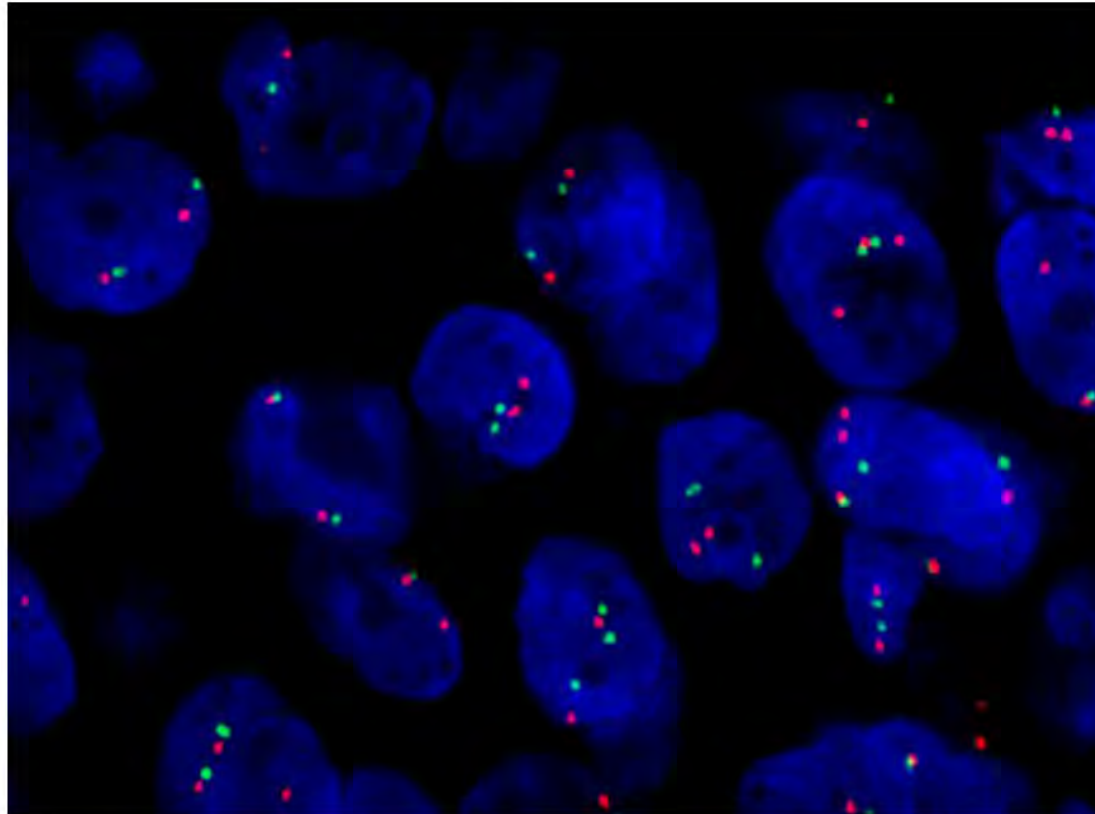
- Sonde spécifique de la séquence cible
- Sonde centromérique du chromosome porteur du gène cible

- Analyse
 - Nombre de copies du gène cible
 - Nombre de copies du centromère
 - Ratio copies gène cible/copies centromère



FGFR1

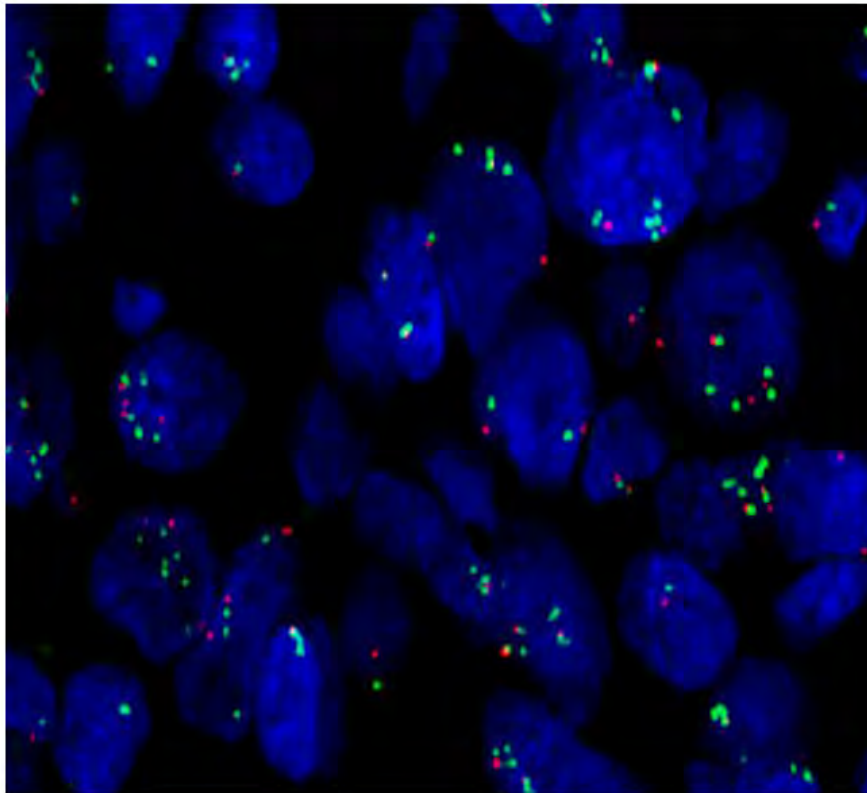
- Absence d'amplification : cible/centromère # 1



FGFR1
CEN8

- Gain ou « faible degré »
d'amplification

Cible/centromère $2 < < 4$

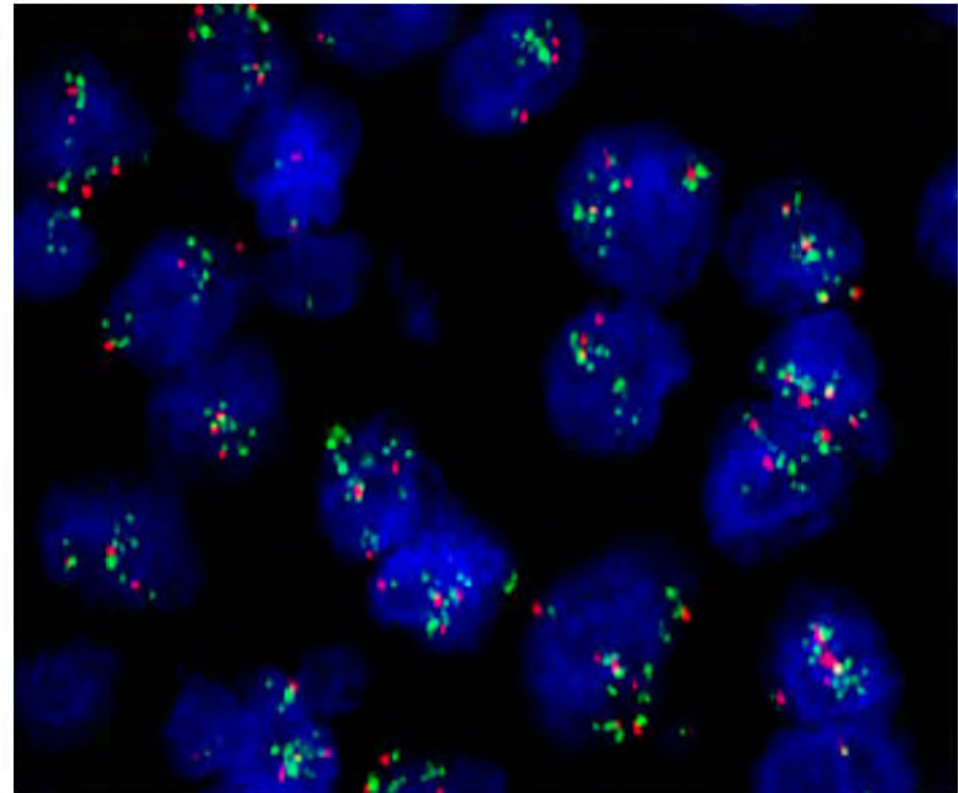


FGFR1

CEN8

- « Fort degré »
d'amplification

Cible/centromère > 4



Chromogenic *in situ* hybridization (CISH)

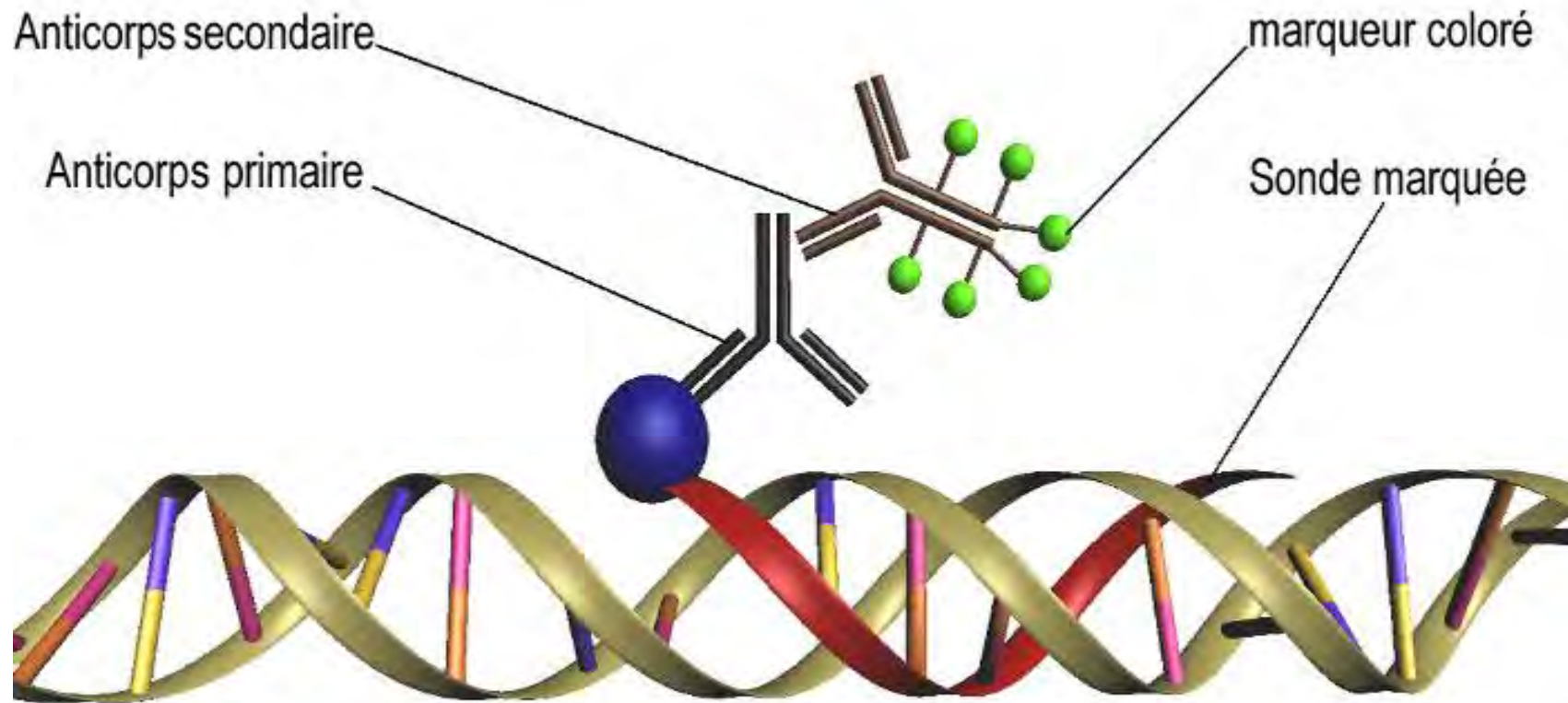
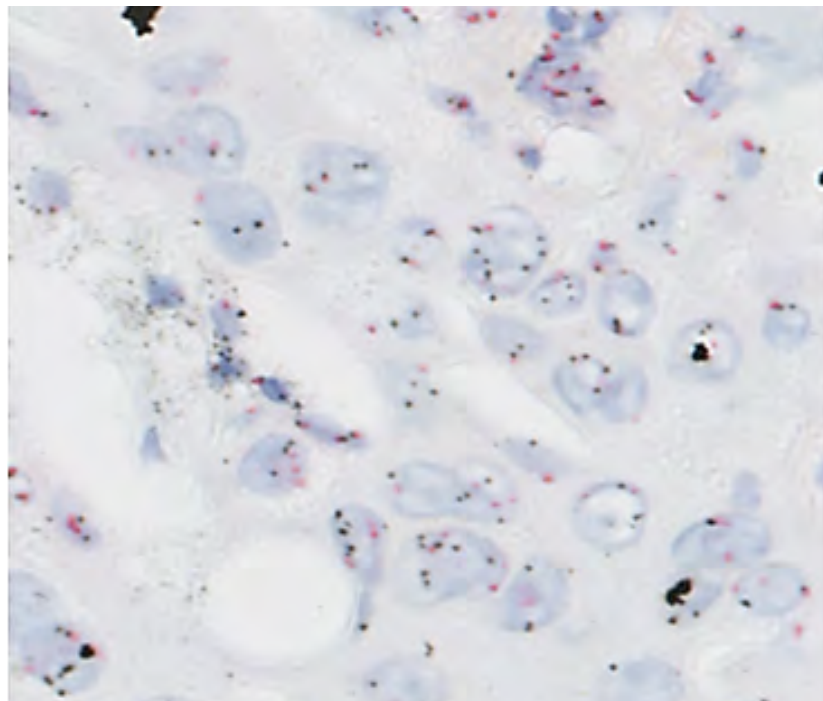


image empruntée au site d'HISTALIM

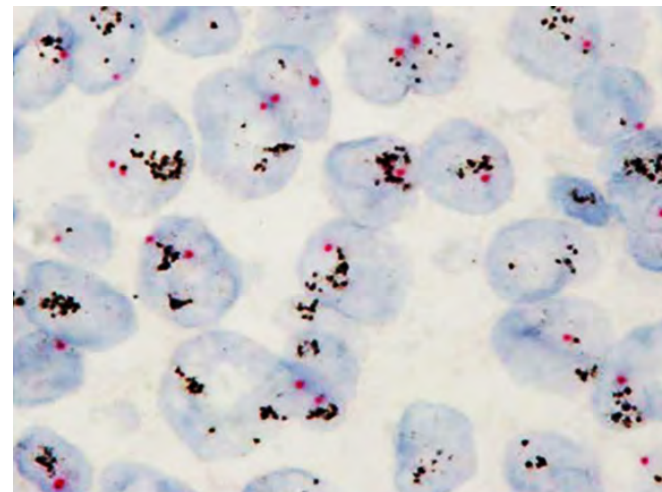
- **gène MET:** sonde marquée au dinitrophényl (DNP),
Kit de détection *ultraView* SISH DNP (HIS argentique).
- **Centromère du Chr 7:** sonde marquée a la digoxigénine (DIG)
Kit de détection *ultraView* Red ISH DIG



Polysomie



Amplification



Inhibition des points de contrôle : PD-1/PD-L1

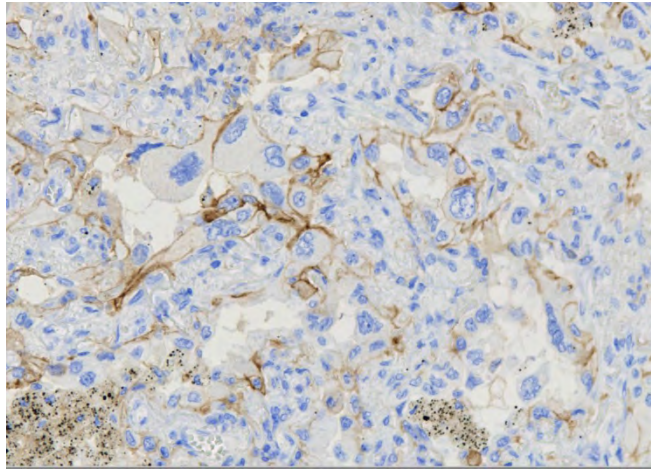
Quels facteurs prédictifs : Expression de PD-L1

	Anti PD-1		Anti PD-L1	
	Nivolumab	Pembrolizumab	MEDI-473	MPDL3280
Total (n)	236	149	58	53
Taux de réponse	21%	17%	16%	23%
PD-L1 + (n)	201	33	20	26
Taux de réponse	23%	15%	25%	31%
PD-L1 – (n)	35	35	29	20
Taux de réponse	9%	14%	3%	20%

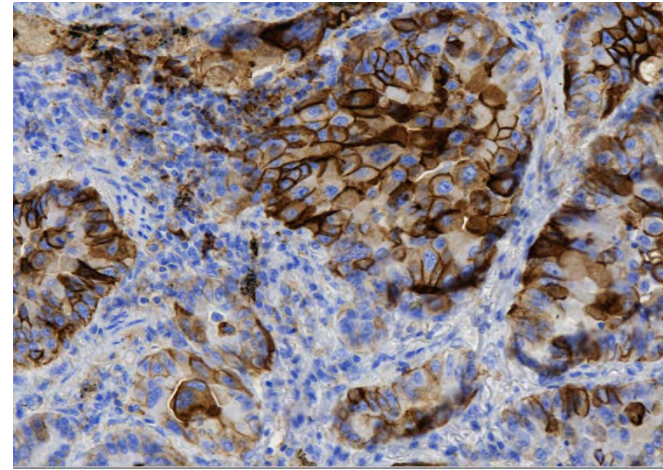
Immunothérapie

Aujourd'hui... et demain?

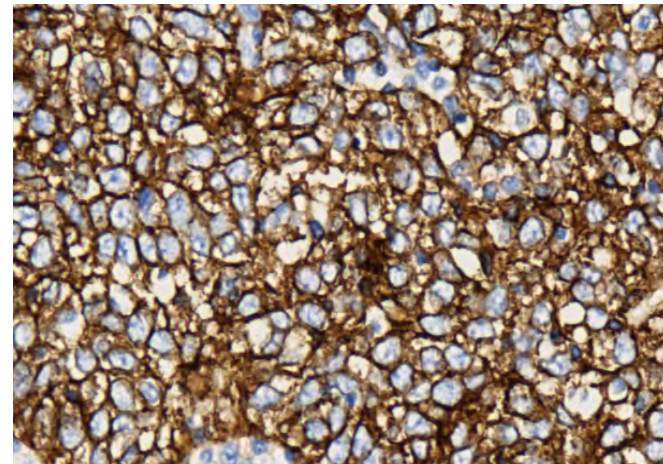
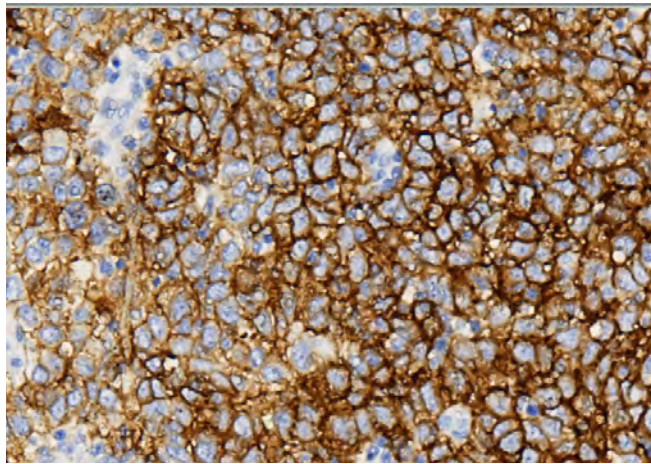
- Il existe **des** anticorps anti PDL1
- La détermination du statut PDL1 n'est pas requise
- Mais efficacité > si fort marquage (KEYNOTE 001)
- Evalué dans les essais cliniques, études, autres tumeurs (adénocarcinomes, mésothéliome, thymomes?)
- Coût ++, efficacité variable
- Demain : Requis? Quelles cellules? Seuil ?, Test compagnon? Autres marqueurs? Signature moléculaire?
Groupe de travail INCa



E1L3N Cell signaling



DAKO 22C3



Conclusion

- Immunohistochimie:
 - *Diagnostic type tumoral*
 - *Screening réarrangements*
 - *Place à déterminer dans l'immunothérapie*
- Hybridation in situ
 - FISH: gold standard réarrangements
 - CISH: réservée aux amplifications

Mais limites techniques, multiplication des cibles
- Solution NGS plateformes