Mise au point du test immunohistochimique anti-pan TRK pour la détection des réarrangements des gènes *NTRK1* à *3* dans les tumeurs et proposition d'une stratégie basée sur l'immunohistochimie pour la détection de ces réarrangements

par Marie Csanyi-Bastien

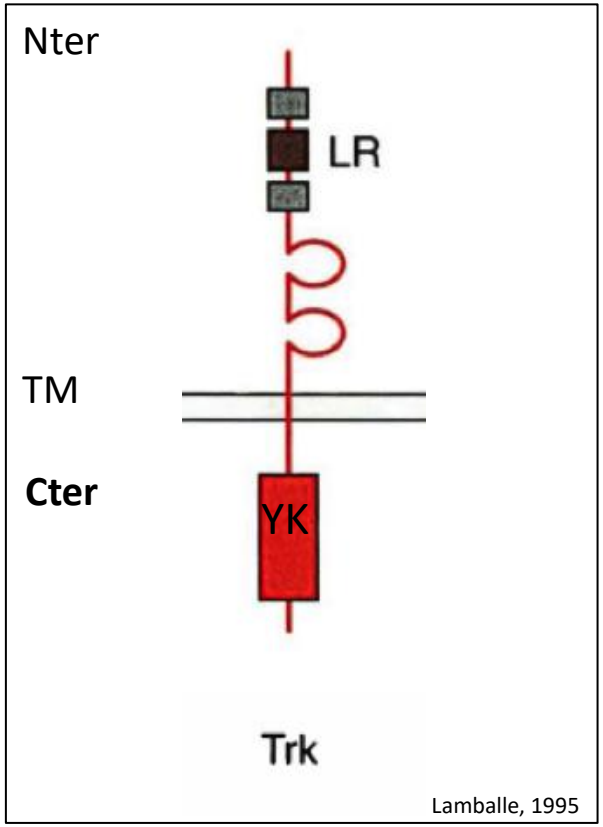
Travail effectué sous la direction du Pr SABOURIN et du Dr MARGUET
Pathologistes au CHU de Rouen

Introduction

Gènes *NTRK* (Neurotrophic Tyrosine Kinase Receptor) :

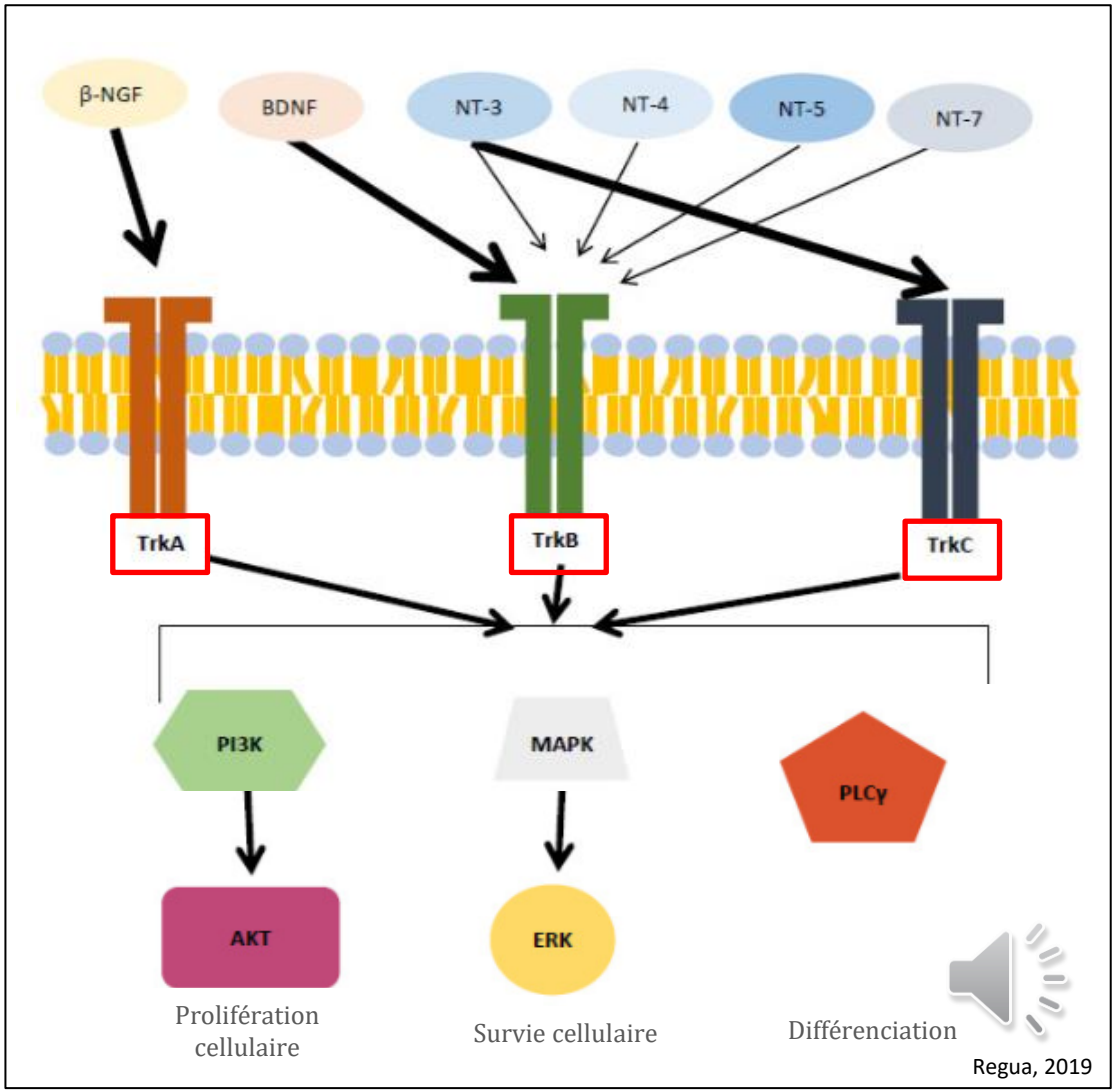
NTRK1	***NTRK2***	***NTRK3***
chromosome **1**	chromosome **9**	chromosome **15**
↓	↓	↓
TRKA	**TRKB**	**TRKC**

TRK (Tropomyosin Receptor Kinase) :
Récepteurs tyrosine kinase



Lamballe, 1995

Expression normale par
les **tissus neuronaux**



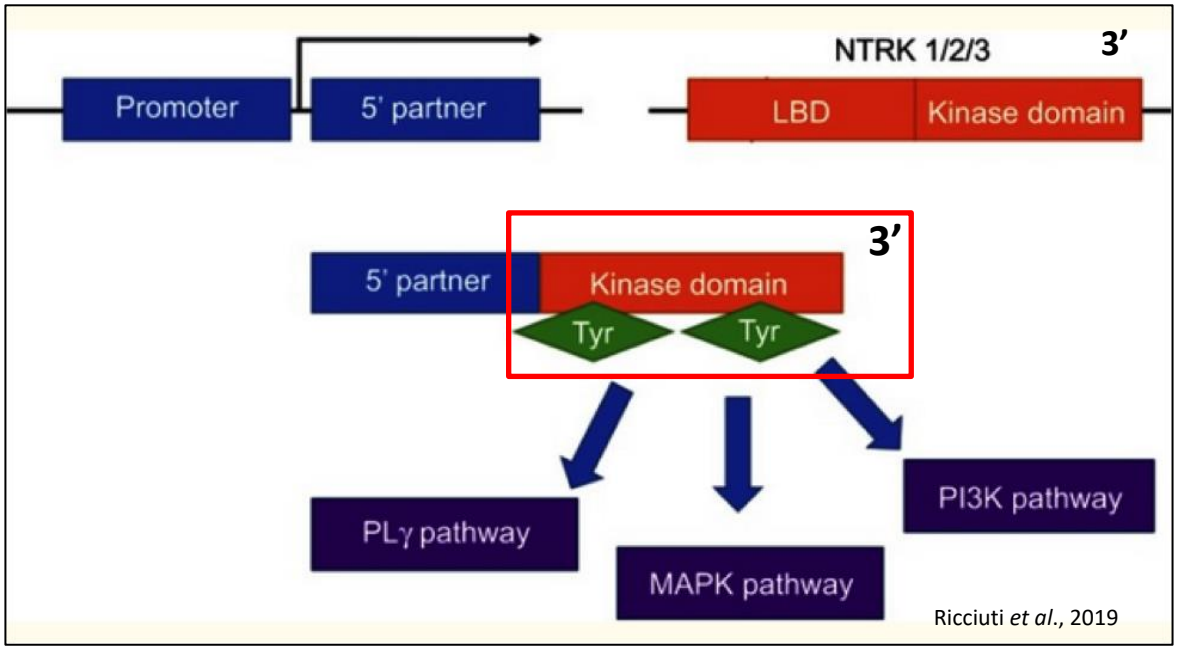
Regua, 2019

Réarrangement des gènes *NTRK* en pathologie tumorale :

NTRK1 à *3* : **oncogènes**
activation par **fusion génique**

partie 5' partenaire – **partie 3' *NTRK***
nombreux partenaires de fusion

anomalie **driver**



Réarrangement des gènes *NTRK* : **fréquent** dans les **tumeurs rares**
et **rare** dans les **tumeurs fréquentes**

Taux de réarrangement >90 %	**Taux de réarrangement 5-25 %**	**Taux de réarrangement <5 %**
Carcinome sécrétoire mammaire	Carcinome papillaire de la thyroïde	Cancer côlon (MSI+, promoteur *MLH1* méthylé)
MASC salivaire	GIST WT *PDGFRA, KIT, SDH, NF1*	Cancer poumon
Fibrosarcome infantile	Tumeurs mélaniques spitzoïdes	Cancer bilio-pancréatique, cholangiocarcinome
Néphrome mésoblastique congénital	Gliomes	Cancer du sein
		Cancer tête et cou
		Mélanome
		Sarcomes
		Hémopathies
		Gliomes
Tumeurs rares		**Tumeurs fréquentes**

Enjeux de la détection des réarrangements des gènes *NTRK* :

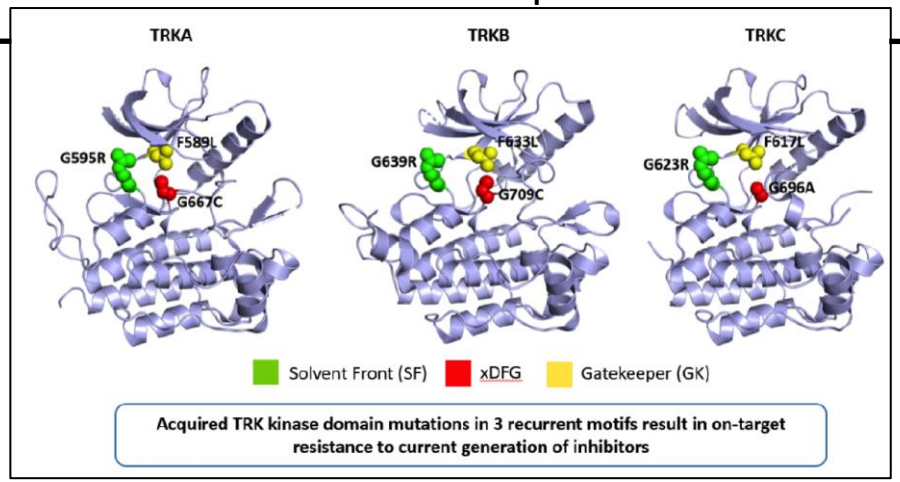
- Diagnostique
- **Thérapeutique : inhibiteurs de tyrosine kinase (ITK)**

ITK sélectifs de TRK

Larotrectinib
(1ère génération)

Bayer global

Résistance acquise



Hyman *et al.*, 2019

LOXO-195 (2ème génération)

ITK multi-kinases (TRK, ALK, ROS1, JAK2)

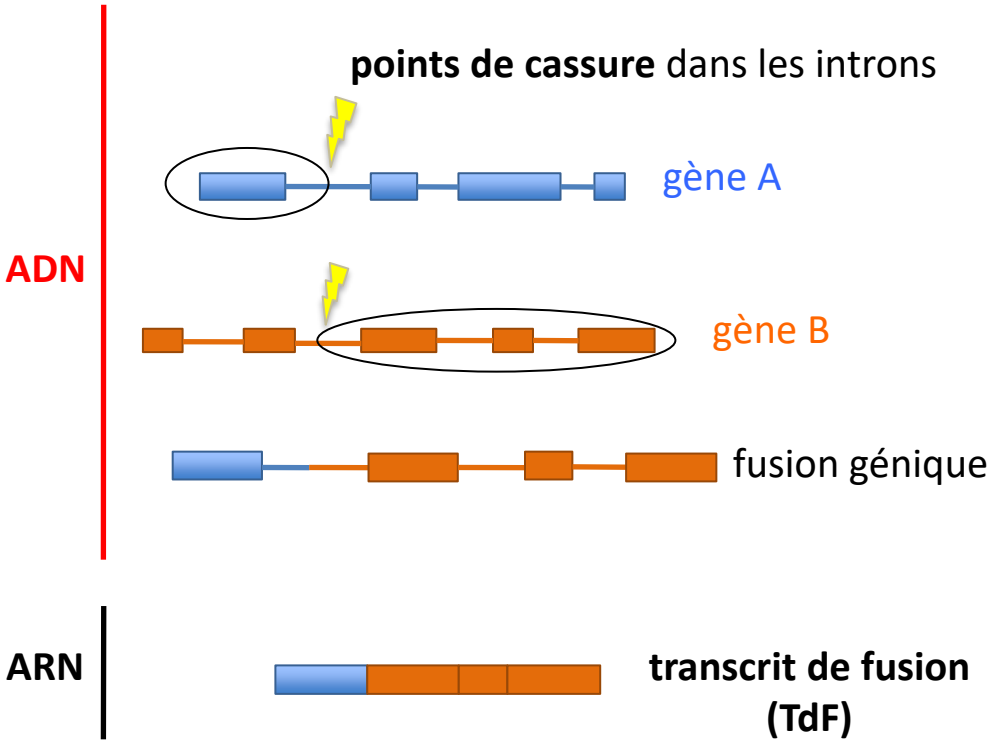
Entrectinib (1ère génération)

Repotrectinib (2ème génération)

Mode de constitution des fusions géniques et moyens de détection :

voie canonique

Réarrangements structuraux de l'**ADN**



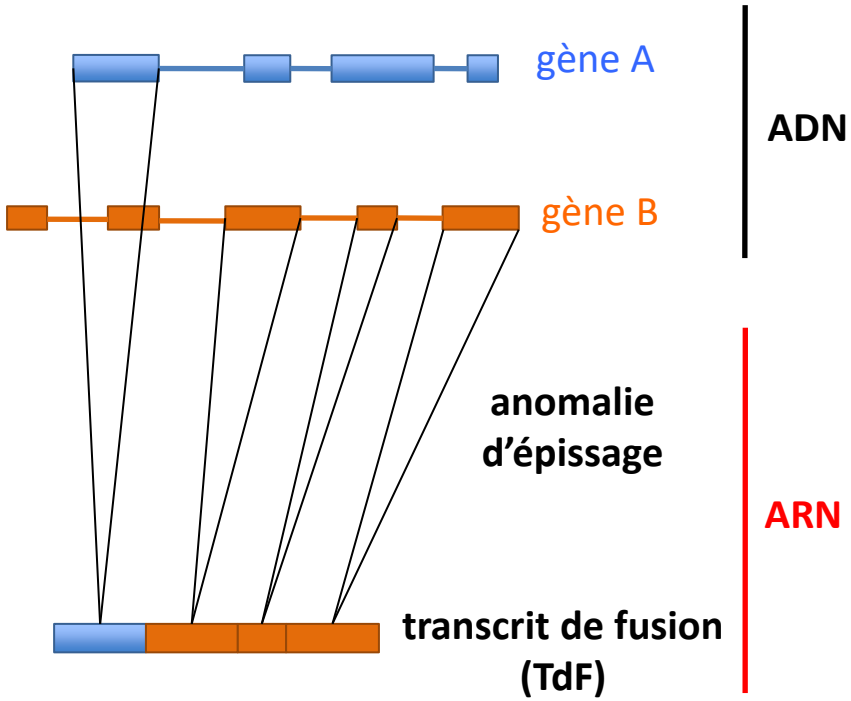
méthodes de détection :

FISH

NGS en ADN

voie non canonique

Fusion de transcrits lors de l'épissage de l'**ARN**



méthodes de détection :

RNA-Séq

RT-PCR

NanoString

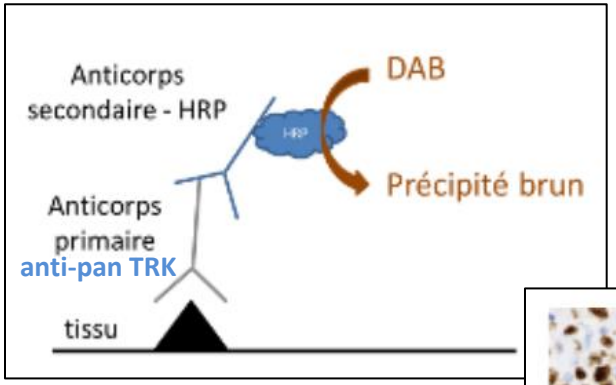
PROTEINE

Immunohistochimie (IHC)

Objectifs

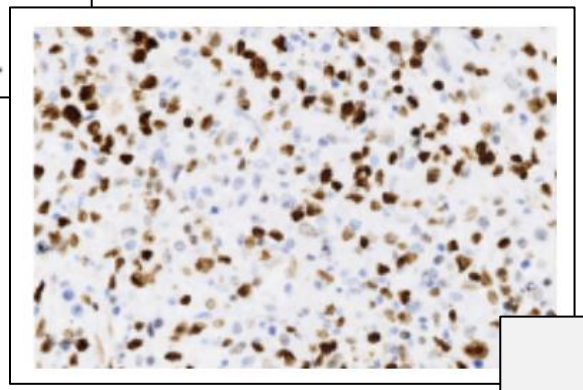
✓ **Mettre au point et comparer les 3 anticorps anti-pan TRK disponibles** pour détecter les réarrangements des gènes *NTRK*

Anticorps (Ac) anti-pan TRK

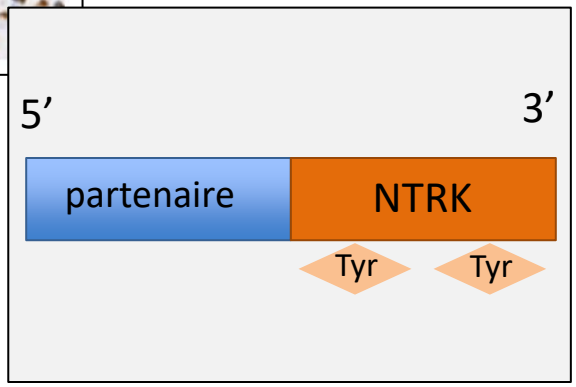


erasme.ulb.ac.be

surexpression TRK



fusion
NTRK1/2/3 ?



✓ **Proposer une stratégie diagnostique basée sur l'IHC** pour la détection de ces réarrangements

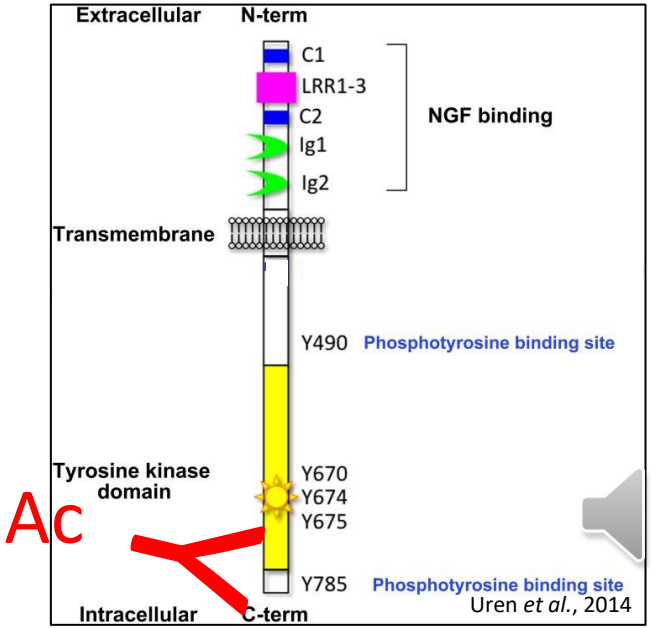
Matériel et méthode

Choix des anticorps primaires anti-pan TRK à tester :

2 clones disponibles, **3 fournisseurs**

	clone EPR17341	clone EPR17341	A7H6R
Distributeur	Roche	Abcam	Cell Signaling
Référence	790-7026	ab181560	92991
Spécificité de l'anticorps primaire	pan-Trk	pan-Trk	pan-Trk
Région ciblée des protéines TrkA/B/C	?	vers l'acide aminé 800	vers l'acide aminé 791
Statut	IVD diagnostic	RUO recherche	RUO recherche
Caractéristiques de l'anticorps : - type	IgG	IgG	IgG
- mono/polyclonal	monoclonal	monoclonal	monoclonal
- espèce	lapin	lapin	lapin
Format	seringue prédiluée (5mL pour 50 tests)	flacon anticorps pur 100 µL	flacon anticorps pur 100 µL
Automate	BenchMark	adaptable	adaptable
Kit de détection	OptiView	adaptable	adaptable

Détection des **protéines sauvages et chimériques** conservant l'expression du domaine en Cter ciblé par l'Ac



Uren *et al.*, 2014

Choix de la procédure d'IHC à appliquer :

diagnostics.roche.com

Ac Roche / Abcam :
déparaffinage
démasquage (**88 minutes**, 100°C, CC1 Tris basique)
blocage peroxydase endogène
incubation Ac primaire (**prédilué / 200ème**) **16 minutes**
lavage
kit révélation Optiview
lavage
DAB (3,3'-DiAminoBenzidine)
lavage
contre-coloration, lamelle

Variations Abcam :
CC1 **92'**
dilution au **100ème** et au **50ème**
incubation **32'**, **44'**, **60'**

Variations Cell Signaling :
CC1 **32'** et **92'**
incubation **32'**

Ac Cell Signaling :
déparaffinage
démasquage (**64 minutes**, 100°C, CC1 Tris basique)
blocage peroxydase endogène
incubation Ac primaire **au 50ème 52 minutes**
lavage
kit révélation Ultraview
lavage
DAB
lavage
contre-coloration, lamelle

Choix des témoins tumoraux (TT) et normaux (TN) positifs et négatifs :

Pour mise au point :
TT + : **fibrosarcome infantile** *ETV6-NTRK3* confirmé en biologie moléculaire
TN - : **rein normal**

Pour vérification :
TT + : **6 MASC salivaires** *ETV6-NTRK3* confirmé en biologie moléculaire
TN + : **tissus neuronaux**
TN - : **tissus histologiquement normaux**

amygdale palatine
glandes salivaires
côlon, grêle
foie, pancréas, vésicule biliaire
urothélium
prostate, testicule
endomètre, endocol, ovaire
poumon
cardiomyocytes
glande mammaire
thyroïde

} méthode de TMA (Tissue MicroArray)

tedpella.com

Choix des tumeurs à tester après mise au point validée :

Cohorte rétrospective de **49 tumeurs**
sélectionnées (critères clinico-histologiques) pour **enrichissement en réarrangements *NTRK***

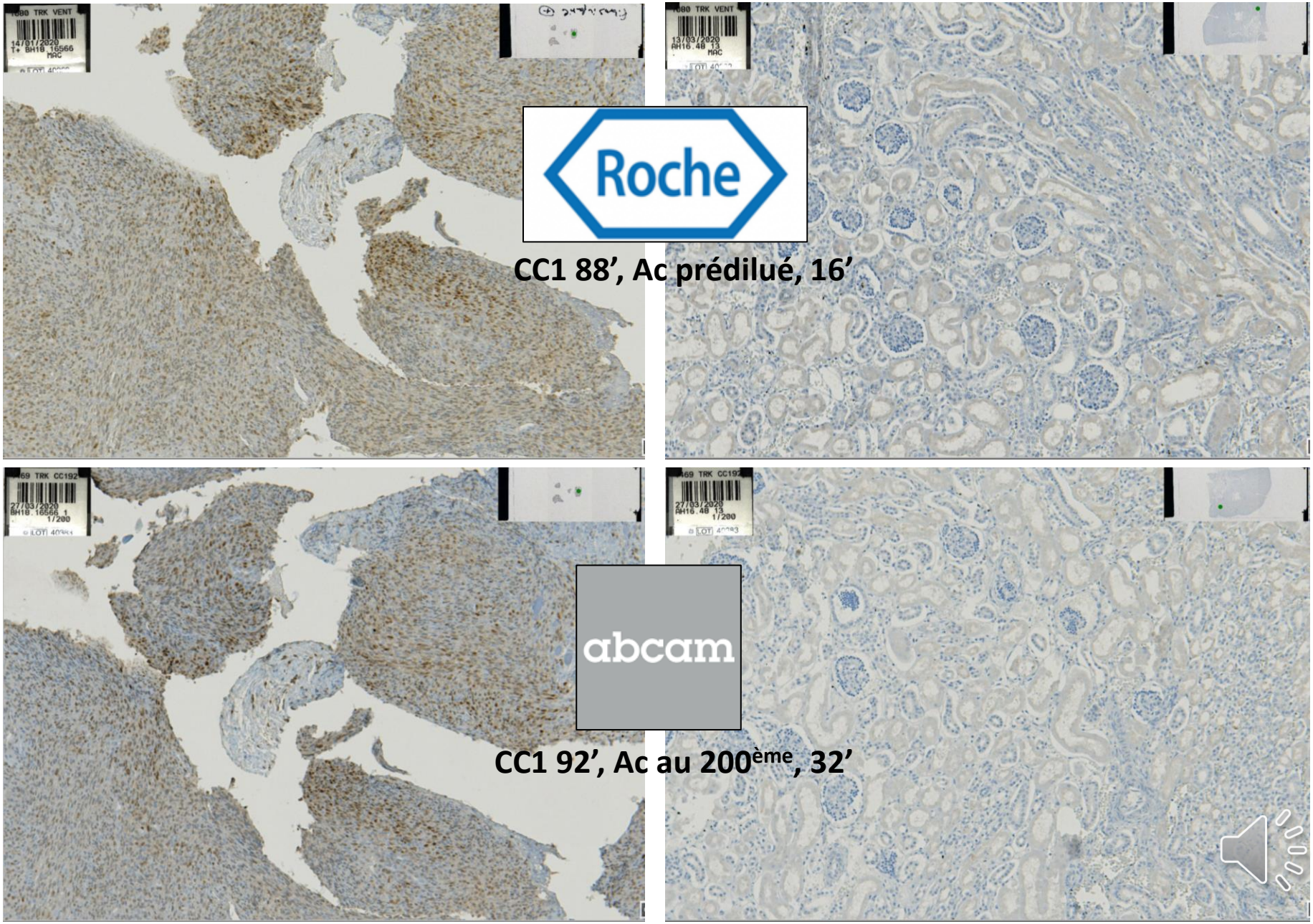
- 3 néphromes mésoblastiques congénitaux
- 11 carcinomes papillaires thyroïdiens
- 11 adénocarcinomes pulmonaires invasifs (sans driver oncogénique)
- 4 adénocarcinomes coliques invasifs (MSI+, MLH1 et PMS2 – en IHC, *BRAF* WT)
- 3 adénocarcinomes endométrioïdes invasifs de l'endomètre
- 3 tumeurs neuroendocrines
- 5 GIST (WT)
- 3 léiomyosarcomes
- 3 rhabdomyosarcomes
- 3 glioblastomes

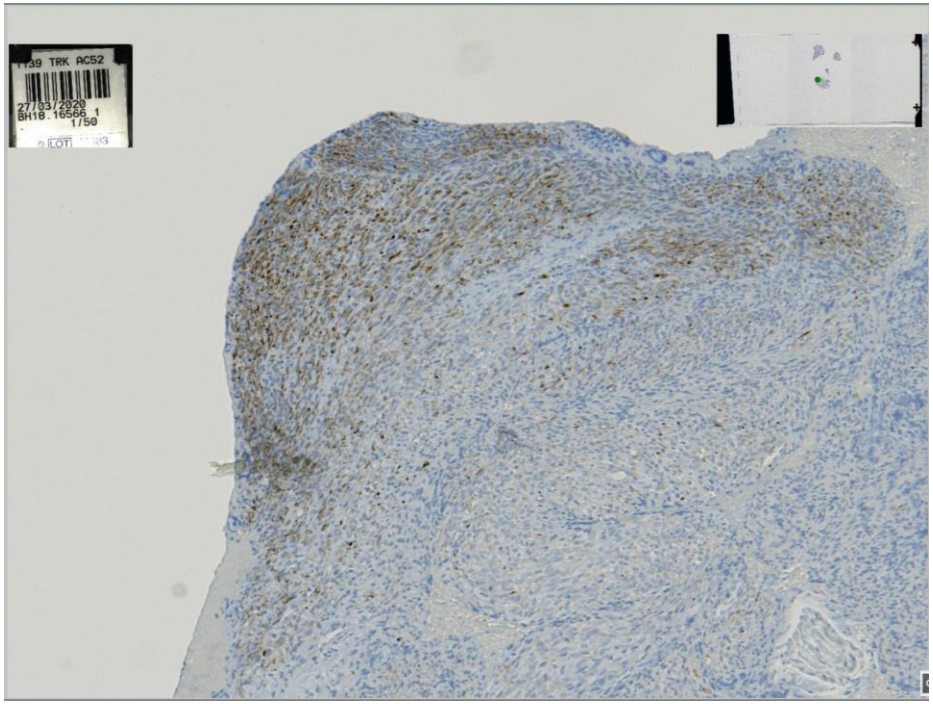
Analyse moléculaire (FISH +/- RNA Séq) des cas positifs en IHC

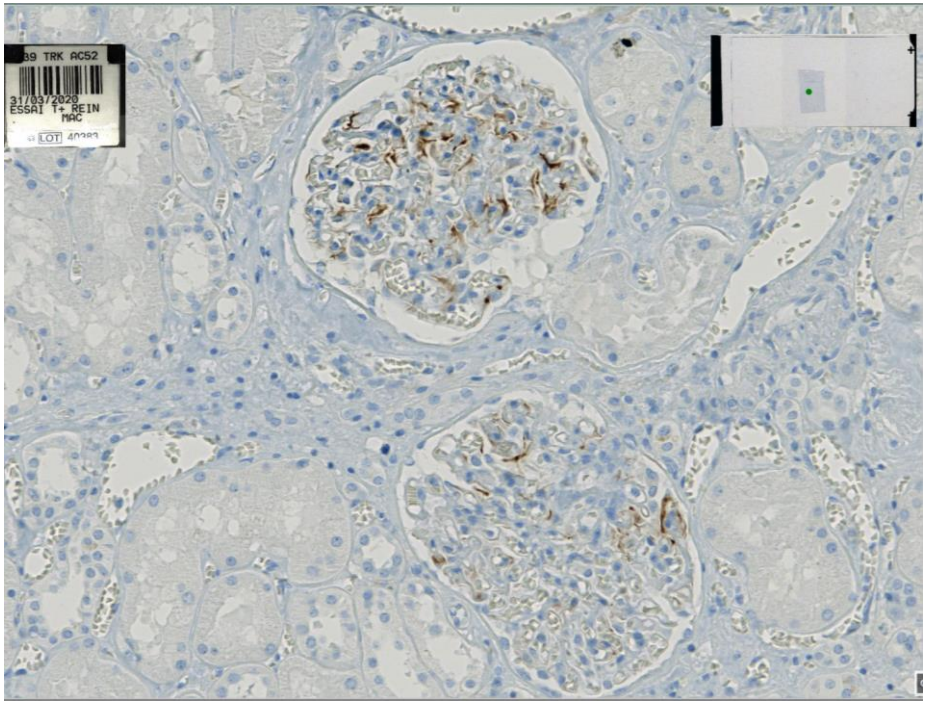
Résultats

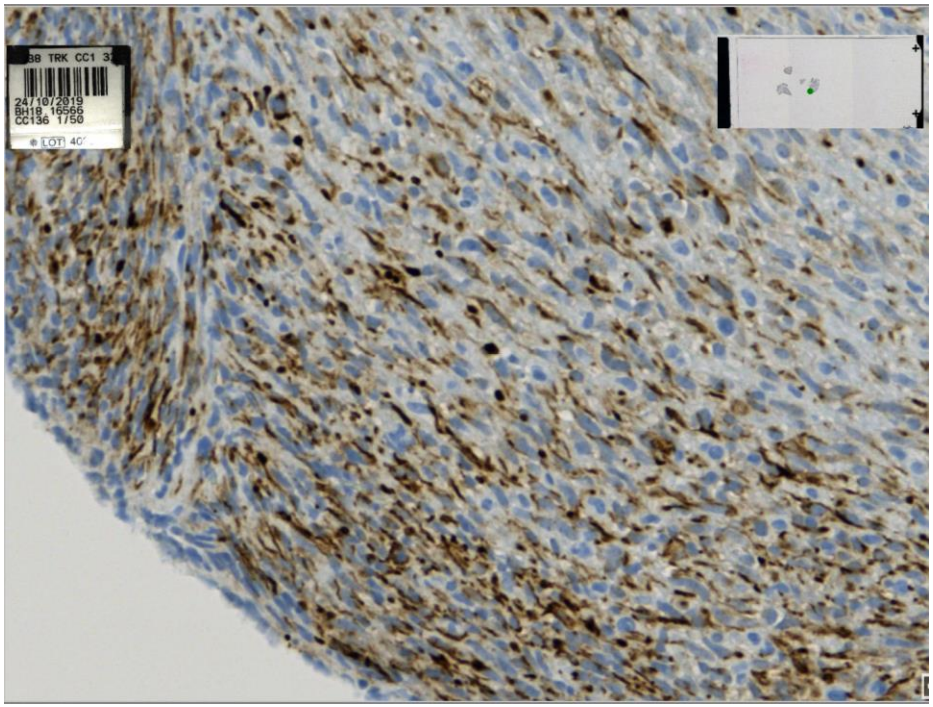
Mise au point des immunomarquages :

TT + **TN -**









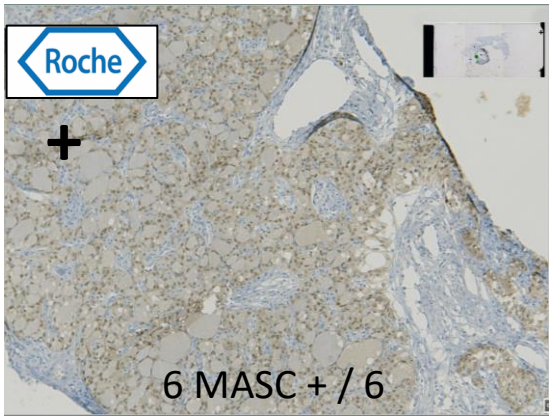
Cell Signaling TECHNOLOGY

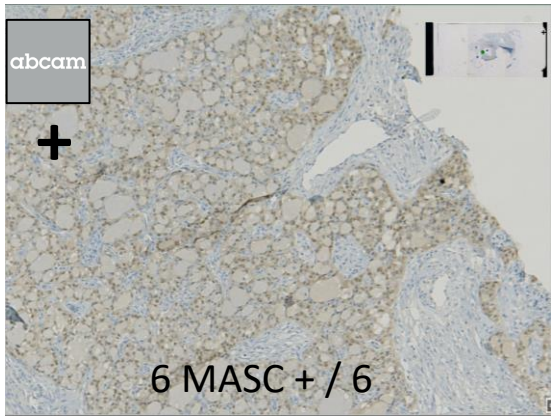
CC1 32’, Ac au 50ème, 52’

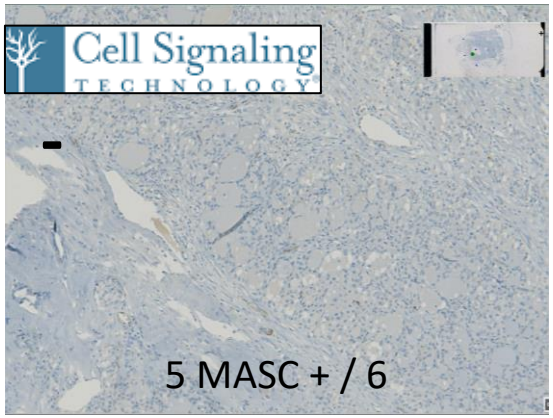
Validation de la procédure d'immunomarquage :

TT +

MASC

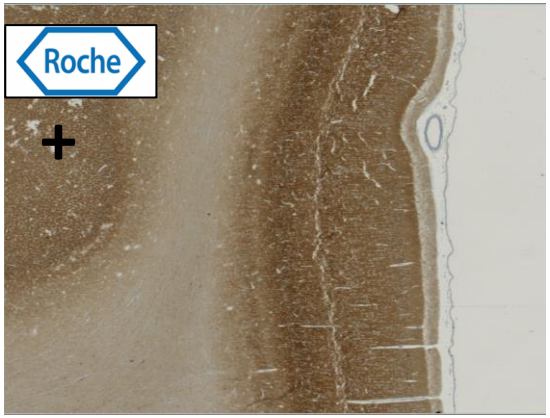


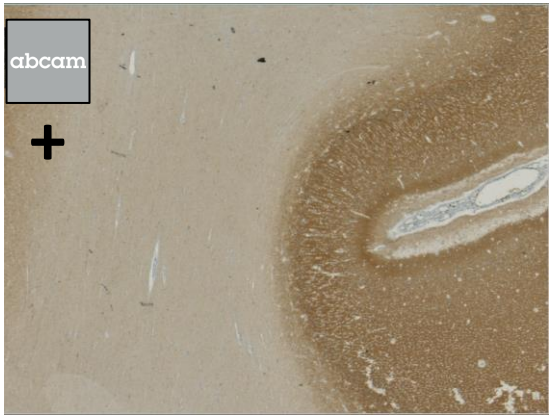


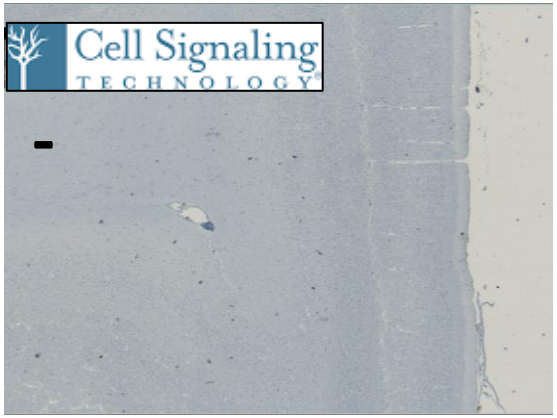


TN +

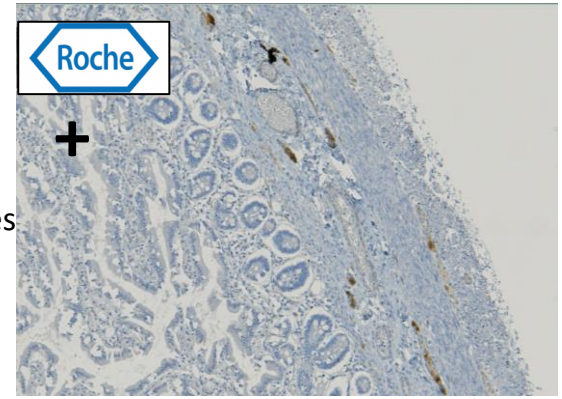
cerveau

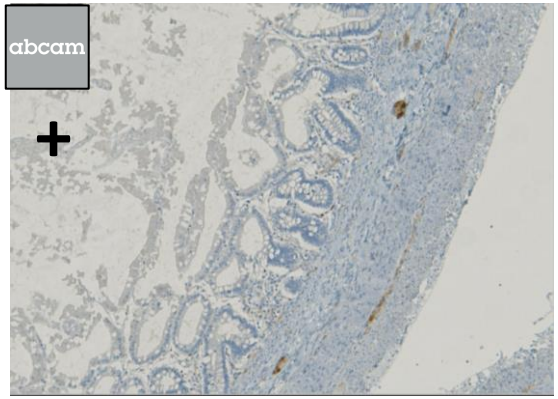


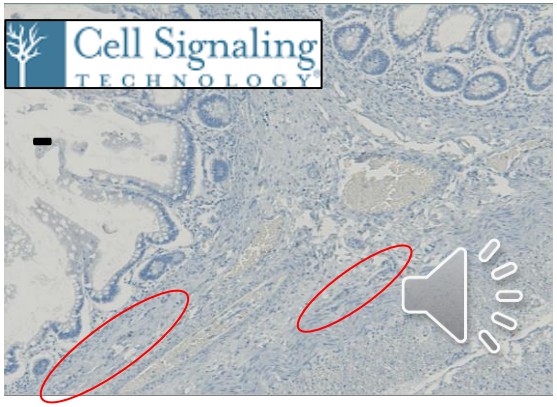




cellules neuro-ganglionaires

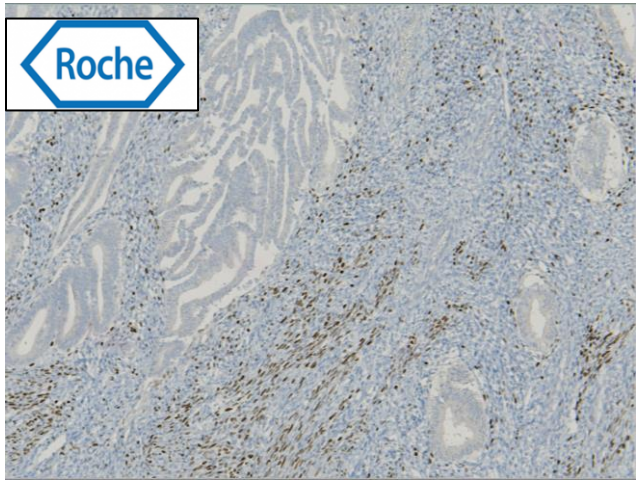


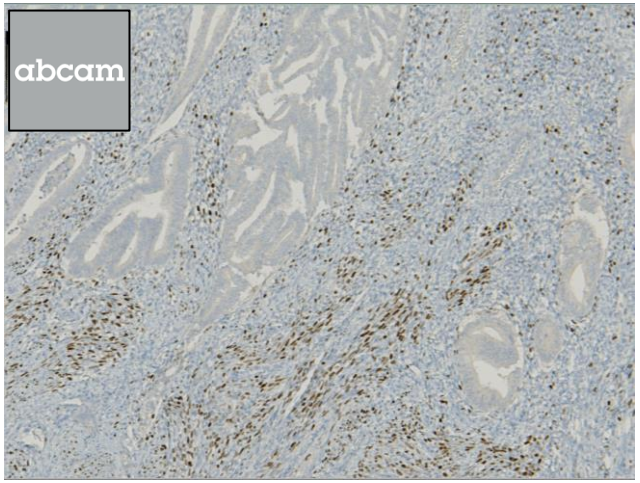


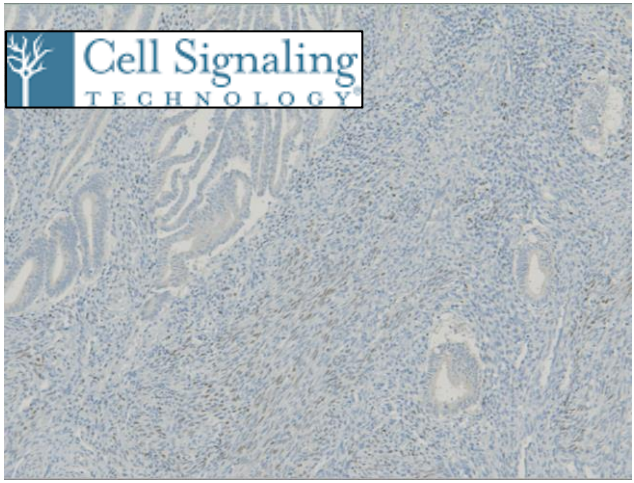


TN -

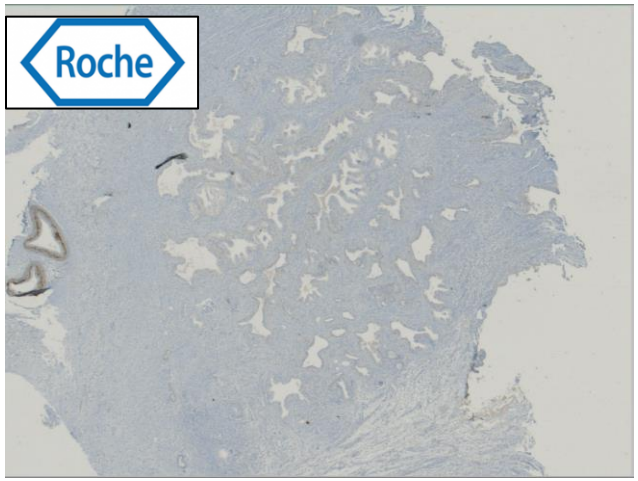
endomètre et myomètre

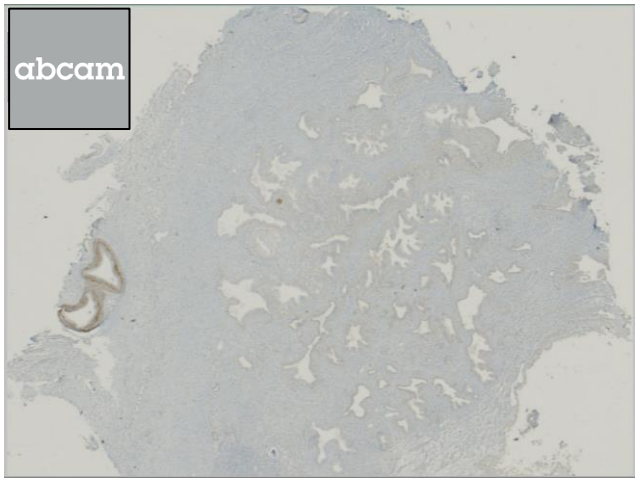


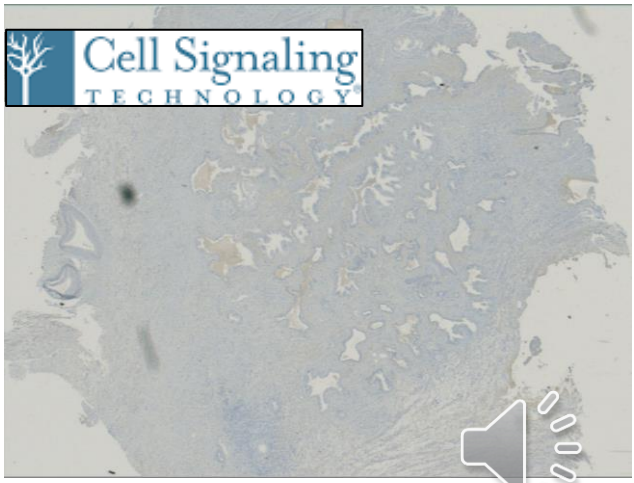




prostate

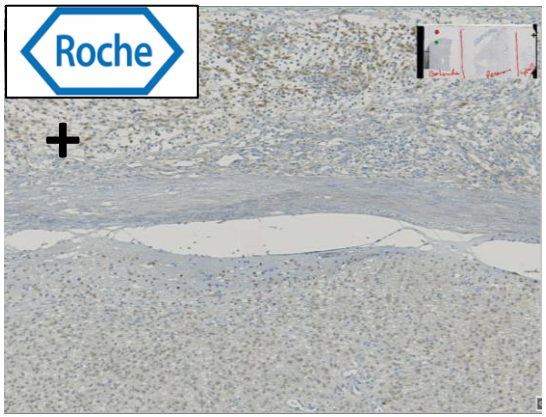


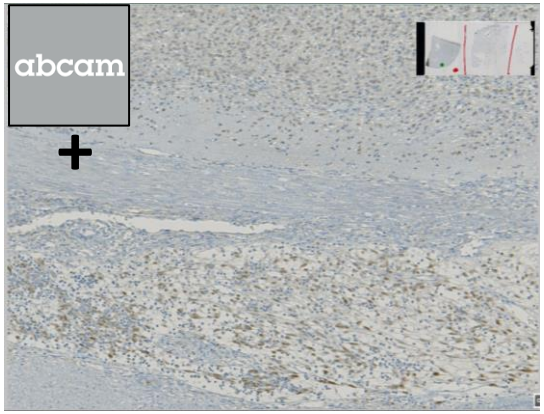


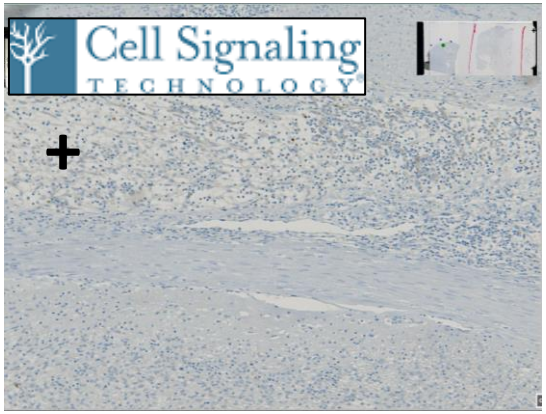


Tests immunohistochimiques sur la série rétrospective de 49 tumeurs :

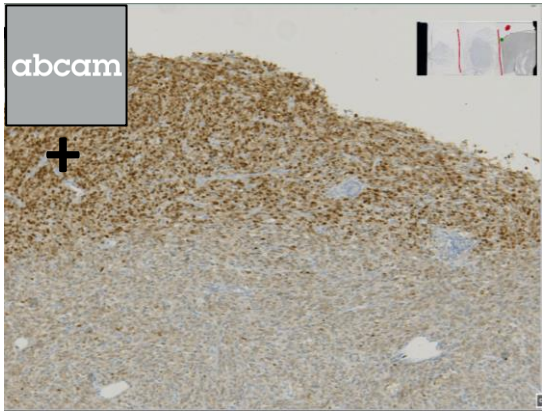
3 néphromes mésoblastiques congénitaux

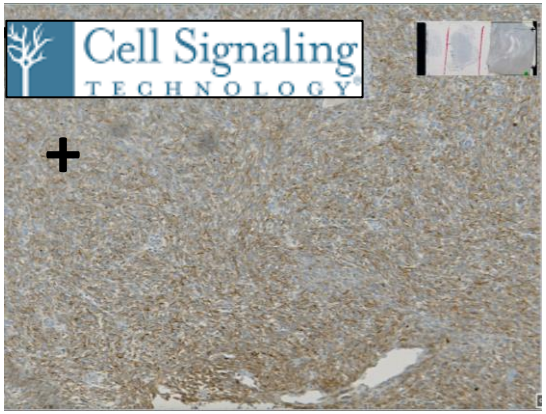




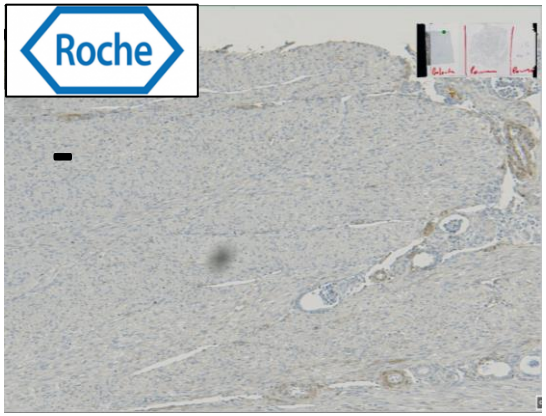


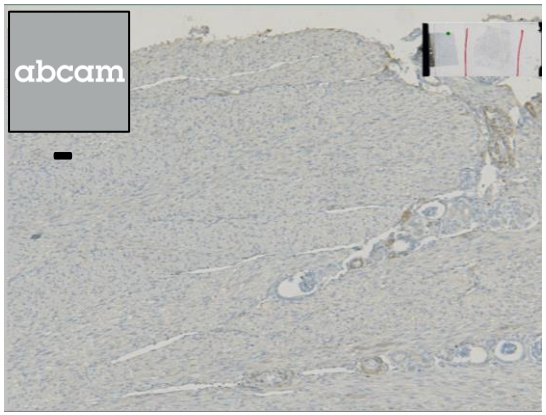
ETV6 - NTRK3 +

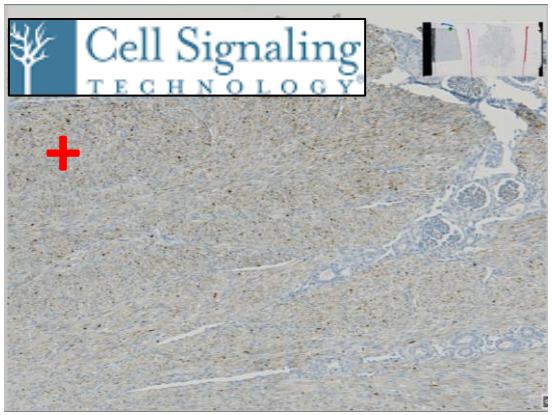




ETV6 - NTRK3 +

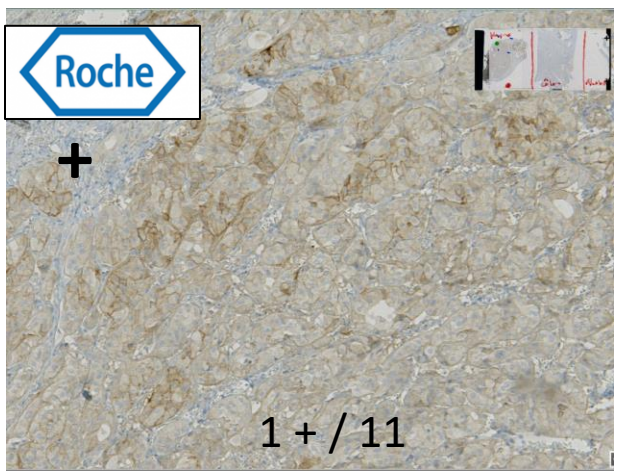


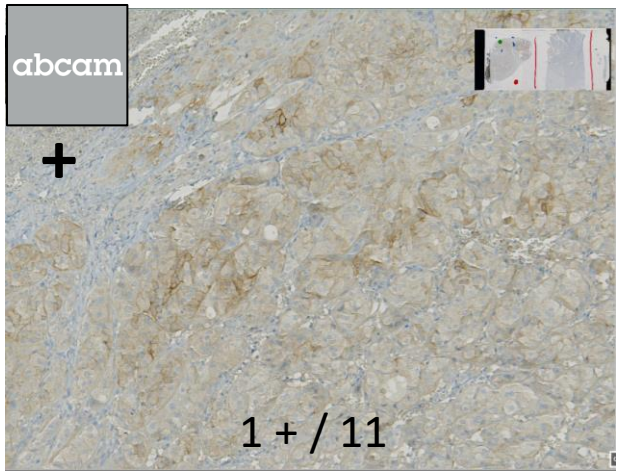


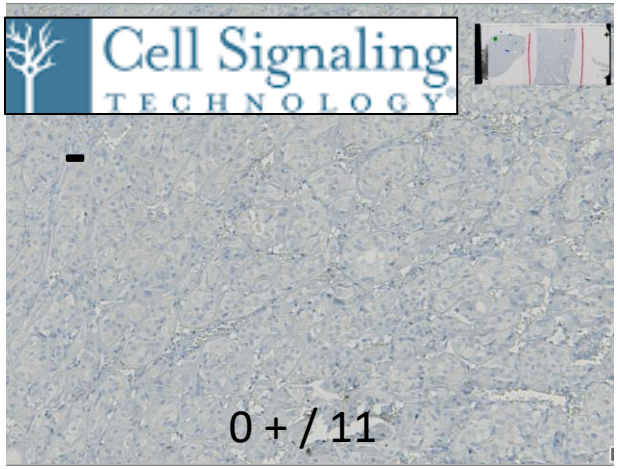


ETV6 - NTRK3 -

11 carcinomes papillaires de la thyroïde

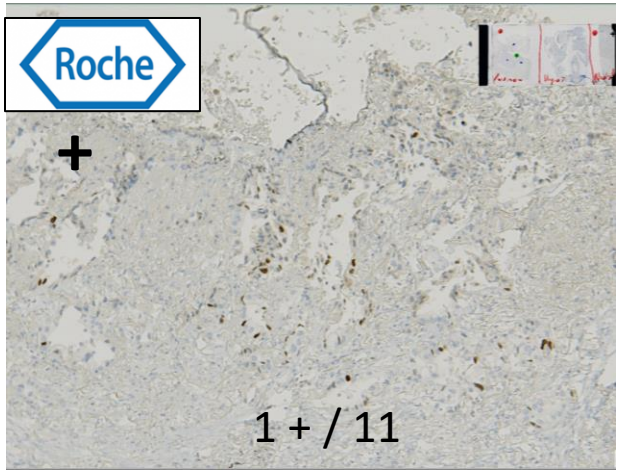


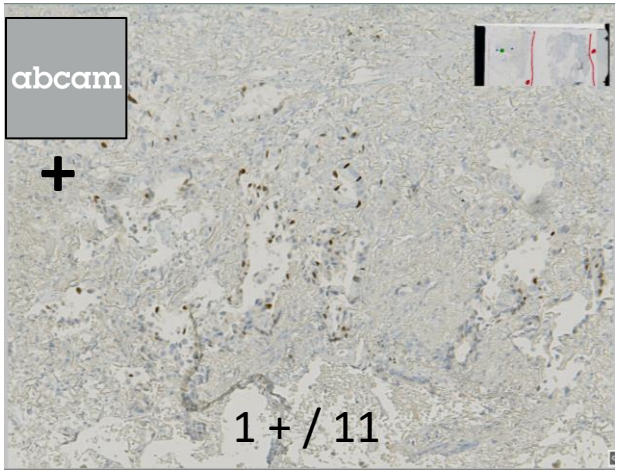


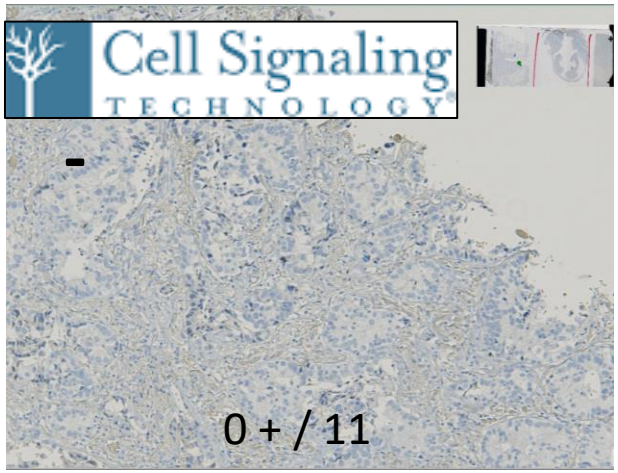


Biologie moléculaire : pas de réarrangement des gènes *NTRK*

11 adénocarcinomes pulmonaires invasifs



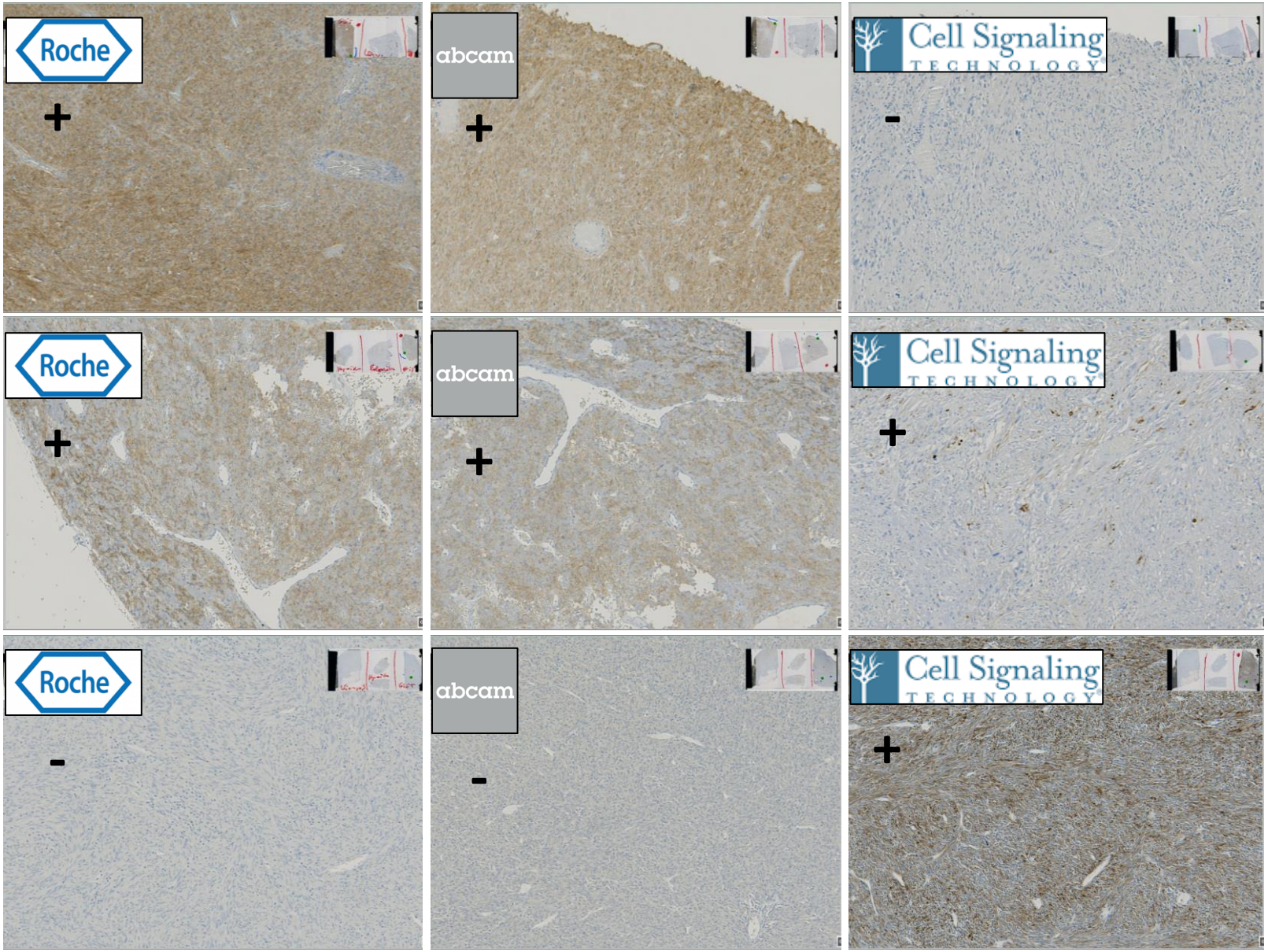




Biologie moléculaire : pas de réarrangement des gènes *NTRK*

4 adénocarcinomes lieberkühniens invasifs : 0 + / 4
3 adénocarcinomes endométrioïdes invasifs de l'endomètre : 0 + / 3
3 tumeurs neuroendocrines : 0 + / 3

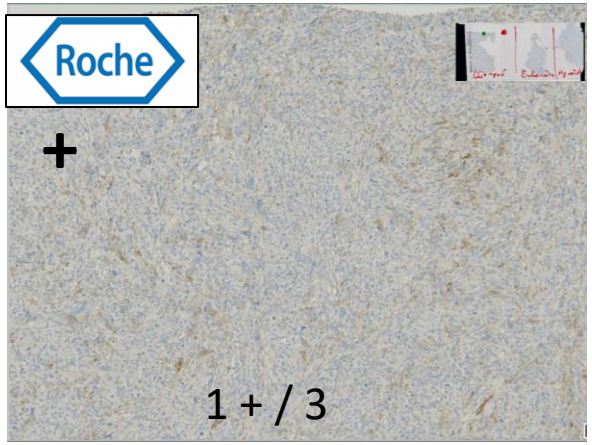
5 GIST

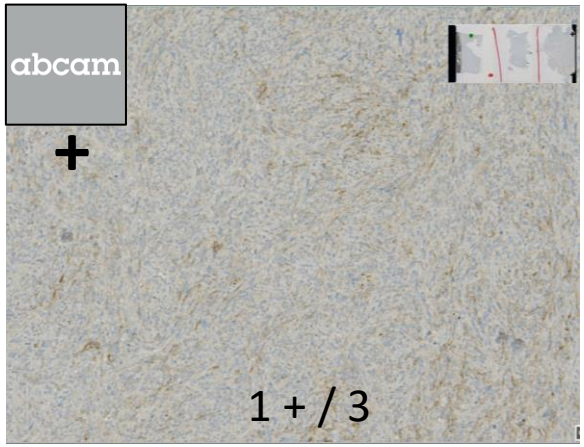


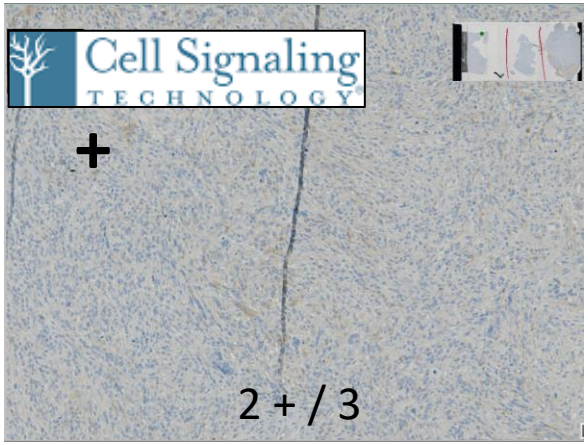
2 + / 5 2 + / 5 4 + / 5

Biologie moléculaire : pas de réarrangement des gènes *NTRK*

3 léiomyosarcomes

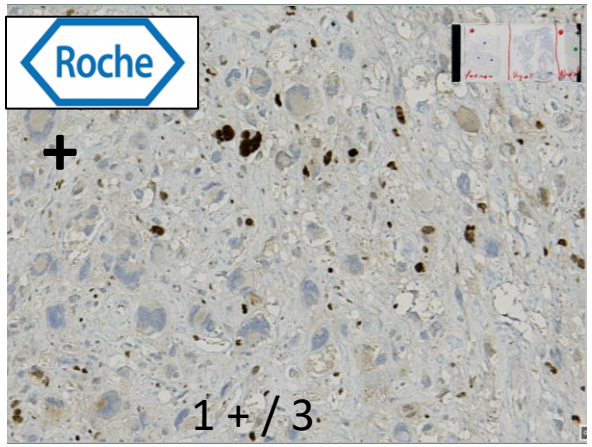


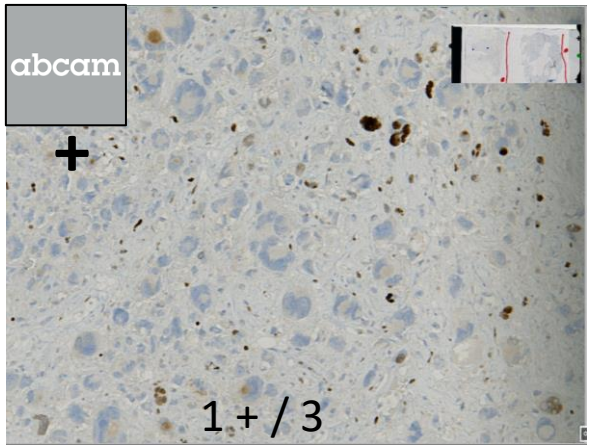


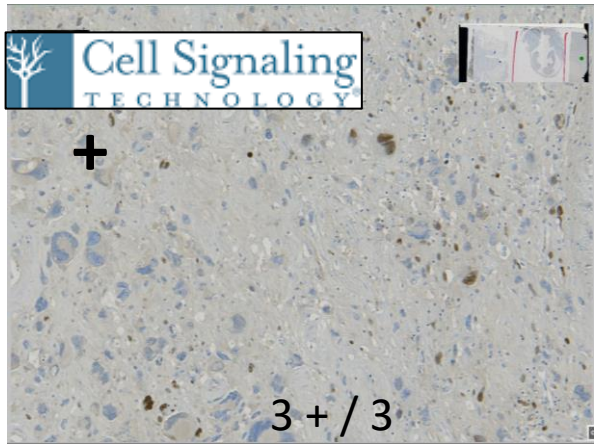


Biologie moléculaire : pas de réarrangement des gènes *NTRK*

3 rhabdomyosarcomes

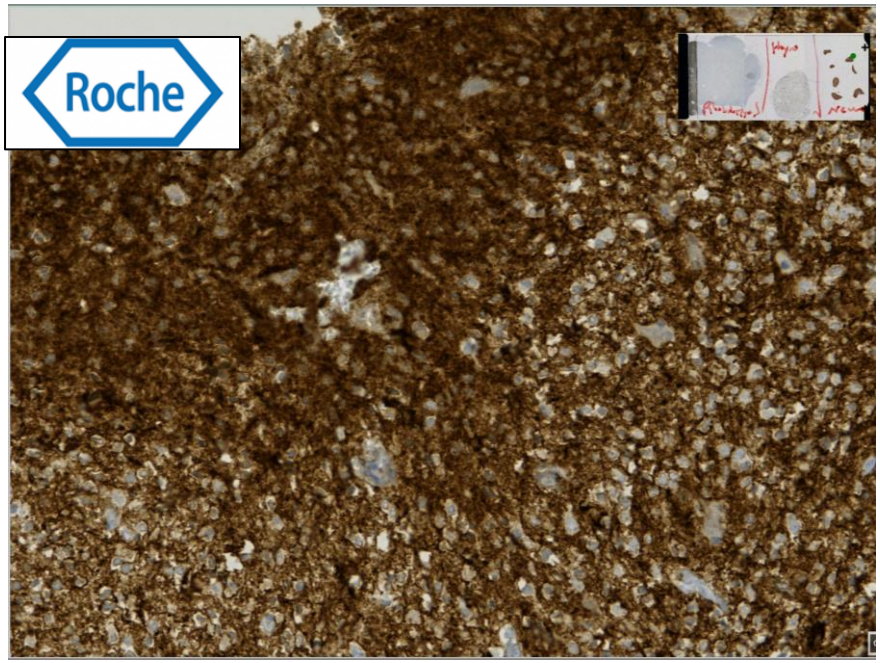


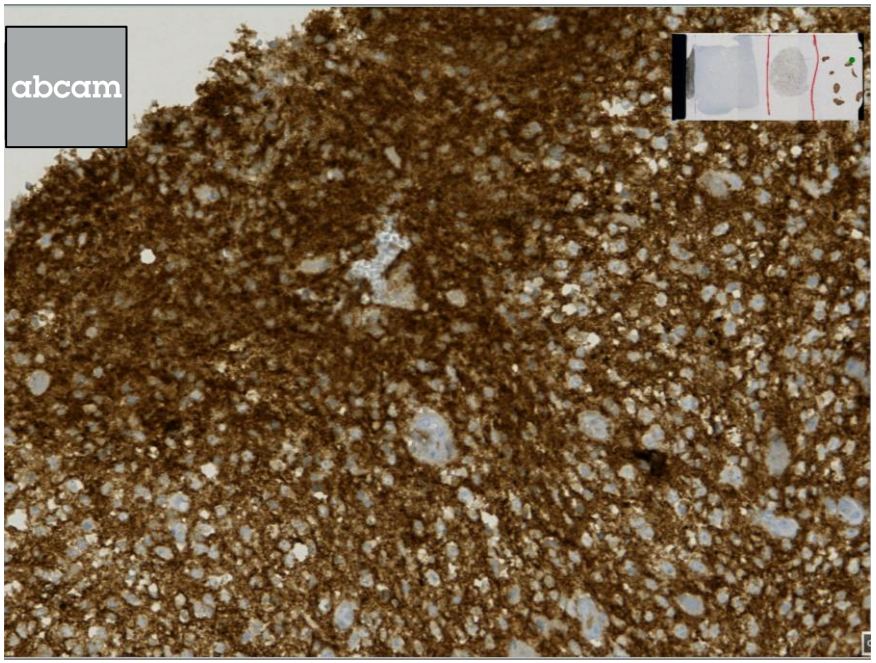


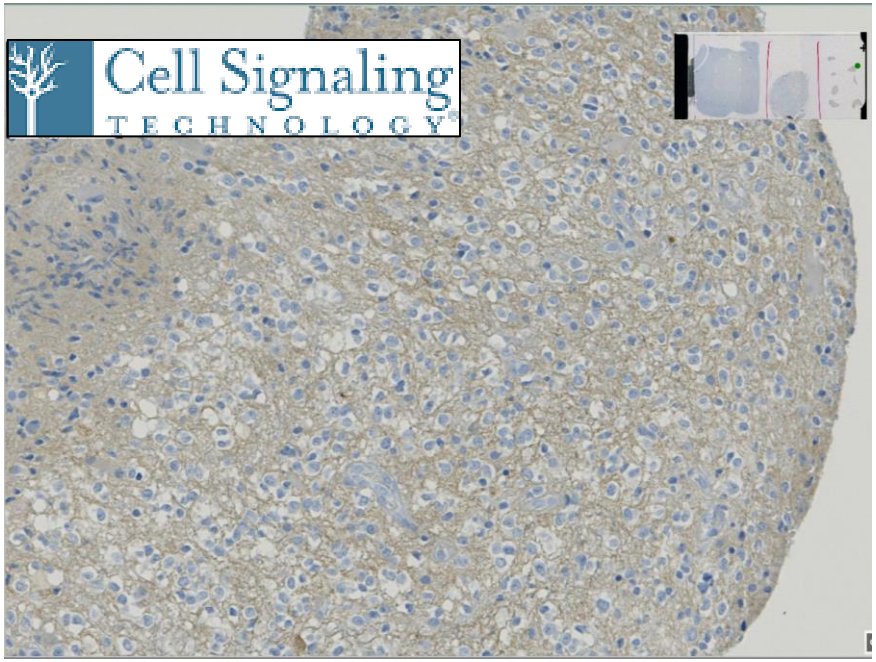


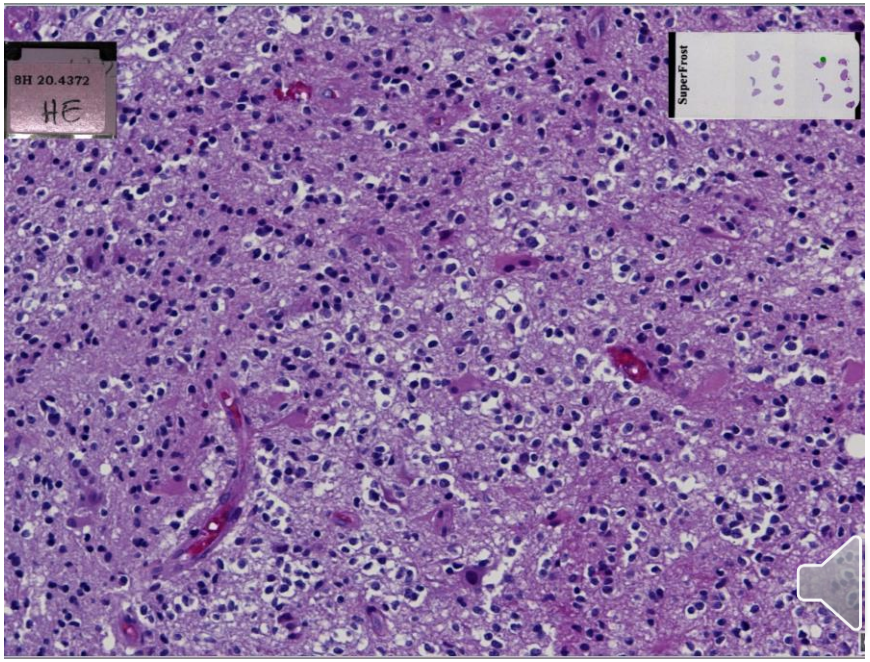
Biologie moléculaire : pas de réarrangement des gènes *NTRK*

3 glioblastomes









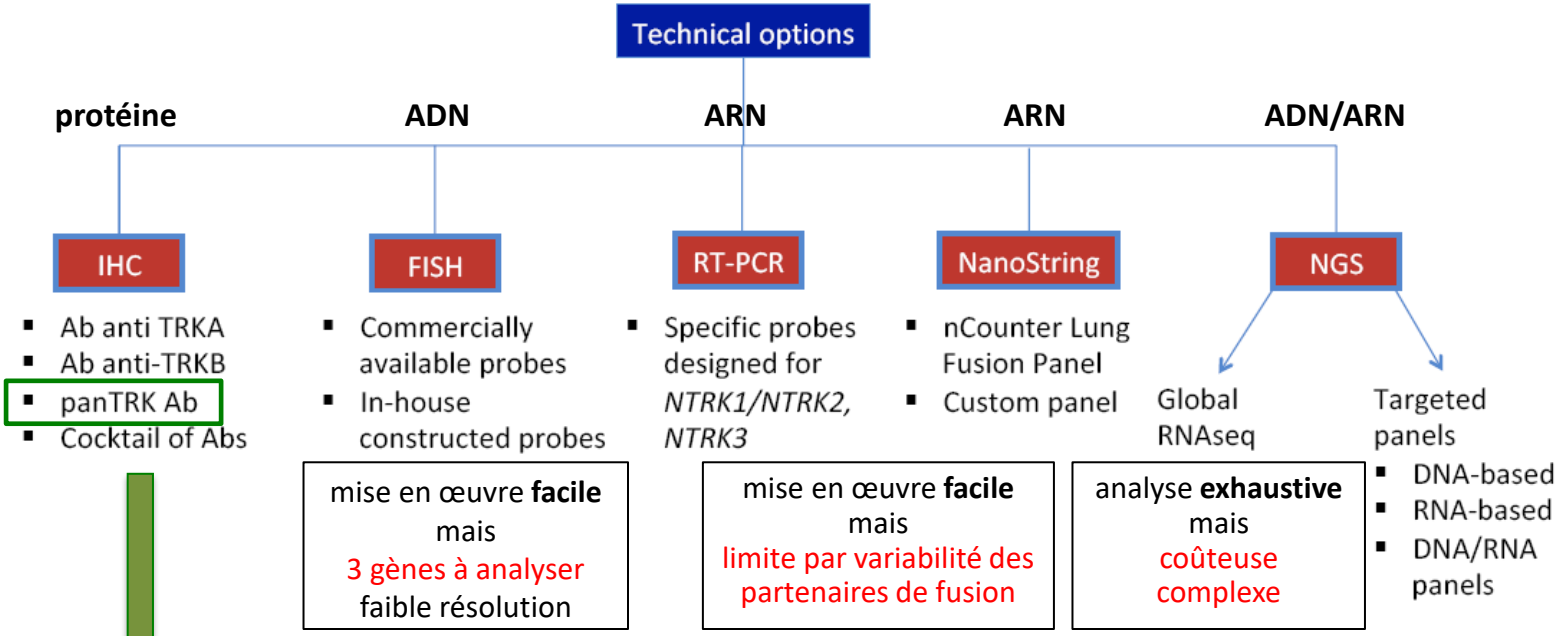
Au total sur les 49 tumeurs de notre série rétrospective :

	EPR17341 Roche	EPR17341 Abcam	A7H6R Cell Signaling	Biologie moléculaire
3 néphromes mésoblastiques congénitaux	**2 +/ 3**		**2 +/ 3**	**2 *ETV6-NTRK3* +**
	1 - / 3		**1 + / 3**	1 *ETV6-NTRK3* -
11 carcinomes papillaires thyroïdiens	**1 + / 11**		0 + / 11	Pas de réarrangement *NTRK*
11 adénocarcinomes pulmonaires invasifs WT	**1 + / 11**		0 + / 11	Pas de réarrangement *NTRK*
4 adénocarcinomes lieberkühniens invasifs MSI+	0 + / 4		0 + / 4	
3 adénocarcinomes endométrioïdes invasifs de l'endomètre	0 + / 3		0 + / 3	
3 tumeurs neuroendocrines	0 + / 3		0 + / 3	
5 GIST WT	**2 + / 5**		**4 + / 5**	Pas de réarrangement *NTRK*
3 léiomyosarcomes	**1 + / 3**		**2 + / 3**	Pas de réarrangement *NTRK*
3 rhabdomyosarcomes	**1 + / 3**		**3 + / 3**	Pas de réarrangement *NTRK*
3 glioblastomes	non interprétable (bruit de fond)		0 + / 3	
	8 cas + / 49 dont **2 cas confirmés en biologie moléculaire**		12 cas + / 49 dont **2 cas confirmés en biologie moléculaire**	

Conclusion

Réarrangement des gènes *NTRK* : - rôles diagnostique et thérapeutique
- tous les types tumoraux potentiellement concernés

Nombreuses méthodes de détection protéine / ADN / ARN



mise en œuvre **facile**
mais
3 gènes à analyser
faible résolution

mise en œuvre **facile**
mais
limite par variabilité des partenaires de fusion

analyse **exhaustive**
mais
coûteuse
complexe

ADN : **capture d'introns**
(analyse difficile car longs, séquences répétées)
mais
détection simultanée mutations de résistance

ARN : plus fragile
mais
information qui s'exprime

facile
accessible
efficace (très sensible, spécifique)
peu coûteuse
traduction protéique
analyse simultanée *NTRK1/2/3*

D'après Marchio *et al.*, 2019

Caractéristiques de l'IHC anti-pan TRK :

clones **EPR17341** de **Roche** (IVD) et **Abcam** (RUO) **équivalents**
plus sensibles et spécifiques pour la détection des réarrangements *NTRK* **que le clone A7H6R** (Cell Signaling)

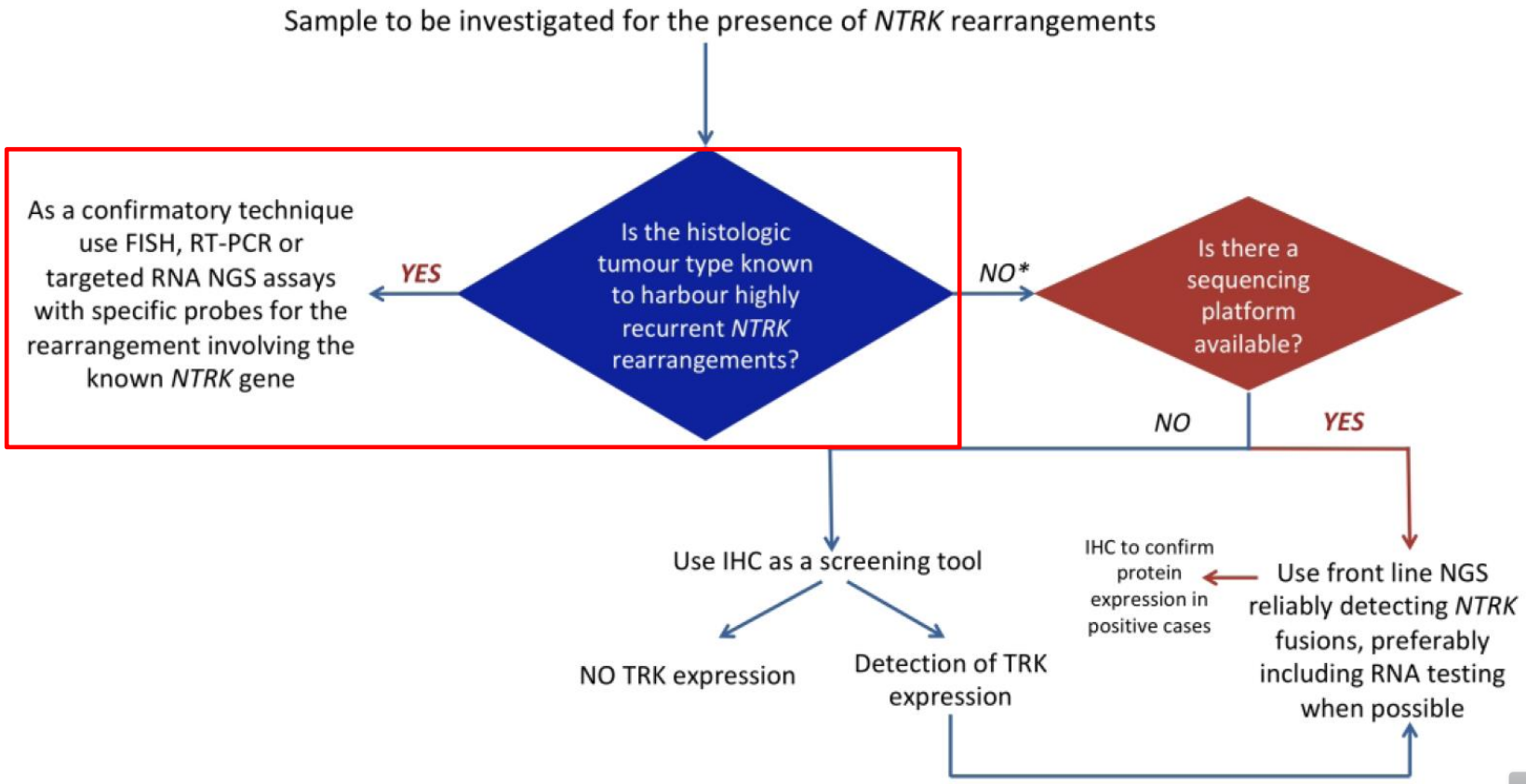
Interprétation :
peu de bruit de fond (sauf tissu nerveux)
seuil de positivité : 1% des cellules tumorales (intensité du marquage > bruit de fond du tissu)
localisation subcellulaire du marquage variable renseignant sur le partenaire de fusion
marquage nucléaire : quasiment jamais un bruit de fond

Limites :
diminution sensibilité pour détection réarrangement ***NTRK3*** par rapport à *NTRK1/2*
diminution spécificité dans tissus **salivaire** et **mammaire** et dans les **sarcomes**
hétérogénéité marquage (sensibilité fixation)

Place de l'IHC dans la stratégie de détection des réarrangements des gènes *NTRK* :

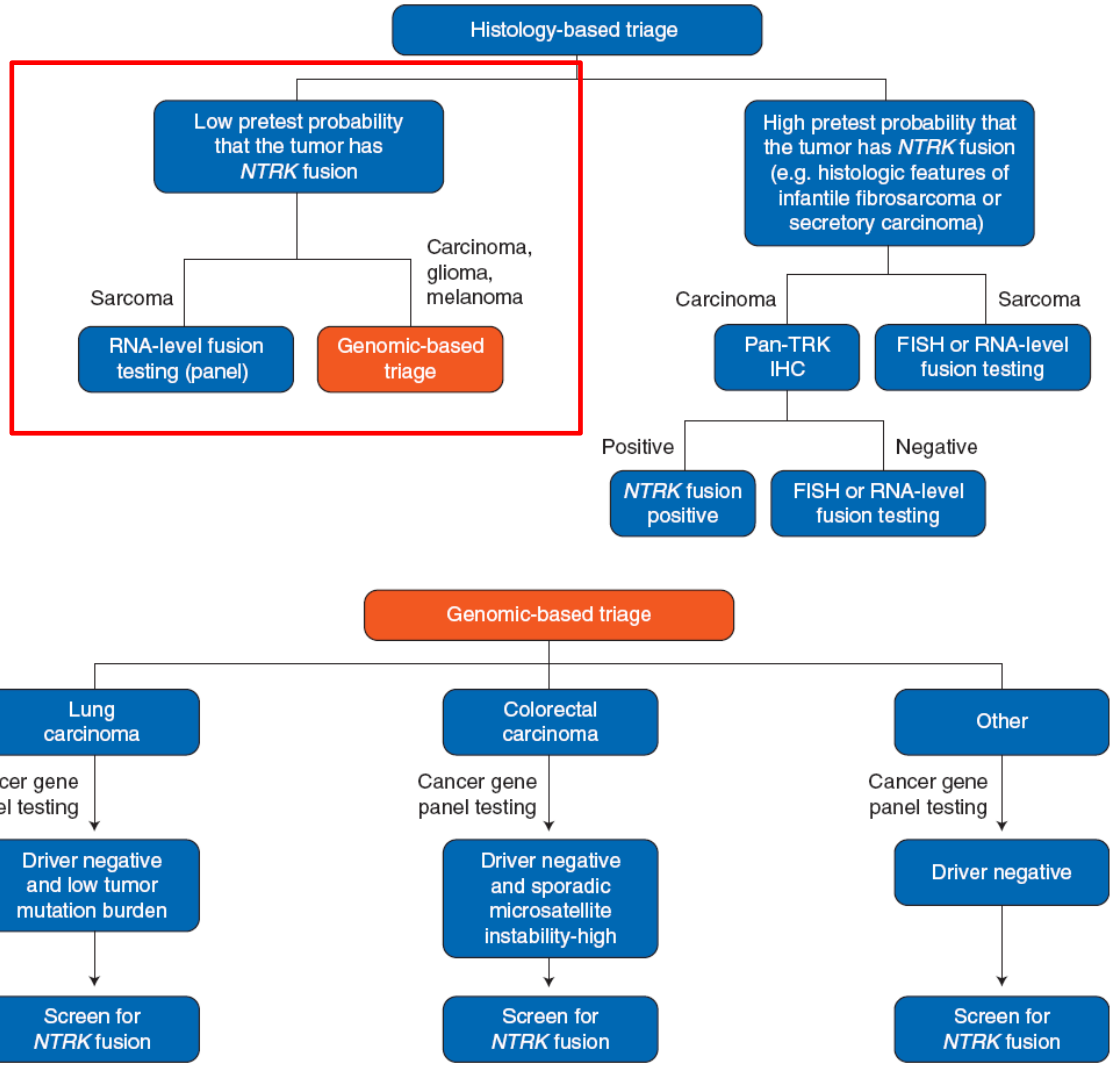
- **selon la probabilité pré-test de réarrangement de *NTRK* (type histologique)**

Forte : biologie moléculaire puis IHC pour confirmation de la traduction protéique de l'altération



Marchio *et al.*, 2019

Faible : screening IHC des tumeurs sans anomalie moléculaire driver puis confirmation biologie moléculaire



Solomon *et al.*, 2019

- **selon la nature du tissu**
- **selon l'existence d'altérations drivers**

Remerciements :

Equipe d'immunohistochimie du laboratoire d'anatomopathologie du CHU de Rouen

Madame le professeur Penault-Llorca

Les équipes du Centre Régional de Lutte Contre le Cancer d'Auvergne (Centre Jean Perrin)