**Mise en évidence du réarrangement d'*ALK* et *ROS1* en immunocytochimie
sur liquides de ponction**

**Detection of *ALK* and *ROS1* rearrangements by Immunocytochemistry on
cytological samples**

Diane FRANKEL^{1,2,*¶}, Donatienne BOURLARD^{1¶}, Stéphane GARCIA^{3,4}, Andrée Robaglia-
Schlupp¹, Emel PEKER¹, Adèle GROLIÈRE¹, Elise KASPI^{1,2} et Patrice ROLL^{1,2}

1 APHM, Hôpital la Timone, Service de Biologie Cellulaire, Marseille, France

2 Aix Marseille Univ, INSERM, MMG, Marseille, France

3 APMH, Hôpital Nord, Service d'Anatomie et Cytologie Pathologiques, Marseille

4 Aix Marseille Université, INSERM U624 – CRCM Parc scientifique de Luminy

¶ Ces deux auteurs ont contribué à part égale à cette étude.

* Auteur correspondant :

Dr Diane Frankel, Service de Biologie Cellulaire, La Timone, Assistance Publique des
Hôpitaux de Marseille, 264 rue Saint Pierre, 13385 Marseille Cedex 5. E-mail :
diane.frankel@univ-amu.fr, téléphone : 04 91 38 82 11.

Remerciements :

Nous remercions Joëlle Fiteni, Nathalie Boitano, Corinne Derrien, Laetitia Bus pour leur aide
technique. Nous remercions l'Institut National du Cancer (INCa) pour le soutien financier.

Mot Clés :

Français : *ALK*, *ROS1*, immunocytochimie, cytologie, adénocarcinome bronchique, cancer
du poumon

Anglais : *ALK*, *ROS1*, immunocytochemistry, cytology, lung adenocarcinoma, lung cancer

Résumé

La recherche de réarrangements des gènes *ALK* et *ROS1* est devenue, ces dernières années, indispensable pour la prise en charge **théranostique** des carcinomes bronchiques non à petites cellules, et particulièrement des adénocarcinomes bronchiques à un stade localement avancé ou métastatique. Cette recherche est de plus en plus réalisée dans un premier temps par immunohistochimie et confirmée par technique d'hybridation *in situ* par fluorescence dans les cas de résultat positif ou douteux. Le diagnostic de cancer bronchique se fait dans la majorité des cas à un stade avancé voire métastatique. Un prélèvement cytologique peut alors se révéler moins invasif, voire le seul matériel disponible pour la prise en charge diagnostique. La mise au point de la recherche des réarrangements des gènes *ALK* et *ROS1* par immunocytochimie à partir de liquides de ponction paraît alors indispensable. Nous avons réalisé dans notre laboratoire une étude à partir de liquides de ponction provenant de **27** patients atteints d'adénocarcinome bronchique par immunocytochimie. Cette méthode a été comparée avec différentes techniques selon les patients : **Immunohistochimie par** technique automatisée réalisée sur le même prélèvement dans un 2^{ème} laboratoire, technique d'hybridation *in situ* par fluorescence, et/ou immunohistochimie à partir de biopsies. Nous retrouvons une quasi parfaite concordance entre les différentes techniques utilisées nous permettant de valider, selon la norme COFRAC ISO 15189, l'analyse immunocytochimique *ALK* et *ROS1* sur prélèvements cytologiques.

The identification of *ALK* and *ROS1* rearrangements has become essential for the **theranostic** management of patients with non-small cell lung cancer, especially in stage IV or inoperable patients. These testings are now performed by immunohistochemistry on histological samples and confirmed by fluorescent *in situ* hybridization in case of positive or doubtful results. The diagnosis of lung cancer is often performed at an advanced or metastatic stage and cytological sample could be the only material containing malignant cells available at these stages. Therefore, the detection of *ALK* and *ROS1* rearrangement by immunocytochemical analysis on cytological specimens is needed. We performed this test on **27** cytological samples of lung adenocarcinomas, and we compared our results with several other techniques: on the same sample or on biopsy in another laboratory, on the same sample by fluorescent *in situ* hybridization and/or immunochemistry. We found a very good concordance between all these techniques, thus validating our immunocytochemical method on cytological samples according to the ISO 15189 norm.

Introduction

La prise en charge thérapeutique du carcinome bronchique non à petites cellules (CBNPC) a connu ces dernières années d'importants changements liés à une meilleure connaissance des altérations génomiques oncogéniques, avec l'arrivée des thérapies ciblées. En effet, depuis 2004, des anomalies génétiques font l'objet d'un dépistage en routine, en première ou seconde intention, selon les recommandations de l'INCa (www.e-cancer.fr) : recherche de mutation dans les gènes *EGFR*, *KRAS*, *HER2* et *BRAF*, d'une amplification de *c-MET*, ainsi que d'une translocation des gènes *ALK* et *ROS1* (1,2) . Des recommandations récentes (mars 2018) émanant des sociétés savantes internationales « College of American Pathologists », « the International Association for the Study of Lung Cancer » et « the Association for Molecular Pathology » préconisent de tester *a minima* les gènes *EGFR*, *ALK* et *ROS1*, éventuellement associés à d'autres gènes en fonction du matériel disponible (3). Les gènes *ALK* et *ROS1* codent les protéines du même nom appartenant à la famille des récepteurs à activité tyrosine-kinase (RTK). Les voies de signalisation intracellulaire induites par l'activation de ces récepteurs jouent un rôle majeur dans la prolifération, la migration et la survie cellulaires. Les réarrangements impliquant le gène *ALK* sont présents dans 3 à 7% des CBNPC selon les séries publiées (4), le gène partenaire de fusion principal dans cette pathologie étant le gène *EML4* (5). Une anomalie moléculaire impliquant le gène *ROS1* est retrouvée dans 1 à 3% des CBNPC (6). Ces deux réarrangements aboutissent à une activation constitutive du RTK, activant les voies de signalisation sous-jacentes impliquées dans la prolifération et la survie cellulaires. La présence d'un réarrangement du gène *ALK* ou du gène *ROS1* rend les patients présentant un CBNPC non malpighien, à un stade avancé ou métastatique, éligibles à une thérapie ciblée, comme, le crizotinib, un inhibiteur des tyrosine kinases d'*ALK* et de *ROS1*, ou le ceritinib et l'alectinib ayant l'AMM pour le traitement des patients présentant un réarrangement *ALK* (7–9) ou d'autres molécules encore en essais cliniques tel que l'entrectinib (10), ou en Autorisation temporaire d'utilisation (ATU), telles que le brigatinib ou le lorlatinib (11,12).

La mise en évidence d'un réarrangement des gènes *ALK* et *ROS1* dans les cellules tumorales est principalement effectuée à partir de prélèvements tumoraux tissulaires fixés et inclus en paraffine. L'hybridation *in situ* par fluorescence (FISH), jusqu'à présent technique de référence (13), utilise des sondes de type « break-apart », permettant la mise en évidence des réarrangements des gènes *ALK* et *ROS1* indépendamment des gènes partenaires impliqués. Cette technique a également été validée sur prélèvements cytologiques (14).

L'immunohistochimie (IHC) est l'une des techniques également disponibles, utilisant principalement les clones d'anticorps 5A4 et D5F3 pour la détection de la protéine ALK et le clone D4D6 pour la protéine ROS1. L'IHC permet de mettre en évidence la surexpression du RTK secondaire au réarrangement des gènes *ALK* et *ROS1*. Plusieurs études ont montré qu'il existait une excellente concordance entre les résultats des réarrangements *ALK* et *ROS1* retrouvés en FISH et la positivité en IHC (15,16). L'IHC est désormais utilisée en première intention permettant de ne contrôler par FISH que les cas douteux pour ALK, et les cas positifs ou douteux pour ROS1 (17). La dernière classification OMS de 2015 des tumeurs pulmonaires, de la plèvre, du thymus et cardiaques prend en compte les données des analyses moléculaires ainsi que de nouveaux critères diagnostiques des cancers pulmonaires, basés sur la cytologie. En effet, deux tiers des cancers pulmonaires sont diagnostiqués à un stade avancé ou métastatique et leur diagnostic peut être établi en cytologie sur liquides de ponctions, qui sont alors souvent le seul matériel disponible pour la recherche d'altérations moléculaires dans les cellules tumorales (2). La recherche des réarrangements d'*ALK* et *ROS1* en cytologie est donc indispensable pour une prise en charge thérapeutique optimale des patients (3,18).

L'objectif de notre étude a été de mettre au point la technique sur prélèvements cytologiques et de valider la méthode selon la norme NF EN ISO 15189, en vue de son accréditation par le COFRAC (Comité Français d'Accréditation) (<http://www.cofrac.fr/documentation/SH-GTA-01>).

Matériels et méthodes

Analyse et diagnostic cytologiques

Les liquides de ponction ont été reçus dans le Service de Biologie Cellulaire (Assistance Publique des Hôpitaux de Marseille, APHM). Des spots de cyto centrifugation (3 minutes à 2000 rpm) ont été réalisés. Ceux-ci ont ensuite été colorés au May-Grunwald-Giemsa, ou fixés dans un mélange acétone-méthanol avant coloration au Papanicolaou, ou congelés en attente de l'immunocytochimie (ICC) ou de la FISH. L'analyse cytologique a permis d'identifier et de déterminer, grâce aux colorations standards (microscope optique Leica, Wetzlar, Allemagne), le pourcentage de cellules malignes. La caractérisation de ces cellules a été réalisée en immunocytochimie, à partir des spots de cyto centrifugation congelés. Les anticorps testés pour la confirmation d'adénocarcinome bronchique sont l'anti -CK7, -EMA, -EpCAM, -ACE et -TTF1. La technique utilisée est la même que celle décrite ci-après. Au total, 27 prélèvements ont été inclus entre Novembre 2017 et Septembre 2018. La recherche

de réarrangement de *ALK* et *ROS1* a été effectuée dans notre laboratoire, sur ces prélèvements car, soit nous disposions de matériel en quantité suffisante pour que la technique soit réalisée dans un autre service (technique automatisée), à partir du même prélèvement cytologique ; soit, le statut *ALK* et *ROS1* avait été déterminé en anatomopathologie par IHC à partir d'un prélèvement tissulaire.

Immunocytochimie *ALK* et *ROS1*

Le protocole d'immunocytochimie suit les recommandations du fournisseur (SensiTek HRP, ScyTek, Logan, USA). Après décongélation à température ambiante, les spots de cytocentrifugation sont fixés dans la paraformaldéhyde (PAF) 4% puis incubés dans une solution d'inhibition des peroxydases endogènes. Les sites de fixation non spécifiques sont saturés avec du sérum de cheval. Les anticorps primaires (anticorps anti-*ROS1*, clone D4D6, 1/250^{ème}, Cell signaling, Leiden, Netherlands ; anticorps anti-*ALK*, clone 5A4, 1/25^{ème}, Abcam, Cambridge, United Kingdom) et leur contrôles isotypiques (IgG souris, Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA ; IgG lapin, R&D systems, Lille, France) sont incubés pendant une heure à température ambiante. L'anticorps secondaire couplé à la biotine est incubé pendant 15 minutes, suivi de l'avidine couplé à la peroxydase pendant 20 minutes. Le chromogène (DAB Quanto, Thermo Scientific™, Waltham, USA) est ensuite ajouté pendant 5 minutes. Chaque étape est suivie d'un à deux lavages au PBS et/ou à l'eau stérile. Les noyaux sont contre-colorés à l'hémalum de Mayer, puis les lames sont montées en aquatex® (Merck, Darmstadt, Allemagne). La lecture et l'interprétation des résultats ont été réalisées par trois cytologistes (microscope Leica, Wetzlar, Allemagne), de façon indépendante. Des contrôles négatifs (contrôles isotypiques) et un contrôle positif (patients positifs en ICC et FISH, conformément aux recommandations de la Société Française de Pathologie (SFP) et de l'Association Française d'Assurance Qualité en Anatomie Pathologique (AFAQAP)) sont réalisés à chaque manipulation afin de garantir l'absence de problème technique lors de la réalisation de l'immunocytochimie. Un marquage douteux ou positif (plus intense que le contrôle négatif) dès deux cellules malignes a entraîné un contrôle par technique FISH.

Le Service d'Anatomie pathologique de l'Hôpital Nord (APHM) a effectué la recherche des réarrangements par IHC sur un automate Ventana-Ultra (Roche, Bale, Suisse) en utilisant les mêmes anticorps primaires : anti *ALK*, clone 5A4 dilution 1/50^{ème} et anti-*ROS1*, clone D4D6, dilution 1/100^{ème} et un kit Ultraview®. La validation de la technique d'IHC de ce service, ayant été préalablement réalisée en collaboration avec plusieurs Services d'Anatomie et de Pathologie Français, a montré une très bonne concordance entre IHC et FISH sur biopsie

(19). Dans notre étude, la technique automatisée d'IHC a permis de tester le statut ALK et ROS1 sur les prélèvements cytologiques, testés au préalable en ICC, et/ou sur les prélèvements tissulaires issus des mêmes patients.

Ces analyses ayant été réalisées chez ces patients dans le cadre du diagnostic, la validation par un comité éthique n'était pas nécessaire.

FISH

Les lames décongelées la veille sont incubées pendant 10 minutes dans un mélange HCl 0,01N/ pepsine (0,5%) à 37°C au bain marie puis rincées au PBS. Les lames sont ensuite incubées dans une solution de formaldéhyde (1%) pendant 10 minutes, déshydratées après rinçage au PBS dans des bains d'éthanol successifs à 70°, 90° et 100° (3 minutes) puis séchées. La dénaturation et l'hybridation des sondes sont réalisées dans un thermobrite (Leica Biosystems, Wetzlar, Allemagne). La dénaturation s'effectue selon les recommandations du fournisseur, pendant 10 minutes à 75°C pour la sonde ROS1 (zytolight SPEC ROS1 Dual Color Break Apart Probe (PL101), ZytoVision, Bremerhaven, Allemagne) et pendant 4 minutes à 75°C pour la sonde ALK (Vysis LSI ALK Dual Color Break Apart, rearrangement Probe, Abbott Molecular, Des Plaines, Illinois), suivi d'une hybridation à 37°C sur la nuit. Les lames sont enfin lavées dans des bains tamponnés (Saline-Sodium Citrate buffer 0,4X à 72°C pendant 2min puis 2X à température ambiante pendant 30 secondes). Un marquage nucléaire au DAPI (DAPI II Counterstain (125ng/ml), Abbott, Chicago, Illinois, États-Unis) est ensuite réalisé. Les prélèvements ont été lus par deux opérateurs de manière indépendante, comptant 100 noyaux chacun. Le seuil de positivité (2%) a été établi à partir de prélèvements ne présentant pas de réarrangement.

Résultats

Nous avons colligé 27 cas d'adénocarcinome bronchique à un stade métastatique ou localement avancé. L'étude a été faite sur différents types de liquides de ponction : 9 liquides pleuraux, 1 liquide péricardique, 2 brossages bronchiques, 2 lavages broncho-alvéolaires, 1 ponction parenchymateuse, 2 ponctions para-trachéales et 10 ponctions ganglionnaires transbronchiques réalisées par échoendoscopie bronchique (EBUS). La démographie de notre cohorte est présentée dans le tableau 1. Il s'agit majoritairement d'hommes (17 vs. 10 femmes), de moyenne d'âge de 61 ans (de 38 à 83 ans), tabagiques actifs ou sevrés dans 22/27 cas. Les cellules malignes représentent en moyenne 38% (de 3 à 90%) des éléments nucléés

du prélèvement. Sur les 27 prélèvements, 25 ont été testés pour la recherche de la surexpression de ROS1 et 26 pour la recherche de surexpression d'ALK.

Nous avons comparé les résultats positifs obtenus par ICC à la technique FISH, sur le même prélèvement cytologique, montrant une parfaite concordance entre les 2 techniques.

Les résultats négatifs en ICC ont été comparés aux résultats obtenus par IHC (technique validée par les sociétés savantes d'Anatomie Pathologique nationales et internationales) sur le même prélèvement cytologique et/ou sur une biopsie.

Concernant la recherche de réarrangement de *ROS1*, parmi les 25 liquides de ponction analysés, l'ICC était négative pour 23 d'entre eux (Figure 1). Ces résultats ont été confirmés dans le Service d'Anatomie pathologique sur technique automatisée d'IHC dans 21 cas (soit sur le même prélèvement, soit sur biopsie). Pour deux patients (patients 1 et 15), le résultat n'a pas pu être confirmé, ni en IHC, ni par FISH en raison de l'épuisement du prélèvement, et aucun prélèvement histologique n'avait été effectué. Un cas douteux en ICC (marquage faible et focal) a été vérifié par FISH qui a infirmé le réarrangement (patient 7). L'ICC était positive pour un liquide pleural (patient 2), ce résultat ayant été confirmé par la technique FISH (Figure 2). Par ailleurs, le réarrangement a été observé pour ce patient sur biopsie pleurale en immunohistochimie et FISH.

Concernant la recherche du réarrangement de *ALK*, parmi les 26 prélèvements analysés, 22 étaient négatifs (Figure 1). Tous ces résultats ont été confirmés par le service d'Anatomie pathologique, soit sur le même prélèvement cytologique, soit sur biopsie. Un résultat douteux a été retrouvé (marquage faible et focal) mais la FISH a infirmé le réarrangement (patient 7).

L'ICC était positive pour 3 patients (Patient 9, liquide pleural ; patient 10, liquide péricardique ; patient 14, lavage broncho-alvéolaire) Pour les patients 9 et 10, une positivité des cellules a été mise en évidence dans le liquide pleural et péricardique respectivement, résultats confirmés par FISH sur ces mêmes liquides (Figure 3) et sur les biopsies correspondantes. La positivité de l'ICC dans le lavage broncho-alvéolaire du patient 14 a été confirmée par FISH sur le même prélèvement.

Au total, tous les résultats positifs et négatifs obtenus et pour lequel du matériel était encore disponible, ont été confirmés par une autre technique et/ou sur un autre prélèvement. Les résultats douteux en ICC obtenus chez un même patient, pour les deux anticorps, ont été infirmés par FISH sur le même prélèvement. Pour les deux anticorps, La valeur prédictive négative et la sensibilité sont de 1, la spécificité de 0,96. Les valeurs prédictives positives sont de 0,5 pour l'anticorps anti-ROS1 et 0,75 pour l'anticorps anti-ALK, car pour le patient n°7, une positivité douteuse a été mise en évidence en ICC et la technique de FISH a montré

l'absence de réarrangement. Ces valeurs sont à confirmer sur une cohorte élargie en raison du faible nombre de prélèvements de cette étude, notamment du nombre de cas positifs.

Discussion

Nous avons recherché une surexpression d'ALK et ROS1 par immunocytochimie à partir de liquides de ponction chez 27 patients. Nous avons confirmé les résultats obtenus par la technique FISH et/ou IHC automatisée sur le même prélèvement cytologique ou un autre prélèvement histologique. Pour *ROS1*, 2 cas (résultat négatif) n'ont pu être confirmés en raison de l'épuisement du matériel et de l'absence de prélèvement histologique. La concordance des résultats obtenus entre ICC (technique manuelle) et IHC (technique automatisée) est de 100%, ce qui nous permet de valider la recherche de réarrangements d'*ALK* et *ROS1* par immunocytochimie à partir de liquides de ponction. Nous avons suivi les recommandations du COFRAC pour la validation de méthode en portée de type B (document COFRAC SH GTA 04, Guide de validation des méthodes en Biologie Médicale). Le travail présenté ici permet de valider l'item 'comparaison de méthodes'. S'agissant d'une analyse spécialisée et peu demandée sur liquides de ponction, nous avons choisi de valider notre technique sur 10 échantillons (n=10). Ayant obtenu plus de prélèvements, ce nombre a été augmenté à 25 pour *ROS1* et 26 pour *ALK* dans notre étude. D'autres études sur de plus grandes cohortes retrouvent des résultats comparables. En effet, Savic et al. (20) ont comparé l'ICC (clone 5A4) et la FISH *ALK* sur 40 prélèvements cytologiques avec une discordance entre les 2 techniques dans 4 cas, dont 3 où l'ICC positive n'est pas confirmée par FISH. Dans cette étude, la sensibilité et la spécificité retrouvées pour la technique immunocytochimique sont respectivement de 93,3 et 96%. Par ailleurs, Wang et al. (21) ont retrouvé 100% de concordance entre l'ICC et la FISH pour la recherche du réarrangement d'*ALK* à partir de 58 cytoblocs provenant de liquides pleuraux.

Concernant *ROS1*, une étude récente, de Vlajnic et al. (22) a montré la très bonne concordance entre ICC (clone D4D6) et FISH à partir de 295 prélèvements cytologiques de CBNPC. Les sensibilité, spécificité, valeur prédictive négative et positive de l'ICC en comparaison avec le statut établi par FISH étaient toutes de 100%. Ainsi les résultats de notre travail sont comparables à ceux observés dans des études plus puissantes, incluant un plus grand nombre de prélèvements testés. Il est intéressant de noter que dans notre étude, pour 21 patients, un prélèvement histologique était disponible et retrouve le même résultat que sur prélèvement cytologique. Cette concordance diffère des autres anomalies moléculaires

retrouvées dans les adénocarcinomes bronchiques. En effet, nous avons récemment mis en évidence des discordances de mutations des gènes *EGFR* et *KRAS* entre des cellules métastatiques retrouvées dans du LCR et des biopsies de la tumeur primitive (23), soulignant dans ce cas une hétérogénéité.

Les données de fréquences de notre étude diffèrent en partie des données de la littérature, en raison de la taille de notre cohorte. En effet, les réarrangements d'*ALK* et *ROS1* sont retrouvés dans 3/26 et 1/25 cas respectivement (soit dans 11,5% et 4% des cas). Ce pourcentage est un peu plus élevé pour *ROS1* (1 à 3%) (6) et *ALK* (3 à 7%) (4) que celui retrouvé dans les études princeps. Dans notre étude les patients inclus ont un âge moyen de 61 ans et sont pour la plupart fumeurs actifs ou sevrés (22/27 cas) correspondant aux caractéristiques cliniques classiques de patients atteints d'adénocarcinome bronchique.

Les réarrangements des gènes *ALK* et *ROS1* n'étant présents que chez un faible pourcentage de patients atteints d'adénocarcinome bronchique, la technique ICC, tout comme l'IHC sur les coupes tissulaires inclus en paraffine, est une bonne méthode pour s'affranchir de tester en FISH les cas négatifs. A noter que les recommandations émises par la SFP et l'AFAQAP en 2017 pour le testing *ALK* dans les CBNPC permettent pour les IHC *ALK* ayant un marquage fort, de s'affranchir d'un contrôle par FISH, conformément à l'algorithme proposé par Marchetti et al (24). Enfin, l'avancée des techniques de Next Generation Sequencing (NGS) laisse penser que la FISH pourra être définitivement remplacée par l'IHC/ICC et le NGS dans un futur proche (25).

La recherche de réarrangement à partir de liquides de ponction a cependant quelques limites. Elle nécessite notamment un nombre suffisant de cellules malignes pour l'analyse et surtout pour le contrôle par FISH qui requiert l'analyse de 100 noyaux, avec au moins 15% de noyaux avec réarrangement pour conclure à un résultat positif. Ce seuil utilisé pour les prélèvements histologiques sur coupes, peut cependant être abaissé en raison de la présence de cellules 'entières' sur les spots de cytocentrifugation (17). Les spots de cytocentrifugation sont réalisés à partir de prélèvements frais, nécessitant donc un transport rapide afin d'assurer la meilleure intégrité cellulaire possible. Enfin il est important d'avoir un prélèvement en quantité suffisante pour assurer la meilleure prise en charge diagnostique possible.

Conclusion

Les prélèvements cytologiques se révèlent être une bonne alternative aux prélèvements histologiques car ils peuvent être obtenus de façon moins invasive, sont susceptibles de

contenir une quantité importante de cellules tumorales et sont parfois les seuls prélèvements disponibles au moment du diagnostic ou de la rechute pour l'analyse moléculaire. Rechercher un réarrangement des gènes *ALK* et *ROS1* par ICC dans le contexte d'adénocarcinome bronchique à un stade avancé peut être considéré comme une technique fiable, précise, comparable à l'IHC et permettant de limiter le nombre d'échantillons de patients à tester par technique FISH, plus lourde techniquement et plus coûteuse.

Références

1. Shea M, Costa DB, Rangachari D. Management of advanced non-small cell lung cancers with known mutations or rearrangements: latest evidence and treatment approaches. *Ther Adv Respir Dis*. avr 2016;10(2):113-29.
2. Travis WD, Brambilla E, Nicholson AG, Yatabe Y, Austin JHM, Beasley MB, et al. The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors: Impact of Genetic, Clinical and Radiologic Advances Since the 2004 Classification. *J Thorac Oncol Off Publ Int Assoc Study Lung Cancer*. sept 2015;10(9):1243-60.
3. Lindeman NI, Cagle PT, Aisner DL, Arcila ME, Beasley MB, Bernicker EH, et al. Updated Molecular Testing Guideline for the Selection of Lung Cancer Patients for Treatment With Targeted Tyrosine Kinase Inhibitors: Guideline From the College of American Pathologists, the International Association for the Study of Lung Cancer, and the Association for Molecular Pathology. *Arch Pathol Lab Med*. mars 2018;142(3):321-46.
4. Rodig SJ, Mino-Kenudson M, Dacic S, Yeap BY, Shaw A, Barletta JA, et al. Unique clinicopathologic features characterize ALK-rearranged lung adenocarcinoma in the western population. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 15 août 2009;15(16):5216-23.
5. 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*. 2 août 2007;448(7153):561-6.
6. Bergethon K, Shaw AT, Ou S-HI, Katayama R, Lovly CM, McDonald NT, et al. ROS1 rearrangements define a unique molecular class of lung cancers. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 10 mars 2012;30(8):863-70.
7. 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*. 4 déc 2014;371(23):2167-77.

- 331 8. Mazières J, Zalcman G, Crinò L, Biondani P, Barlesi F, Filleron T, et al. Crizotinib
332 therapy for advanced lung adenocarcinoma and a ROS1 rearrangement: results from the
333 EUROS1 cohort. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 20 mars 2015;33(9):992-9.
- 334 9. Shaw AT, Ou S-HI, Bang Y-J, Camidge DR, Solomon BJ, Salgia R, et al. Crizotinib
335 in ROS1-rearranged non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*. 20 nov
336 2014;371(21):1963-71.
- 337 10. Drilon A, Siena S, Ou S-HI, Patel M, Ahn MJ, Lee J, et al. Safety and Antitumor
338 Activity of the Multitargeted Pan-TRK, ROS1, and ALK Inhibitor Entrectinib: Combined
339 Results from Two Phase I Trials (ALKA-372-001 and STARTRK-1). *Cancer Discov*.
340 2017;7(4):400-9.
- 341 11. Lim SM, Kim HR, Lee J-S, Lee KH, Lee Y-G, Min YJ, et al. Open-Label,
342 Multicenter, Phase II Study of Ceritinib in Patients With Non-Small-Cell Lung Cancer
343 Harboring ROS1 Rearrangement. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 10 août
344 2017;35(23):2613-8.
- 345 12. Shaw AT, Felip E, Bauer TM, Besse B, Navarro A, Postel-Vinay S, et al. Lorlatinib in
346 non-small-cell lung cancer with ALK or ROS1 rearrangement: an international, multicentre,
347 open-label, single-arm first-in-man phase 1 trial. *Lancet Oncol*. déc 2017;18(12):1590-9.
- 348 13. Camidge DR, Bang Y-J, Kwak EL, Iafrate AJ, Varella-Garcia M, Fox SB, et al.
349 Activity and safety of crizotinib in patients with ALK-positive non-small-cell lung cancer:
350 updated results from a phase 1 study. *Lancet Oncol*. oct 2012;13(10):1011-9.
- 351 14. Bozzetti C, Nizzoli R, Tiseo M, Squadrilli A, Lagrasta C, Buti S, et al. ALK and
352 ROS1 rearrangements tested by fluorescence in situ hybridization in cytological smears from
353 advanced non-small cell lung cancer patients. *Diagn Cytopathol*. nov 2015;43(11):941-6.
- 354 15. Rogers T-M, Russell PA, Wright G, Wainer Z, Pang J-M, Henricksen LA, et al.
355 Comparison of methods in the detection of ALK and ROS1 rearrangements in lung cancer. *J*
356 *Thorac Oncol Off Publ Int Assoc Study Lung Cancer*. avr 2015;10(4):611-8.
- 357 16. Wynes MW, Sholl LM, Dietel M, Schuurin E, Tsao MS, Yatabe Y, et al. An
358 international interpretation study using the ALK IHC antibody D5F3 and a sensitive detection
359 kit demonstrates high concordance between ALK IHC and ALK FISH and between
360 evaluators. *J Thorac Oncol Off Publ Int Assoc Study Lung Cancer*. mai 2014;9(5):631-8.
- 361 17. Cooper W, Fox S, O'Toole S, Morey A, Frances G, Pavlakis N, et al. National
362 Working Group Meeting on ALK diagnostics in lung cancer. *Asia Pac J Clin Oncol*. avr
363 2014;10 Suppl 2:11-7.
- 364 18. Layfield LJ, Roy-Chowdhuri S, Baloch Z, Ehya H, Geisinger K, Hsiao SJ, et al.
365 Utilization of ancillary studies in the cytologic diagnosis of respiratory lesions: The
366 papanicolaou society of cytopathology consensus recommendations for respiratory cytology.
367 *Diagn Cytopathol*. déc 2016;44(12):1000-9.

19. Lantuejoul S, Rouquette I, Blons H, Le Stang N, Ilie M, Begueret H, et al. French multicentric validation of ALK rearrangement diagnostic in 547 lung adenocarcinomas. *Eur Respir J*. juill 2015;46(1):207-18.
20. Savic S, Bode B, Diebold J, Tosoni I, Barascud A, Baschiera B, et al. Detection of ALK-positive non-small-cell lung cancers on cytological specimens: high accuracy of immunocytochemistry with the 5A4 clone. *J Thorac Oncol Off Publ Int Assoc Study Lung Cancer*. août 2013;8(8):1004-11.
21. Wang W, Tang Y, Li J, Jiang L, Jiang Y, Su X. Detection of ALK rearrangements in malignant pleural effusion cell blocks from patients with advanced non-small cell lung cancer: a comparison of Ventana immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization. *Cancer Cytopathol*. févr 2015;123(2):117-22.
22. Vlajnic T, Savic S, Barascud A, Baschiera B, Bihl M, Grilli B, et al. Detection of ROS1-positive non-small cell lung cancer on cytological specimens using immunocytochemistry. *Cancer Cytopathol*. 16 févr 2018;
23. Frankel D, Nanni-Metellus I, Robaglia-Schlupp A, Tomasini P, Guinde J, Barlesi F, et al. Detection of EGFR, KRAS and BRAF mutations in metastatic cells from cerebrospinal fluid. *Clin Chem Lab Med*. 25 avr 2018;56(5):748-53.
24. 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. *J Thorac Oncol Off Publ Int Assoc Study Lung Cancer*. avr 2016;11(4):487-95.
25. Garinet S, Laurent-Puig P, Blons H, Oudart J-B. Current and Future Molecular Testing in NSCLC, What Can We Expect from New Sequencing Technologies? *J Clin Med*. 9 juin 2018;7(6).

Figure 1 : Absence de réarrangement d'ALK et ROS1 dans les cellules métastatiques d'un adénocarcinome pulmonaire (liquide pleural, patient 6). **A** : Cellules malignes de taille hétérogène, parfois vacuolisées, mêlées à des lymphocytes et des macrophages. Coloration au Papanicolaou ; **B-E** : Immunocytochimie, révélation à la peroxydase. Les noyaux ont été colorés à l'Hémalun. **B** : Anticorps anti-ALK ; **C** : Contrôle isotypique souris, témoin négatif de l'anti-ALK; **D** : Anticorps anti-ROS1; **E** : Contrôle isotypique lapin, témoin négatif de l'anti ROS1. **A-E** : objectif x40.

Figure 2 : Réarrangement ROS1 dans les cellules métastatiques d'un adénocarcinome pulmonaire (liquide pleural, patient 2). **A** : Anticorps anti-ROS1, expression de la protéine ROS1 (marquage cytoplasmique). **B** : Contrôle isotypique lapin, témoin négatif de l'anti ROS, absence de marquage. **C** : Cellule maligne de grande taille, au noyau au nucléole proéminent, au cytoplasme vacuolisé ; Coloration au Papanicolaou ; Objectif x40. **D** : Noyau d'une cellule maligne, FISH sonde *ROS1*. A noter la présence de signaux en surnombre objectivant une polyploïdie et la présence de signaux verts en surnombre (10) par rapport aux signaux rouges (2) objectivant le réarrangement ; Objectif x100.

Figure 3 : Réarrangement ALK dans les cellules métastatiques d'un adénocarcinome pulmonaire (liquide péricardique, patient 10). **A** : Anticorps anti-ALK, expression de la protéine ALK, (marquage cytoplasmique). **B** : Contrôle isotypique souris, témoin négatif de l'anti-ALK, absence de marquage. **C** : Cellules malignes en agencement épithélial, coloration au Papanicolaou ; Objectif x40. **D** : Noyaux de cellules malignes, FISH sonde ALK. A noter la présence de signaux en surnombre objectivant une polyploïdie et la perte de signaux verts (2) par rapport aux signaux rouges (4 à 5) objectivant le réarrangement ; Objectif x100.

Figure 1 : Absence de réarrangement d'*ALK* et *ROS1* dans les cellules métastatiques d'un adénocarcinome pulmonaire (liquide pleural, patient 6). **A** : Cellules malignes de taille hétérogène, parfois vacuolisées, mêlées à des lymphocytes et des macrophages. Coloration au Papanicolaou ; **B-E** : Immunocytochimie, révélation à la peroxydase. Les noyaux ont été colorés à l'Hémalun. **B** : Anticorps anti-*ALK* ; **C** : Contrôle isotypique souris, témoin négatif de l'anti-*ALK*; **D** : Anticorps anti-*ROS1*; **E** : Contrôle isotypique lapin, témoin négatif de l'anti *ROS1*. **A-E** : objectif x40.

Figure 1: No rearrangement of *ALK* and *ROS1* in lung adenocarcinoma metastatic cells (pleural effusion, patient 6). **A**: metastatic cells associated with lymphocytes and macrophages. Papanicolaou stain, x40; **B-E**: Immunocytochemistry, peroxidase staining, using antibodies against **B**: *ALK*, **C**: Mouse IgG isotypic control, **D**: *ROS1*, and **E**: Polyclonal rabbit IgG isotypic control.

Figure 2 : Réarrangement *ROS1* dans les cellules métastatiques d'un adénocarcinome pulmonaire (liquide pleural, patient 2). **A** : Anticorps anti-*ROS1*, expression de la protéine *ROS1* (marquage cytoplasmique). **B** : Contrôle isotypique lapin, témoin négatif de l'anti *ROS*, absence de marquage. **C** : Cellule maligne de grande taille, au noyau au nucléole proéminent, au cytoplasme vacuolisé ; Coloration au Papanicolaou ; Objectif x40. **D** : Noyau d'une cellule maligne, FISH sonde *ROS1*. A noter la présence de signaux en surnombre objectivant une polyploïdie et la présence de signaux verts en surnombre (10) par rapport aux signaux rouges (2) objectivant le réarrangement ; Objectif x100.

Figure 2: *ROS1* rearrangement in lung adenocarcinoma metastatic cells (pleural effusion, patient 2). **A and B**: Immunocytochemistry using antibodies against **A**: *ROS1*, showing a positive staining, **B**: Rabbit isotypic control, showing a normal negative staining; **C**: Malignant cell, Papanicolaou stain, x40; **D**: Nucleus of a malignant cell, *ROS1* FISH probe. Supplemental signals demonstrate a polyploidy and the increased number of green signals (10) compared to red signals (2) demonstrates the rearrangement; x100.

Figure 3 : Réarrangement *ALK* dans les cellules métastatiques d'un adénocarcinome pulmonaire (liquide péricardique, patient 10). **A** : Anticorps anti-*ALK*, expression de la protéine *ALK*, (marquage cytoplasmique). **B** : Contrôle isotypique souris, témoin négatif de l'anti-*ALK*, absence de marquage. **C** : Cellules malignes en agencement épithélial, coloration au Papanicolaou ; Objectif x40. **D** : Noyaux de cellules malignes, FISH sonde *ALK*. A noter la présence de signaux en surnombre objectivant une polyploïdie et la perte de signaux verts (2) par rapport aux signaux rouges (4 à 5) objectivant le réarrangement ; Objectif x100.

Figure 3: *ALK* rearrangement in lung adenocarcinoma metastatic cells (pericardial effusion, patient 10). **A and B**: Immunocytochemistry using antibodies against **A**: *ALK*, showing a positive staining, **B**: Mouse isotypic control, showing a normal negative staining;

C: Malignant cells, Papanicolaou stain, x40; **D:** Nucleus of malignant cells, *ALK* FISH probe. Supplemental signals demonstrate a polyploidy and the loss of green signals (2) compared to red signals (4 to 5) demonstrates the rearrangement; x100.

Tableau 1 : Données des patients analysés pour la recherche des réarrangements de *ROS1* et *ALK*. F : femme ; H : homme ; ICC : immunocytochimie ; IHC : immunohistochimie ; NR : non réalisé ; Les * signalent les prélèvements cytologiques analysés en parallèle en Biologie Cellulaire et en Anatomopathologie ; les ☒ signalent les résultats confirmés sur prélèvements histologiques.

Table 1: Clinical characteristics of patients analyzed for *ALK* and *ROS1* rearrangement status. F: woman; H: men; ICC; immunocytochemistry; IHC: immunohistochemistry; NR: not available; * are cytological samples performed both in cell biology and anatomopathology laboratories; ☒ are results confirmed on histological samples.

Patient	Age (années)	Sexe	Tabagisme	Prélèvement cytologique (% de cellules malignes)	Prélèvement histologique	ROS1		ALK	
						ICC/IHC	FISH	ICC/IHC	FISH
1	53	H	Oui	Liquide pleural (3)		Négatif	NR	Négatif *	NR
2	51	H	Oui	Liquide pleural (11)	Biopsie pleurale	Positif *⌘	Positif	NR	NR
3	59	H	Oui	Liquide pleural (50)	Biopsie pleurale	Négatif ⌘	NR	Négatif ⌘	NR
4	54	F	Non	Liquide pleural (50)	Biopsie pleurale	Négatif ⌘	NR	Négatif ⌘	NR
5	62	F	Oui	Liquide pleural (58)	Biopsie pleurale	Négatif ⌘	NR	Négatif ⌘	NR
6	62	H	Oui	Liquide pleural (11)	Biopsie pleurale	Négatif ⌘	NR	Négatif ⌘	NR
7	67	H	Oui	Liquide pleural (20)		Douteux	Négatif	Douteux *	Négatif
8	63	H	Oui	Liquide pleural (15)	Biopsie lobe supérieur droit	Négatif ⌘	NR	Négatif ⌘	NR
9	63	H	Non	Liquide pleural (50)	Biopsie pleurale	Négatif ⌘	NR	Positif ⌘	Positif ⌘
10	60	F	Non	Liquide péricardique (75)	Biopsie péricardique	NR	NR	Positif ⌘	Positif ⌘
11	76	F	Oui	Brossage bronchique (18)	Masse lobe supérieur droit	Négatif ⌘	NR	Négatif *⌘	NR
12	83	H	Oui	Brossage bronchique (> 50)		Négatif *	NR	Négatif *	NR
13	74	F	Oui	Lavage broncho-alvéolaire (25)	Biopsie lobe supérieur gauche	Négatif ⌘	NR	Négatif ⌘	NR
14	74	F	Non	Lavage broncho-alvéolaire (19)		NR	NR	Positif	Positif
15	45	F	Oui	Cytoponction masse hilare gauche (60)		Négatif	NR	Négatif *	NR
16	55	H	Oui	Cytoponction masse para-trachéale (7)	Masse para-trachéale	Négatif ⌘	NR	Négatif ⌘	NR
17	69	H	Oui	Cytoponction masse para-trachéale (80)	Biopsie lobe supérieur droit	Négatif ⌘	NR	Négatif ⌘	NR
18	50	H	Oui	Cytoponction ganglionnaire 10R (8)	Nodule de l'apex droit	Négatif *⌘	NR	Négatif ⌘	NR
19	53	F	Non	Cytoponction ganglionnaire 10 R (50)	Biopsie hépatique	Négatif ⌘	NR	Négatif ⌘	NR
20	57	H	Oui	Cytoponction ganglionnaire 11R (40)	Ganglion cervical droit	Négatif *⌘	NR	Négatif *⌘	NR
21	63	F	Oui	Cytoponction ganglionnaire 4L (35)	Masse lobe inférieur gauche	Négatif *⌘	NR	Négatif *⌘	NR
22	38	H	Oui	Cytoponction ganglionnaire 4R (10)	Métastase cérébrale	Négatif ⌘	NR	Négatif *⌘	NR
23	61	H	Oui	Cytoponction ganglionnaire 4R (< 5)		Négatif *	NR	Négatif *	NR
24	58	H	Oui	Cytoponction ganglionnaire 4R (81)	Ganglion sous-carénaire	Négatif ⌘	NR	Négatif ⌘	NR
25	67	H	Oui	Cytoponction ganglionnaire 4R (44)	Biopsie bronchique	Négatif ⌘	NR	Négatif ⌘	NR
26	61	H	Oui	Cytoponction ganglionnaire 7 (48)	Masse fowler droit	Négatif ⌘	NR	Négatif ⌘	NR

27	64	F	Oui	Cytoponction ganglionnaire 7 (90)	Biopsie lobe supérieur droit	Négatif ✕	NR	Négatif ✕	NR
----	----	---	-----	-----------------------------------	------------------------------	-----------	----	-----------	----

Tableau 1 : Données des patients analysés pour la recherche des réarrangements de *ROS1* et *ALK*. F : femme ; H : homme ; ICC : immunocytochimie ; IHC : immunohistochimie ; NR : non réalisé ; Les * signalent les prélèvements cytologiques analysés en parallèle en Biologie Cellulaire et en Anatomopathologie ; les ✕ signalent les résultats confirmés sur prélèvements histologiques.