



**HAL**  
open science

## Detection of ALK and ROS1 rearrangements by immunocytochemistry on cytological samples

Diane Frankel, Donatienne Boulard, Stephane Garcia, Andrée Robaglia-Schlupp, Emel Peker, Adele Groliere, Elise Kaspi, Patrice Roll

### ► To cite this version:

Diane Frankel, Donatienne Boulard, Stephane Garcia, Andrée Robaglia-Schlupp, Emel Peker, et al.. Detection of ALK and ROS1 rearrangements by immunocytochemistry on cytological samples. *Annales de Pathologie*, 2019, 39 (3), pp.227-236. 10.1016/j.annpat.2018.12.003 . hal-02461444

**HAL Id: hal-02461444**

**<https://amu.hal.science/hal-02461444>**

Submitted on 25 Oct 2021

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial 4.0 International License

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

3

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

6 Diane FRANKEL<sup>1,2,\*¶</sup>, Donatienne BOURLARD<sup>1¶</sup>, Stéphane GARCIA<sup>3,4</sup>, Andrée Robaglia-  
7 Schlupp<sup>1</sup>, Emel PEKER<sup>1</sup>, Adèle GROLIERE<sup>1</sup>, Elise KASPI<sup>1,2</sup> et Patrice ROLL<sup>1,2</sup>

8 **1** APHM, Hôpital la Timone, Service de Biologie Cellulaire, Marseille, France

9 **2** Aix Marseille Univ, INSERM, MMG, Marseille, France

10 **3** APHM, Hôpital Nord, Service d'Anatomie et Cytologie Pathologiques, Marseille

11 **4** Aix Marseille Université, INSERM U624 – CRCM Parc scientifique de Luminy

12

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

14 \* Auteur correspondant :

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

18

19 **Remerciements :**

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

22

23 **Mot Clés :**

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

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

27

## 28 **Résumé**

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

47

48 The identification of *ALK* and *ROS1* rearrangements has become essential for the  
49 **theranostic** management of patients with non-small cell lung cancer, especially in stage IV or  
50 inoperable patients. These testings are now performed by immunohistochemistry on  
51 histological samples and confirmed by fluorescent *in situ* hybridization in case of positive or  
52 doubtful results. The diagnosis of lung cancer is often performed at an advanced or metastatic  
53 stage and cytological sample could be the only material containing malignant cells available  
54 at these stages. Therefore, the detection of *ALK* and *ROS1* rearrangement by  
55 immunocytochemical analysis on cytological specimens is needed. We performed this test on  
56 **27** cytological samples of lung adenocarcinomas, and we compared our results with several  
57 other techniques: on the same sample or on biopsy in another laboratory, on the same sample  
58 by fluorescent *in situ* hybridization and/or immunochemistry. We found a very good  
59 concordance between all these techniques, thus validating our immunocytochemical method  
60 on cytological samples according to the ISO 15189 norm.

## 61 Introduction

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

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

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

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

113

## 114 **Matériels et méthodes**

115

### 116 Analyse et diagnostic cytologiques

117 Les liquides de ponction ont été reçus dans le Service de Biologie Cellulaire (Assistance  
118 Publique des Hôpitaux de Marseille, APHM). Des spots de cyto centrifugation (3 minutes à  
119 2000 rpm) ont été réalisés. Ceux-ci ont ensuite été colorés au May-Grunwald-Giemsa, ou  
120 fixés dans un mélange acétone-méthanol avant coloration au Papanicolaou, ou congelés en  
121 attente de l'immunocytochimie (ICC) ou de la FISH. L'analyse cytologique a permis  
122 d'identifier et de déterminer, grâce aux colorations standards (microscope optique Leica,  
123 Wetzlar, Allemagne), le pourcentage de cellules malignes. La caractérisation de ces cellules a  
124 été réalisée en immunocytochimie, à partir des spots de cyto centrifugation congelés. Les  
125 anticorps testés pour la confirmation d'adénocarcinome bronchique sont l'anti -CK7, -EMA, -  
126 EpCAM, -ACE et -TTF1. La technique utilisée est la même que celle décrite ci-après. Au  
127 total, 27 prélèvements ont été inclus entre Novembre 2017 et Septembre 2018. La recherche

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

133

#### 134 Immunocytochimie *ALK* et *ROS1*

135 Le protocole d'immunocytochimie suit les recommandations du fournisseur (SensiTek  
136 HRP, ScyTek, Logan, USA). Après décongélation à température ambiante, les spots de  
137 cyto centrifugation sont fixés dans la paraformaldéhyde (PAF) 4% puis incubés dans une  
138 solution d'inhibition des peroxydases endogènes. Les sites de fixation non spécifiques sont  
139 saturés avec du sérum de cheval. Les anticorps primaires (anticorps anti-*ROS1*, clone D4D6,  
140 1/250<sup>ème</sup>, Cell signaling, Leiden, Netherlands ; anticorps anti-*ALK*, clone 5A4, 1/25<sup>ème</sup>,  
141 Abcam, Cambridge, United Kingdom) et leur contrôles isotypiques (IgG souris, Jackson  
142 ImmunoResearch, West Grove, USA ; IgG lapin, R&D systems, Lille, France) sont incubés  
143 pendant une heure à température ambiante. L'anticorps secondaire couplé à la biotine est  
144 incubé pendant 15 minutes, suivi de l'avidine couplé à la peroxydase pendant 20 minutes. Le  
145 chromogène (DAB Quanto, Thermo Scientific™, Waltham, USA) est ensuite ajouté pendant  
146 5 minutes. Chaque étape est suivie d'un à deux lavages au PBS et/ou à l'eau stérile. Les  
147 noyaux sont contre-colorés à l'hémalun de Mayer, puis les lames sont montées en aquatex®  
148 (Merck, Darmstadt, Allemagne). La lecture et l'interprétation des résultats ont été réalisées  
149 par trois cytologistes (microscope Leica, Wetzlar, Allemagne), de façon indépendante. Des  
150 contrôles négatifs (contrôles isotypiques) et un contrôle positif (patients positifs en ICC et  
151 FISH, conformément aux recommandations de la Société Française de Pathologie (SFP) et de  
152 l'Association Française d'Assurance Qualité en Anatomie Pathologique (AFAQAP)) sont  
153 réalisés à chaque manipulation afin de garantir l'absence de problème technique lors de la  
154 réalisation de l'immunocytochimie. Un marquage douteux ou positif (plus intense que le  
155 contrôle négatif) dès deux cellules malignes a entraîné un contrôle par technique FISH.

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

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

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

167

## 168 FISH

169 Les lames décongelées la veille sont incubées pendant 10 minutes dans un mélange HCl  
170 0,01N/ pepsine (0,5%) à 37°C au bain marie puis rincées au PBS. Les lames sont ensuite  
171 incubées dans une solution de formaldéhyde (1%) pendant 10 minutes, déshydratées après  
172 rinçage au PBS dans des bains d'éthanol successifs à 70°, 90° et 100° (3 minutes) puis  
173 séchées. La dénaturation et l'hybridation des sondes sont réalisées dans un thermobrite (Leica  
174 Biosystems, Wetzlar, Allemagne). La dénaturation s'effectue selon les recommandations du  
175 fournisseur, pendant 10 minutes à 75°C pour la sonde ROS1 (zytolight SPEC ROS1 Dual  
176 Color Break Apart Probe (PL101), ZytoVision, Bremerhaven, Allemagne) et pendant 4  
177 minutes à 75°C pour la sonde ALK (Vysis LSI ALK Dual Color Break Apart, rearrangement  
178 Probe, Abbott Molecular, Des Plaines, Illinois), suivi d'une hybridation à 37°C sur la nuit.  
179 Les lames sont enfin lavées dans des bains tamponnés (Saline-Sodium Citrate buffer 0,4X à  
180 72°C pendant 2min puis 2X à température ambiante pendant 30 secondes). Un marquage  
181 nucléaire au DAPI (DAPI II Counterstain (125ng/ml), Abbott, Chicago, Illinois, États-Unis)  
182 est ensuite réalisé. Les prélèvements ont été lus par deux opérateurs de manière indépendante,  
183 comptant 100 noyaux chacun. Le seuil de positivité (2%) a été établi à partir de prélèvements  
184 ne présentant pas de réarrangement.

185

186

## 187 **Résultats**

188

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

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

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

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

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

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

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

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

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

233

## 234 **Discussion**

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

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

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

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

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

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

293

## 294 **Conclusion**

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

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

303

304

305

## 306 **Références**

307 1. Shea M, Costa DB, Rangachari D. Management of advanced non-small cell lung  
308 cancers with known mutations or rearrangements: latest evidence and treatment approaches.  
309 *Ther Adv Respir Dis.* avr 2016;10(2):113-29.

310 2. Travis WD, Brambilla E, Nicholson AG, Yatabe Y, Austin JHM, Beasley MB, et al.  
311 The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors: Impact of Genetic,  
312 Clinical and Radiologic Advances Since the 2004 Classification. *J Thorac Oncol Off Publ Int*  
313 *Assoc Study Lung Cancer.* sept 2015;10(9):1243-60.

314 3. Lindeman NI, Cagle PT, Aisner DL, Arcila ME, Beasley MB, Bernicker EH, et al.  
315 Updated Molecular Testing Guideline for the Selection of Lung Cancer Patients for Treatment  
316 With Targeted Tyrosine Kinase Inhibitors: Guideline From the College of American  
317 Pathologists, the International Association for the Study of Lung Cancer, and the Association  
318 for Molecular Pathology. *Arch Pathol Lab Med.* mars 2018;142(3):321-46.

319 4. Rodig SJ, Mino-Kenudson M, Dacic S, Yeap BY, Shaw A, Barletta JA, et al. Unique  
320 clinicopathologic features characterize ALK-rearranged lung adenocarcinoma in the western  
321 population. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 15 août 2009;15(16):5216-23.

322 5. Soda M, Choi YL, Enomoto M, Takada S, Yamashita Y, Ishikawa S, et al.  
323 Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer.  
324 *Nature.* 2 août 2007;448(7153):561-6.

325 6. Bergethon K, Shaw AT, Ou S-HI, Katayama R, Lovly CM, McDonald NT, et al.  
326 ROS1 rearrangements define a unique molecular class of lung cancers. *J Clin Oncol Off J Am*  
327 *Soc Clin Oncol.* 10 mars 2012;30(8):863-70.

328 7. Solomon BJ, Mok T, Kim D-W, Wu Y-L, Nakagawa K, Mekhail T, et al. First-line  
329 crizotinib versus chemotherapy in ALK-positive lung cancer. *N Engl J Med.* 4 déc  
330 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, Pavlakakis 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.

- 368 19. Lantuejoul S, Rouquette I, Blons H, Le Stang N, Ilie M, Begueret H, et al. French  
369 multicentric validation of ALK rearrangement diagnostic in 547 lung adenocarcinomas. *Eur*  
370 *Respir J.* juill 2015;46(1):207-18.
- 371 20. Savic S, Bode B, Diebold J, Tosoni I, Barascud A, Baschiera B, et al. Detection of  
372 ALK-positive non-small-cell lung cancers on cytological specimens: high accuracy of  
373 immunocytochemistry with the 5A4 clone. *J Thorac Oncol Off Publ Int Assoc Study Lung*  
374 *Cancer.* août 2013;8(8):1004-11.
- 375 21. Wang W, Tang Y, Li J, Jiang L, Jiang Y, Su X. Detection of ALK rearrangements in  
376 malignant pleural effusion cell blocks from patients with advanced non-small cell lung  
377 cancer: a comparison of Ventana immunohistochemistry and fluorescence in situ  
378 hybridization. *Cancer Cytopathol.* févr 2015;123(2):117-22.
- 379 22. Vlajnic T, Savic S, Barascud A, Baschiera B, Bihl M, Grilli B, et al. Detection of  
380 ROS1-positive non-small cell lung cancer on cytological specimens using  
381 immunocytochemistry. *Cancer Cytopathol.* 16 févr 2018;
- 382 23. Frankel D, Nanni-Metellus I, Robaglia-Schlupp A, Tomasini P, Guinde J, Barlesi F, et  
383 al. Detection of EGFR, KRAS and BRAF mutations in metastatic cells from cerebrospinal  
384 fluid. *Clin Chem Lab Med.* 25 avr 2018;56(5):748-53.
- 385 24. Marchetti A, Di Lorito A, Pace MV, Iezzi M, Felicioni L, D'Antuono T, et al. ALK  
386 Protein Analysis by IHC Staining after Recent Regulatory Changes: A Comparison of Two  
387 Widely Used Approaches, Revision of the Literature, and a New Testing Algorithm. *J Thorac*  
388 *Oncol Off Publ Int Assoc Study Lung Cancer.* avr 2016;11(4):487-95.
- 389 25. Garinet S, Laurent-Puig P, Blons H, Oudart J-B. Current and Future Molecular Testing  
390 in NSCLC, What Can We Expect from New Sequencing Technologies? *J Clin Med.* 9 juin  
391 2018;7(6).

392

393

394

395

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

403

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

412

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

420

421

**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.

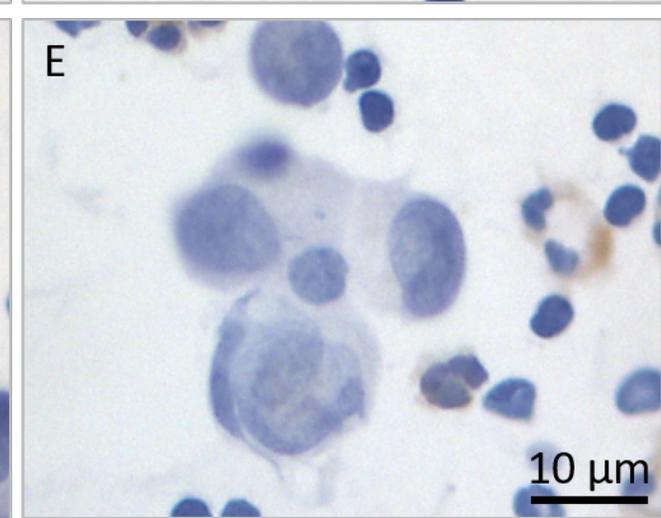
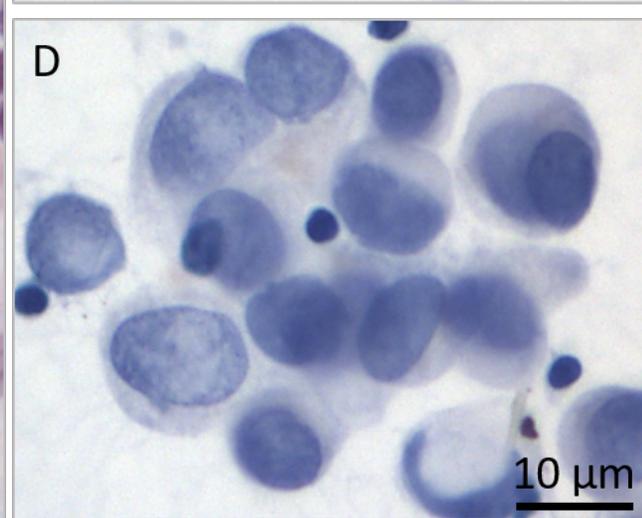
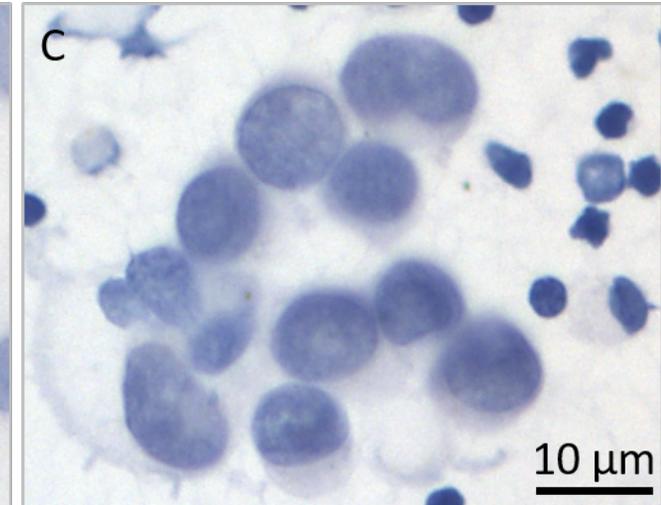
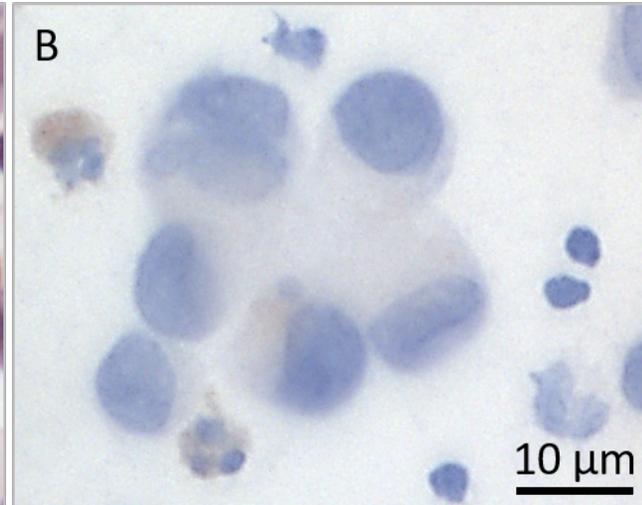
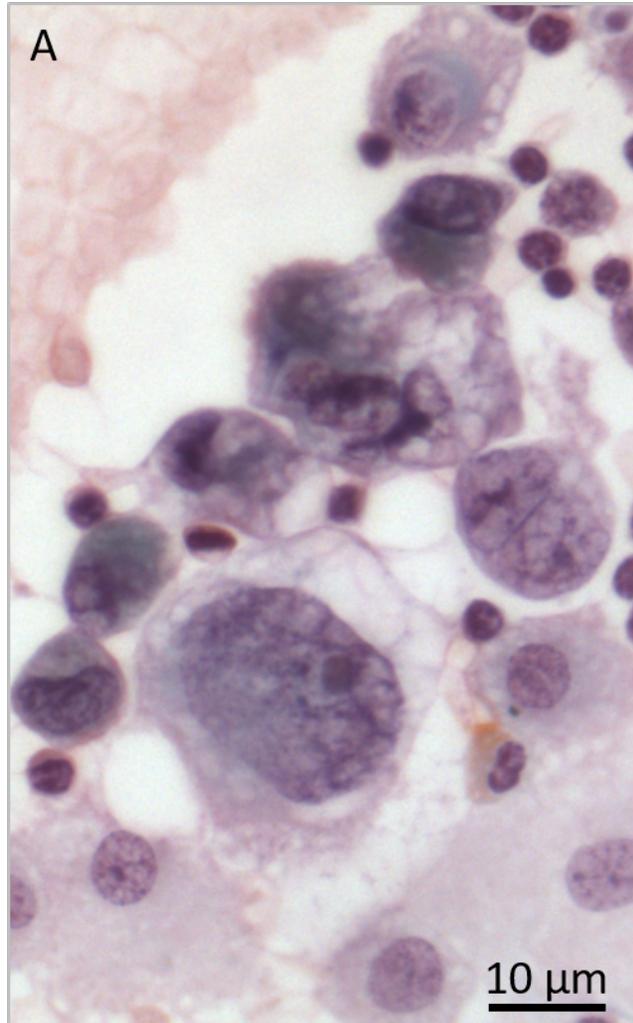
**Figure 3 : Réarrangement *ALK* dans les cellules métastatiques d'un adénocarcinome pulmonaire (liquide péricardique, patient 10).** **A** : Anticorps anti-*ALK*, expression de la protéine *ALK*, (marquage cytoplasmique). **B** : Contrôle isotypique souris, témoin négatif de l'anti-*ALK*, absence de 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.

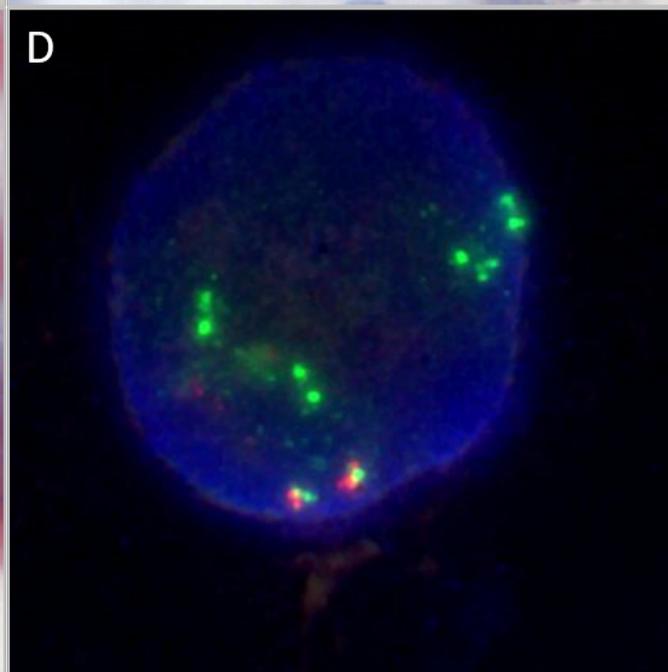
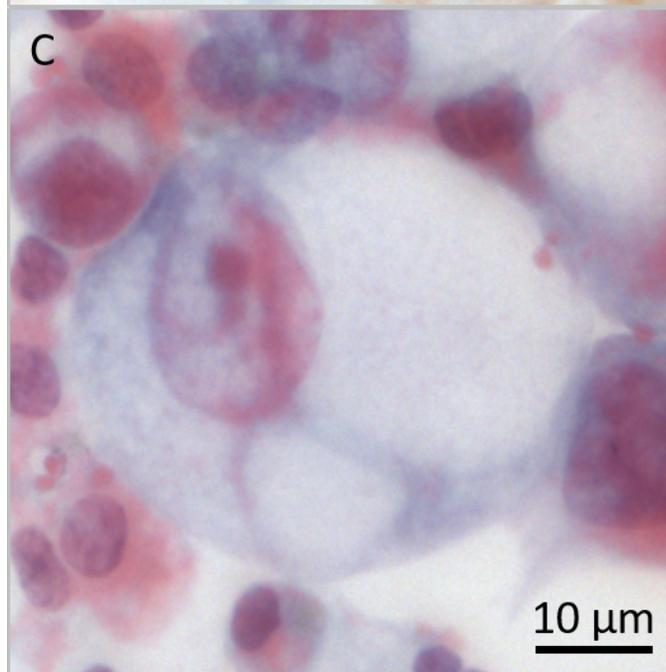
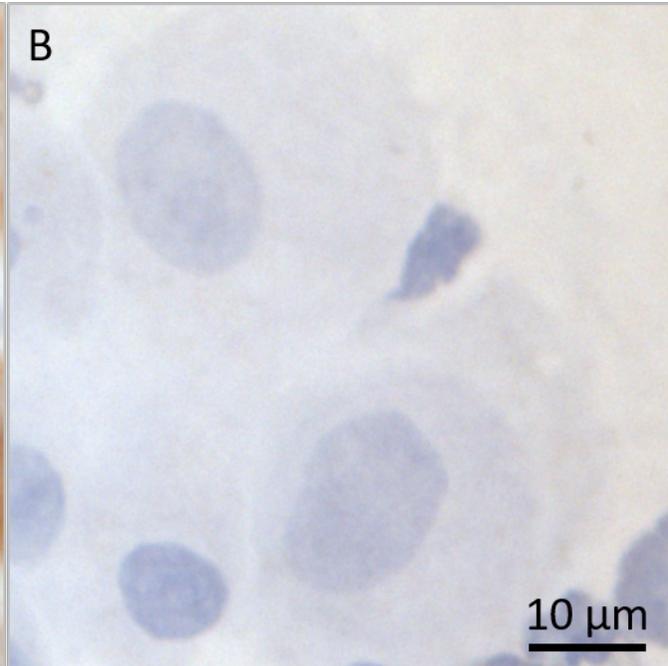
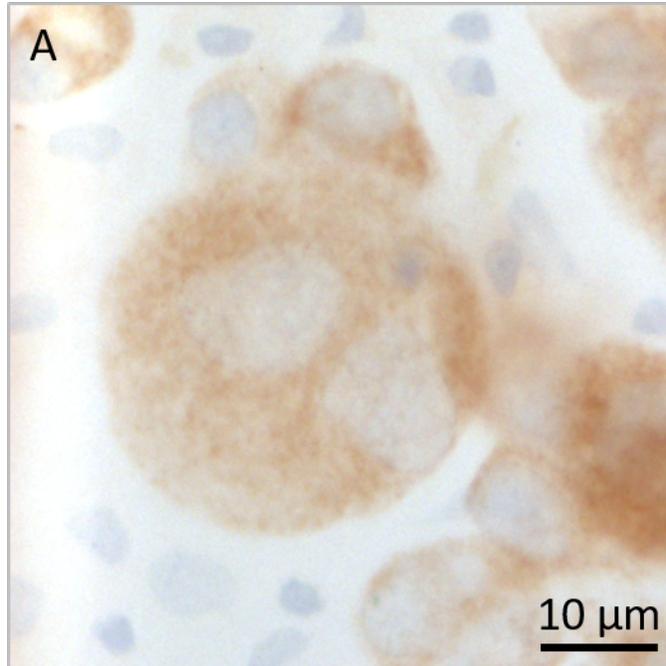
**Figure 3: *ALK* rearrangement in lung adenocarcinoma metastatic cells (pericardial effusion, patient 10).** **A and B**: Immunocytochemistry using antibodies against **A**: *ALK*, showing a positive staining, **B**: Mouse isotypic control, showing a normal negative staining;

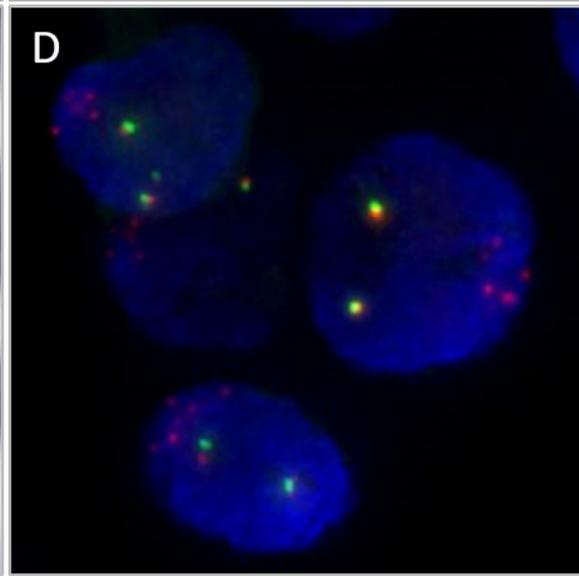
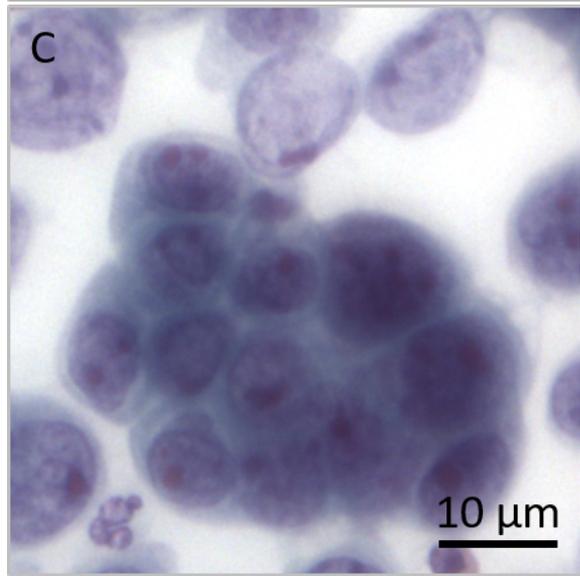
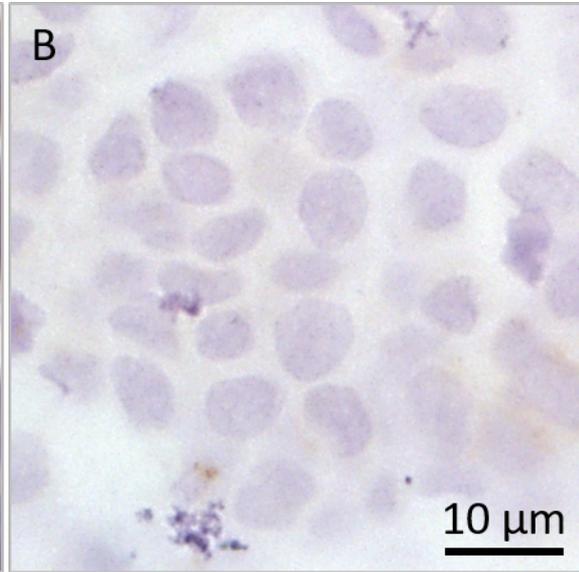
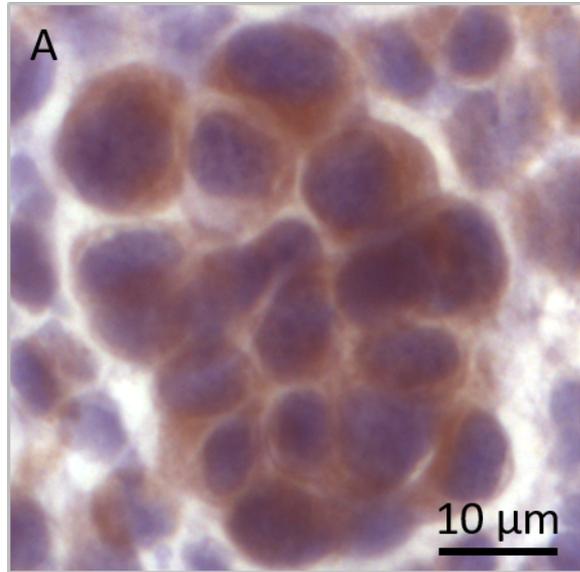
**C:** Malignant cells, Papanicolaou stain, x40; **D:** Nucleus of malignant cells, *ALK* FISH probe. Supplemental signals demonstrate a polyploidy and the loss of green signals (2) compared to red signals (4 to 5) demonstrates the rearrangement; x100.

**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	<b>Positif</b> *⊠	<b>Positif</b>	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	<b>Positif</b> ⊠	<b>Positif</b> ⊠
10	60	F	Non	Liquide péricardique (75)	Biopsie péricardique	NR	NR	<b>Positif</b> ⊠	<b>Positif</b> ⊠
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	<b>Positif</b>	<b>Positif</b>
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.