



Recommandations pour le testing ROS1 dans les CBNPC

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

Avant-propos

Contexte

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

Après la description en 2007 du réarrangement du gène *ALK* (3), l'usage de la thérapie anti-ALK (crizotinib) a montré un bénéfice en survie globale et en survie sans récurrence pour les patients dont la tumeur comporte cette anomalie (4), comparé aux chimiothérapies classiques. Par la suite, cette même molécule a également obtenu l'autorisation de mise sur le marché (AMM) pour les carcinomes avec réarrangements de *ROS1*. De fait, il existe une communauté structurale entre les kinases *ROS1* et *ALK* (77% d'homologie des acides aminés) au niveau du site de fixation ATP, et les lignées cellulaires arborant l'une ou l'autre de ces anomalies moléculaires sont sensibles au crizotinib et à d'autres inhibiteurs de tyrosine kinase (ceritinib, entrectinib).

L'oncogène *ROS1* code un récepteur tyrosine kinase orphelin appartenant à la super-famille des récepteurs à l'insuline. Ce proto-oncogène est activé par réarrangement inter ou intra-chromosomique sur le chromosome 6. Ce réarrangement permet la fusion d'une portion du gène dans sa partie C-terminale codant le domaine cytoplasmique tyrosine kinase, avec différents partenaires (12 connus à ce jour) dont le plus fréquent (35% des cas) est *CD74* (5). La kinase est alors constitutivement activée et devient moteur pour la transformation oncogénique de la cellule et des cascades d'activation des voies MAPK, JAK/STAT et PI3K.

Le réarrangement de *ROS1* est décrit dans 1% des CBNPC et 2% des ADC non mutés pour les autres altérations oncogéniques (« triple négatifs » pour *EGFR*, *KRAS* et *ALK*) (6,7). Comme le réarrangement d'*ALK*, il est plus fréquent chez les patients non-fumeurs, ex ou petits fumeurs, plus jeunes, et dans certaines études chez la femme et dans la population asiatique. La maladie est souvent de stade IV. Si l'anomalie est plus fréquente dans les ADC, il n'existe pas de surreprésentation d'un sous-type histologique précis, quoique environ 1/3 des patients a un ADC plutôt peu différencié (8). La présence de réarrangement du gène *ROS1* identifie une population de patients sensibles au crizotinib, quel que soit le partenaire de fusion. Le taux de réponse (72%) est comparable à celui des patients avec réarrangement du gène *ALK* (61%), mais la durée de réponse sous crizotinib est quasi le double pour les patients *ROS1* réarrangés : 75,9 versus 49,1 semaines, et la médiane de survie sans progression est de 19,2 versus 9,7 mois (7).

Pour mémoire, ROS1 est également exprimé dans les tumeurs myofibroblastiques inflammatoires.

Aux États-Unis, l'AMM du crizotinib (pour les patients *ROS1* réarrangés) reposait initialement sur un test d'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH) positif. En France, la prescription du médicament nécessite un test « positif » et l'immunohistochimie (IHC) est utilisée dans bon nombre de structures comme *pré-screening*, complétée par FISH ou par un test moléculaire (ADN ou ARN) pour valider les tests positifs.

Testing ROS1

Deux techniques sont utilisées en France dans les laboratoires de pathologie pour déterminer le statut ROS1 : l'IHC qui détecte la surexpression de la protéine sous forme d'un marquage cytoplasmique granuleux et la FISH qui met en évidence le réarrangement extra ou plus rarement intra-chromosomique du gène *ROS1*. Elles peuvent être réalisées sur tissu (biopsies, pièces opératoires) ou sur matériel cytologique, de préférence sur un culot d'inclusion, mais également sur lames d'étalement ou de cyto centrifugation (9).

L'IHC est une technique simple, rapide et peu coûteuse. Elle est utilisée en première intention et a pour avantage d'être interprétable même si la cellularité tumorale est minime. Sa validité dépend toutefois de la qualité des étapes pré-analytiques, du choix de l'anticorps primaire, de la technique de détection et de l'utilisation d'un témoin positif. Une IHC ROS1 positive ne suffit pas, à elle seule, à poser l'indication d'un traitement ciblé.

La FISH est utilisée pour la validation des tests IHC positifs, quelle que soit l'intensité du signal. Nécessitant un équipement et une expertise spécifiques, elle n'est pas réalisée dans toutes les structures d'Anatomie et Cytologie Pathologiques (ACP). Le temps technique et de lecture allonge en outre le délai de prescription des traitements.

La **détection immunohistochimique** est réalisée avec le clone D4D6 (Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts), seul clone actuellement disponible et validé, présenté en anticorps à diluer (10). Le test n'est pas encore disponible en CE-IVD (*In Vitro Diagnostic*). Des exemples de protocoles, extraits de publications ayant utilisé cet anticorps sur différentes plateformes, sont présentés au chapitre 5 de l'atlas IASLC pour le testing ALK et ROS (11). Les travaux ayant comparé l'IHC de ROS1 avec la FISH rapportent une sensibilité de 94 à 100% et une spécificité de 76 à 100% (10). Toutefois, les résultats sont très dépendants du seuil utilisé en matière d'intensité de signal et de pourcentage de cellules tumorales marquées. Si on utilise une intensité forte (+++), la spécificité peut atteindre 100% mais la sensibilité décroît. L'interprétation de l'intensité est subjective, mais les cas réarrangés ont généralement un marquage de distribution homogène. Des publications récentes de la littérature préconisent le calcul d'un H-score, sachant que la probabilité de réarrangement est élevée si celui-ci est supérieur à 100 ou 150 (12, 13). Le type de marquage peut varier selon le partenaire de fusion : en général granuleux cytoplasmique ou globuleux pour CD74-ROS1, cytoplasmique et membranaire faible pour EZR-ROS1 et vésiculaire pour GOPC-ROS1. Des marquages d'intensité variable sont parfois décrits au niveau des pneumocytes de type II hyperplasiques, dans des foyers de métaplasie cubique, des macrophages et des cellules géantes. Des marquages faibles ont également été rapportés dans des ADC mucineux non réarrangés (10).

Chaque structure d'ACP doit maîtriser son protocole et ajouter systématiquement un contrôle externe (tumeur pulmonaire ROS1 positive en IHC et en FISH ou lignées cellulaires, par exemple HCC78 ou U-118MG). Si le protocole est bien adapté, la grande sensibilité du test permet de considérer qu'une absence de marquage IHC est synonyme d'une absence de réarrangement de *ROS1*. La recommandation est de vérifier par FISH ou par un test moléculaire tout résultat positif en immunohistochimie, même les cas avec faible intensité du signal (14). La probabilité de mettre en évidence un réarrangement est corrélée à la présence d'une intensité au moins modérée et généralement homogène du marquage. Toutefois, un

marquage d'intensité faible et/ou hétérogène peut être la conséquence de conditions pré-analytiques sub-optimales et une technique alternative (FISH ou moléculaire) permettra alors de prouver le réarrangement.

La **FISH** est la méthode cytogénétique de référence. Elle détecte théoriquement le réarrangement quel que soit le partenaire de fusion, sans pouvoir l'identifier. Il n'existe pas actuellement de technique d'hybridation *in situ* chromogénique pour la détection des réarrangements. Le signal observé avec une sonde de séparation (*break-apart*) est de type vert-rouge dissocié dans 70% des cas ou sous forme de signaux verts isolés [3'] dans 30% des cas (15). L'espacement des signaux doit être égal à au moins la taille d'un signal, et un signal anormal présent dans au moins 15% des cellules (ce seuil est lié à la difficulté de discriminer un noyau tumoral d'un noyau d'une cellule non tumorale en FISH, et non à l'hétérogénéité intra-tumorale). À l'opposé, un signal rouge isolé (sonde Clinisciences) n'est pas considéré comme un réarrangement. La FISH est la méthode qui a joué un rôle crucial dans les études de prévalence et qui a permis d'inclure les patients dans les essais thérapeutiques avec le crizotinib. Il existe toutefois des limitations liées aux techniques FISH en général (16) : qualité de la réalisation de la technique, reconnaissance des cellules tumorales sur des échantillons pauci-cellulaires (exemple de la lymphangite), bruit de fond par hybridation aberrante de la sonde (avec risque de faux positif), hétérogénéité cellulaire. D'autres limitations sont plus spécifiques à la FISH ROS1, comme un réarrangement non productif (sans expression de la protéine et à risque de faux-positif) ou un réarrangement intra-chromosomique lié à une délétion génomique de petite taille comme les fusions *GOPC-ROS1* (17), non détectées avec la sonde Vysis, mais détectées avec la sonde Clinisciences, ou encore CEP85L, TPD52L1, SLC34A2. La technique FISH ne peut être interprétée que sur un prélèvement comportant un nombre suffisant de cellules tumorales (au moins 50 noyaux intacts) et doit faire l'objet d'une double lecture. Lorsque le nombre de cellules réarrangées se situe entre 10 et 30%, il convient de recompter 50 noyaux tumoraux (11).

En raison du nombre toujours croissant de cibles oncogéniques dans le cancer du poumon non à petites cellules, des **techniques de biologie moléculaire** ont été développées, permettant d'identifier les réarrangements : qRT-PCR, NGS ADN ou ARN et panels spécifiques de fusions. Leur sensibilité est élevée sans toutefois atteindre 100%. Les différentes méthodes ne sont pas à 100% concordantes (17) et il est recommandé de prendre en compte ces limitations dans l'interprétation des résultats.

Les techniques d'IHC et de FISH *ROS1* et les techniques moléculaires doivent être encadrées par des évaluations externes de la qualité (EEQ), comme pour tous les biomarqueurs prédictifs.

Assurance qualité

Pour l'heure, seule l'*European Society of Pathology* organise, depuis 2014, des tests annuels EEQ pour ROS1, en IHC et en FISH, avec des résultats plutôt satisfaisants. Un premier test AFAQAP en IHC est prévu fin 2018 et sera reconduit en 2019. Un test HIS sera par ailleurs introduit en 2019.

Algorithme

Depuis 2018, les recommandations de *testing* moléculaire (18) incluent la recherche systématique sur coupes de ROS1 pour tous les ADC à un stade avancé, en même temps que la détection de l'expression des protéines ALK et PD-L1, ainsi que la recherche de mutations, et ce quelles que soient les caractéristiques cliniques.

L'immunohistochimie peut être utilisée comme un outil de dépistage. Tous les cas positifs, quels que soient l'intensité et le pourcentage de cellules marquées, doivent être contrôlés par FISH ou par technique moléculaire. Les cas totalement négatifs, en présence d'un témoin positif, ne nécessitent pas de contrôle

par une technique alternative, sauf situations rares (absence de toute altération moléculaire, statut non-fumeur, petit fumeur ou ex-fumeur, patient jeune). Un test ROS1 peut aussi être réalisé à la demande des cliniciens sur des cas particuliers, quel que soit le type histologique.

Bibliographie

1. Epidémiologie des cancers - Les chiffres du cancer en France. *Institut National Du Cancer 2016*.
<http://www.e-cancer.fr/Professionnels-de-sante/Les-chiffres-du-cancer-en-France/Epidemiologie-des-cancers>
2. Locher C, Debieuvre D, Coëtmeur D, Goupil F, Molinier O, Collon T, et al. Major changes in lung cancer over the last ten years in France: the KBP-CPHG studies. *Lung Cancer 2013;81:32–8*.
3. Soda M, Choi YL, Enomoto M, Takada S, Yamashita Y, Ishikawa S, et al. Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature 2007;448:561–6*.
4. Solomon BJ, Mok T, Kim D-W, Wu Y-L, Nakagawa K, Mekhail T, et al. First-line crizotinib versus chemotherapy in ALK-positive lung cancer. *N Engl J Med 2014;371:2167–77*.
5. Park S, Ahn BC, Lim SW, Sun JM, Kim HR, Hong MH, et al. Characteristics and outcome of ROS1-positive non-small cell lung cancer patients in routine clinical practice. *J Thorac Oncol 2018 Jun 5. pii: S1556-0864(18)30673-7*.
6. Dugay F, Llamas-Gutierrez F, Gournay M, Medane S, Mazet F, Chiforeanu DC et al. Clinicopathological characteristics of ROS1- and RET-rearranged NSCLC in caucasian patients: data from a cohort of 713 non-squamous NSCLC lacking KRAS/EGFR/HER2/BRAF/PIK3CA/ALK alterations. *Oncotarget 2017;8:53336-51*.
7. Shaw AT, Ou SH, Bang YJ, Camidge R, Solomon BJ, Salgia R et al. Crizotinib in ROS1-rearranged non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med 2014;371:1963-71*.
8. Bergethon K, Shaw AT, Ou SH, Katayama R, Lovly CM, McDonald NT et al. ROS1 rearrangements define a unique molecular class of lung cancers. *J Clin Oncol 2012;30:863-70*.
9. Vljajnic 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 Cytopathology 2018;126:421-29*.
10. Luk PP, Selinger CI, Mahar A, Cooper WA. Biomarkers for ALK and ROS1 in lung cancer. Immunohistochemistry and fluorescent in situ hybridization. *Arch Pathol Lab Med 2018;142:922-8*. IASLC atlas of ALK and ROS1 testing in lung cancer. *IASLC press office 2013*.
<https://www.iaslc.org/publications/iaslc-atlas-alk-and-ros1-testing-lung-cancer>
11. Boyle TA, Masago K, Ellison KE, Yatabe Y, Hirsch FR. ROS1 immunohistochemistry among major genotypes of non-small-cell lung cancer. *Clin Lung Cancer 2015;16:106-11*.
12. Yoshida A, Tsuta K, Wakai S, Arai Y, Asamura H, Shibata T et al. Immunohistochemical detection of ROS1 is useful for identifying ROS1 rearrangements in lung cancers. *Mod Pathol 2014;27:711-20*.
13. Bubendorf L, Büttner R, Al-Dayel F, Dietel M, Elmberger G, Kerr K et al. Testing for ROS1 in non-small cell lung cancer: a review with recommendations. *Virchows Arch. 2016; 469:489-503*.
14. Yoshida A, Kohno T, Tsuta K, Wakai S, Arai Y, Shimada Y et al. ROS1-rearranged lung cancer. A clinicopathologic and molecular study of 15 surgical cases. *Am J Surg Pathol 2013;37:554-62*.
15. Camidge DR, Kono SA, Flacco A, Tan AC, Doebele RC, Zhou Q et al. Optimizing the detection of lung cancer patients harboring Anaplastic Lymphoma Kinase (ALK) gene rearrangements potentially suitable for ALK inhibitor treatment. *Clin Cancer Res 2010;16:5581-90*.
16. Davies KD, Le AT, Sheren J, Nijmeh H, Gowan K, Jones KL et al. Comparison of molecular testing modalities for detection of ROS1 rearrangements in a cohort of positive patient samples. *J Thorac Oncol 2018; Jun 20. pii: S1556-0864(18)30713-5*.
17. 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. *The Journal of Molecular Diagnostics 2018;20:129-59*.

Recommandations

- La recherche du statut *ROS1* est systématique pour tout nouveau cas d'ADC broncho-pulmonaire (ou de CBPNC non épidermoïde) à un stade localement avancé ou métastatique.
- L'IHC est utilisée en 1^{ère} intention, en *screening*, en même temps que la recherche de l'expression d'ALK et PD-L1.
- Tous les cas positifs en IHC, quels que soient l'intensité et le pourcentage de cellules marquées, sont à contrôler par FISH ou par technique moléculaire.
- Les cas totalement négatifs, en présence d'un témoin positif, ne nécessitent pas de contrôle par une technique alternative.
- L'absence de marquage en IHC contre-indique l'utilisation d'une thérapie ciblée anti-ROS1.
- Le matériel utilisable peut être de nature histologique ou cytologique.
- En l'absence de contrôle interne, il est conseillé d'ajouter un témoin positif sur chaque lame testée (tumeur ROS1+ en IHC et en FISH ou lignée cellulaire).
- La fixation des prélèvements tissulaires (y compris osseux) doit se faire dans du formol tamponné à 10%, pendant au moins 6 h.
- Afin de ne pas compromettre une éventuelle technique FISH, il faut éviter d'utiliser des produits à base d'acides pour décalcifier les prélèvements osseux (préférer l'EDTA), ou choisir de fixer un fragment tissulaire non osseux à part.
- Pour les petits prélèvements, il faut veiller à économiser le matériel et prévoir des coupes non déparaffinées stockées à 4 °C, ou conserver les rubans de paraffine.
- Le seul anticorps primaire anti ROS1 actuellement validé et recommandé est le clone D4D6. Il peut donner de bons résultats sur les différentes plateformes, à condition de bien adapter les protocoles.
- La technique FISH ne peut être interprétée que sur un prélèvement comportant un nombre suffisant de cellules tumorales (au moins 50 noyaux intacts). Le seuil de positivité est de 15% de cellules réarrangées. La lecture des lames en FISH nécessite une expertise spécifique.
- La pratique de l'IHC et de l'IHS *ROS1* à visée théranostique implique de participer à un EEQ annuel.