



HAL
open science

Intérêt de la détection du remaniement du gène ALK en cancérologie pulmonaire : comparaison de 2 techniques de détection (FISH et IHC) sur une série de 254 patients porteurs d'un adénocarcinome pulmonaire

Dalila Mehdaoui

► To cite this version:

Dalila Mehdaoui. Intérêt de la détection du remaniement du gène ALK en cancérologie pulmonaire : comparaison de 2 techniques de détection (FISH et IHC) sur une série de 254 patients porteurs d'un adénocarcinome pulmonaire. Médecine humaine et pathologie. 2012. dumas-00763267

HAL Id: dumas-00763267

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-00763267>

Submitted on 10 Dec 2012

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.

FACULTE MIXTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE DE ROUEN

ANNEE 2012

THESE POUR LE
DOCTORAT EN MEDECINE

(Diplôme d'Etat)

PAR

MEHDAOUI Dalila

NEE LE 01 MAI 1980 A MONTREUIL

PRESENTEE ET SOUTENUE PUBLIQUEMENT LE 11 JUIN 2012

**INTERET DE LA DETECTION DU REMANIEMENT DU GENE
ALK EN CANCEROLOGIE PULMONAIRE
COMPARAISON DE 2 TECHNIQUES DE DETECTION (FISH
ET IHC) SUR UNE SERIE DE 254 PATIENTS PORTEURS
D'UN ADENOCARCINOME PULMONAIRE**

PRESIDENT DE JURY : Professeur Jean-Christophe SABOURIN

DIRECTEUR DE THESE : Professeur Jean-Christophe SABOURIN

ANNEE UNIVERSITAIRE 2011 - 2012
U.F.R. DE MEDECINE-PHARMACIE DE ROUEN

DOYEN : **Professeur Pierre FREGER**

ASSESEURS : **Professeur Michel GUERBET**
Professeur Benoit VEBER
Professeur Pascal JOLY
Professeur Bernard PROUST

DOYENS HONORAIRES : **Professeurs J. BORDE - Ph. LAURET - H. PIGUET – C. THUILLEZ**

PROFESSEURS HONORAIRES : **MM. M-P AUGUSTIN - J.ANDRIEU-GUITRANCOURT - M.BENOZIO- J.BORDE - Ph. BRASSEUR - R. COLIN - E. COMOY - J. DALION -. DESHAYES - C. FESSARD – J.P FILLASTRE - P.FRIGOT -J. GARNIER - J. HEMET - B. HILLEMAND - G. HUMBERT - J.M. JOUANY - R. LAUMONIER – Ph. LAURET - M. LE FUR – J.P. LEMERCIER - J.P LEMOINE - M^{le} MAGARD - MM. B. MAITROT - M. MAISONNET - F. MATRAY - P.MITROFANOFF - M^{me} A. M. ORECCHIONI - P. PASQUIS - H.PIGUET - M.SAMSON – M^{me} SAMSON-DOLLFUS – J.C. SCHRUB - R.SOYER - B.TARDIF -TESTART - J.M. THOMINE – C. THUILLEZ - P.TRON - C.WINCKLER - L.M.WOLF**

I - MEDECINE

PROFESSEURS

M. Frédéric ANSELME	HCN	Cardiologie
M. Bruno BACHY	HCN	Chirurgie pédiatrique
M. Fabrice BAUER	HCN	Cardiologie
M ^{me} Soumeya BEKRI	HCN	Biochimie et Biologie Moléculaire
M. Jacques BENICHOU	HCN	Biostatistiques et informatique médicale
M. Eric BERCOFF	HB	Médecine interne (gériatrie)
M. Jean-Paul BESSOU	HCN	Chirurgie thoracique et cardio-vasculaire
M ^{me} Françoise BEURET-BLANQUART	CRMPR	Médecine physique et de réadaptation
M. Guy BONMARCHAND	HCN	Réanimation médicale
M. Olivier BOYER	UFR	Immunologie
M. Jean-François CAILLARD	HCN	Médecine et santé au Travail
M. François CARON	HCN	Maladies infectieuses et tropicales
M. Philippe CHASSAGNE	HB	Médecine interne (Gériatrie)
M. Alain CRIBIER (Surnombre)	HCN	Cardiologie
M. Antoine CUVELIER	HB	Pneumologie

M. Pierre CZERNICHOW	HCH	Epidémiologie, économie de la santé
M. Jean - Nicolas DACHER	HCN	Radiologie et Imagerie Médicale
M. Stéfan DARMONI	HCN	Informatique Médicale/Techniques de communication
M. Pierre DECHELOTTE	HCN	Nutrition
Mme Danièle DEHESDIN	HCN	Oto-Rhino-Laryngologie
M. Philippe DENIS (Surnombre)	HCN	Physiologie
M. Jean DOUCET	HB	Thérapeutique/Médecine – Interne - Gériatrie.
M. Bernard DUBRAY	CB	Radiothérapie
M. Philippe DUCROTTE	HCN	Hépatologie – Gastro - Entérologie
M. Frank DUJARDIN	HCN	Chirurgie Orthopédique - Traumatologique
M. Fabrice DUPARC	HCN	Anatomie - Chirurgie Orthopédique et Traumatologique
M. Bertrand DUREUIL	HCN	Anesthésiologie et réanimation chirurgicale
Mlle Hélène ELTCHANINOFF	HCN	Cardiologie
M. Thierry FREBOURG	UFR	Génétique
M. Pierre FREGER	HCN	Anatomie/Neurochirurgie
M. Jean François GEHANNO	HCN	Médecine et Santé au Travail
M. Emmanuel GERARDIN	HCN	Imagerie Médicale
Mme Priscille GERARDIN	HCN	Pédopsychiatrie
M. Michel GODIN	HB	Néphrologie
M. Philippe GRISE	HCN	Urologie
M. Didier HANNEQUIN	HCN	Neurologie
M. Fabrice JARDIN	CB	Hématologie
M. Luc-Marie JOLY	HCN	Médecine d'urgence
M. Pascal JOLY	HCN	Dermato - vénéréologie
M. Jean-Marc KUHN	HB	Endocrinologie et maladies métaboliques
Mme Annie LAQUERRIERE	HCN	Anatomie cytologie pathologiques
M. Vincent LAUDENBACH	HCN	Anesthésie et réanimation chirurgicale
M. Alain LAVOINNE	UFR	Biochimie et biologie moléculaire
M. Joël LECHEVALLIER	HCN	Chirurgie infantile
M. Hervé LEFEBVRE	HB	Endocrinologie et maladies métaboliques
M. Xavier LE LOET	HB	Rhumatologie
M. Eric LEREBOURS	HCN	Nutrition
Mlle Anne-Marie LEROI	HCN	Physiologie
M. Hervé LEVESQUE	HB	Médecine interne
Mme Agnès LIARD-ZMUDA	HCN	Chirurgie Infantile

M. Bertrand MACE	HCN	Histologie, embryologie, cytogénétique
M. Eric MALLET (<i>Surnombre</i>)	HCN	Pédiatrie
M. Christophe MARGUET	HCN	Pédiatrie
Mlle Isabelle MARIE	HB	Médecine Interne
M. Jean-Paul MARIE	HCN	ORL
M. Loïc MARPEAU	HCN	Gynécologie - obstétrique
M. Stéphane MARRET	HCN	Pédiatrie
M. Pierre MICHEL	HCN	Hépatologie - Gastro - Entérologie
M. Francis MICHOT	HCN	Chirurgie digestive
M. Bruno MIHOUT	HCN	Neurologie
M. Pierre-Yves MILLIEZ	HCN	Chirurgie plastique, reconstructrice et esthétique
M. Jean-François MUIR	HB	Pneumologie
M. Marc MURAINÉ	HCN	Ophthalmologie
M. Philippe MUSETTE	HCN	Dermatologie - Vénérologie
M. Christophe PEILLON	HCN	Chirurgie générale
M. Jean-Marc PERON	HCN	Stomatologie et chirurgie maxillo-faciale
M. Christian PFISTER	HCN	Urologie
M. Jean-Christophe PLANTIER	HCN	Bactériologie - Virologie
M. Didier PLISSONNIER	HCN	Chirurgie vasculaire
M. Bernard PROUST	HCN	Médecine légale
M. François PROUST	HCN	Neurochirurgie
Mme Nathalie RIVES	HCN	Biologie et méd. du dévelop. et de la reprod.
M. Jean-Christophe RICHARD (<i>Mise en dispo</i>)	HCN	Réanimation Médicale, Médecine d'urgence
M. Horace ROMAN	HCN	Gynécologie Obstétrique
M. Jean-Christophe SABOURIN	HCN	Anatomie – Pathologie
M. Guillaume SAVOYE	HCN	Hépatologie - Gastro
M. Michel SCOTTE	HCN	Chirurgie digestive
Mme Fabienne TAMION	HCN	Thérapeutique
Mlle Florence THIBAUT	HCN	Psychiatrie d'adultes
M. Luc THIBERVILLE	HCN	Pneumologie
M. Christian THUILLEZ	HB	Pharmacologie
M. Hervé TILLY	CB	Hématologie et transfusion
M. François TRON (<i>Surnombre</i>)	UFR	Immunologie
M. Jean-Jacques TUECH	HCN	Chirurgie digestive
M. Jean-Pierre VANNIER	HCN	Pédiatrie génétique

M. Benoît VEBER	HCN	Anesthésiologie Réanimation chirurgicale
M. Pierre VERA	CB	Biophysique et traitement de l'image
M. Eric VERSPYCK	HCN	Gynécologie obstétrique
M. Olivier VITTECOQ	HB	Rhumatologie
M. Jacques WEBER	HCN	Physiologie

MAITRES DE CONFERENCES

Mme Noëlle BARBIER-FREBOURG	HCN	Bactériologie – Virologie
M. Jeremy BELLIEN	HCN	Pharmacologie
Mme Carole BRASSE LAGNEL	HCN	Biochimie
Mme Mireille CASTANET	HCN	Pédiatrie
M. Gérard BUCHONNET	HCN	Hématologie
Mme Nathalie CHASTAN	HCN	Physiologie
Mme Sophie CLAEYSSENS	HCN	Biochimie et biologie moléculaire
M. Moïse COEFFIER	HCN	Nutrition
M. Vincent COMPERE	HCN	Anesthésiologie et réanimation chirurgicale
M. Manuel ETIENNE	HCN	Maladies infectieuses et tropicales
M. Guillaume GOURCEROL	HCN	Physiologie
Mme Catherine HAAS-HUBSCHER	HCN	Anesthésie - Réanimation chirurgicale
M. Serge JACQUOT	UFR	Immunologie
M. Joël LADNER	HCN	Epidémiologie, économie de la santé
M. Jean-Baptiste LATOUCHE	UFR	Biologie Cellulaire
Mme Lucie MARECHAL-GUYANT	HCN	Neurologie
M. Jean-François MENARD	HCN	Biophysique
Mme Muriel QUILLARD	HCN	Biochimie et Biologie moléculaire
M. Vincent RICHARD	UFR	Pharmacologie
M. Francis ROUSSEL	HCN	Histologie, embryologie, cytogénétique
Mme Pascale SAUGIER-VEBER	HCN	Génétique
Mme Anne-Claire TOBENAS-DUJARDIN	HCN	Anatomie
M. Eric VERIN	HCN	Physiologie

MAITRE DE CONFERENCES ASSOCIE A MI-TEMPS

M. Thierry LEQUERRE	HB	Rhumatologie
M. Fabien DOGUET	HCN	Chirurgie thoracique et cardio-vasculaire

PROFESSEUR AGREGÉ OU CERTIFIÉ

Mme Dominique **LANIEZ**

UFR Anglais

Mme Michèle **GUIGOT**

UFR Sciences humaines - Techniques d'expression

II - PHARMACIE

PROFESSEURS

M. Thierry BESSON	Chimie Thérapeutique
M. Jean-Jacques BONNET	Pharmacologie
M. Roland CAPRON (PU-PH)	Biophysique
M. Jean COSTENTIN (PU-PH)	Pharmacologie
Mme Isabelle DUBUS	Biochimie
M. Loïc FAVENNEC (PU-PH)	Parasitologie
M. Michel GUERBET	Toxicologie
M. Olivier LAFONT	Chimie organique
Mme Isabelle LEROUX	Physiologie
Mme Elisabeth SEGUIN	Pharmacognosie
M. Marc VASSE (PU-PH)	Hématologie
M Jean-Marie VAUGEOIS (Délégation CNRS)	Pharmacologie
M. Philippe VERITE	Chimie analytique

MAITRES DE CONFERENCES

Mlle Cécile BARBOT	Chimie Générale et Minérale
Mme Dominique BOUCHER	Pharmacologie
M. Frédéric BOUNOURE	Pharmacie Galénique
Mme Martine PESTEL-CARON	Microbiologie
M. Abdeslam CHAGRAOUI	Physiologie
M. Jean CHASTANG	Biomathématiques
Mme Marie Catherine CONCE-CHEMTOB	Législation pharmaceutique et économie de la santé
Mme Elizabeth CHOSSON	Botanique
Mlle Cécile CORBIERE	Biochimie
M. Eric DITTMAR	Biophysique
Mme Nathalie DOURMAP	Pharmacologie
Mlle Isabelle DUBUC	Pharmacologie
Mme Roseline DUCLOS	Pharmacie Galénique
M. Abdelhakim ELOMRI	Pharmacognosie
M. François ESTOUR	Chimie Organique

M. Gilles GARGALA (MCU-PH)	Parasitologie
Mme Najla GHARBI	Chimie analytique
Mlle Marie-Laure GROULT	Botanique
M. Hervé HUE	Biophysique et Mathématiques
Mme Hong LU	Biologie
Mme Sabine MENAGER	Chimie organique
Mme Christelle MONTEIL	Toxicologie
M. Paul MULDER	Sciences du médicament
M. Mohamed SKIBA	Pharmacie Galénique
Mme Malika SKIBA	Pharmacie Galénique
Mme Christine THARASSE	Chimie thérapeutique
M. Rémi VARIN (MCU-PH)	Pharmacie Hospitalière
M. Frédéric ZIEGLER	Biochimie

PROFESSEUR ASSOCIE

M. Jean-Pierre GOULLE	Toxicologie
------------------------------	-------------

MAITRE DE CONFERENCE ASSOCIE

Mme Sandrine PANCHOU	Pharmacie Officinale
-----------------------------	----------------------

PROFESSEUR AGREGE OU CERTIFIE

Mme Anne-Marie ANZELLOTTI	Anglais
----------------------------------	---------

ATTACHE TEMPORAIRE D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE

M. Bérénice COQUEREL	Chimie Analytique
M. Johann PELTIER	Microbiologie

CHEF DES SERVICES ADMINISTRATIFS : Mme Véronique DELAFONTAINE

HCN - Hôpital Charles Nicolle

HB - Hôpital de BOIS GUILLAUME

CB - Centre HENRI BECQUEREL

CHS - Centre Hospitalier Spécialisé du Rouvray

CRMPR - Centre Régional de Médecine Physique et de Réadaptation

LISTE DES RESPONSABLES DE DISCIPLINE

Melle Cécile BARBOT	Chimie Générale et Minérale
M. Thierry BESSON	Chimie thérapeutique
M. Roland CAPRON	Biophysique
M Jean CHASTANG	Mathématiques
Mme Marie-Catherine CONCE-CHEMTOB	Législation, Economie de la Santé
Mle Elisabeth CHOSSON	Botanique
M. Jean COSTENTIN	Pharmacodynamie
Mme Isabelle DUBUS	Biochimie
M. Loïc FAVENNEC	Parasitologie
M. Michel GUERBET	Toxicologie
M. Olivier LAFONT	Chimie organique
M. Jean-Louis PONS	Microbiologie
Mme Elisabeth SEGUIN	Pharmacognosie
M. Mohamed SKIBA	Pharmacie Galénique
M. Marc VASSE	Hématologie
M. Philippe VERITE	Chimie analytique

ENSEIGNANTS MONO-APPARTENANTS

MAITRES DE CONFERENCES

M. Sahil **ADRIOUCH**

Biochimie et biologie moléculaire
(Unité Inserm 905)

Mme Gaëlle **BOUGEARD-DENOYELLE**

Biochimie et biologie moléculaire
(Unité Inserm 614)

M. Antoine **OUVRARD-PASCAUD**

Physiologie (Unité Inserm 644)

PROFESSEURS DES UNIVERSITES

M. Mario **TOSI**

Biochimie et biologie moléculaire
(Unité Inserm 614)

M. Serguei **FETISSOV**

Physiologie (Groupe ADEN)

Mme Su **RUAN**

Par délibération en date du 3 mars 1967, la faculté a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui seront présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend leur donner aucune approbation ni improbation.

REMERCIEMENTS

Monsieur le Professeur Sabourin,

Pour m'avoir donné l'opportunité de découvrir cette spécialité dans un service auquel je me suis attachée, car vous avez su y développer des équipes dynamiques, agréables et disponibles,

Pour l'intérêt que vous portez à chacun d'entre nous - internes - au cours de notre formation,

Pour tout ce que j'ai pu apprendre à vos côtés durant ces 5 belles années,

Et enfin pour le plaisir de vous avoir comme président de ma thèse,

Je vous remercie sincèrement.

Dans le reste de ma carrière, je tâcherai de rester digne de votre service et d'en perpétuer au mieux les valeurs.

Monsieur le Professeur Thiberville,

Vous avez accepté de vous rendre disponible pour juger ma thèse,

**J'espère que celle-ci vous apportera quelques éléments utiles à vos propres
sujets de réflexion,**

Et je vous remercie vivement pour votre présence de valeur.

Madame la Professeur Brocheriou,

Vous avez accepté de venir assister à ma thèse dans notre CHU de Rouen,

Je suis très heureuse de vous y accueillir pour vous présenter mes travaux

En espérant de tout cœur que j'aurai prochainement l'opportunité de travailler

à vos côtés, je vous remercie sincèrement pour votre disponibilité et je suis

très honorée de votre présence.

Monsieur le Docteur Landréat,

Ce fut un plaisir de découvrir la pneumopathologie auprès de Liana et vous.

Les bases que vous m'avez inculquées dépassent le cadre de la pneumopathologie et je compte bien en faire usage dans les autres secteurs dans lesquels je serai amenée à exercer.

Je vous remercie vivement donc pour votre formation et votre présence au sein de mon jury de thèse.

Tout d'abord, merci au service d'anatomopathologie de Rouen !

Aux amis que je me suis faits : tout d'abord à Olivia, j'ai eu beaucoup de chance de te rencontrer, ces 5 années sont passées à une vitesse folle et ce, grâce à toi, Ben et bien évidemment Moving.

A Solène, en plus d'être une amie, travailler à tes côtés est un réel plaisir et nos trajets en train du vendredi terminent agréablement les semaines de travail.

A Fanny, ce fut une chance de partager ce semestre à Becquerel avec toi, merci pour ton écoute et ton oreille attentive.

A Emmanuel, merci de m'avoir fait découvrir la médecine légale et la cytologie au-delà de tes compétences professionnelles, j'espère devenir aussi zen et souriante que toi au jour le jour, j'ai déjà adopté le même référentiel temps que toi (5min=15min) au grand désarroi des techniciens.

A Moutaz, ce fut un réel plaisir de travailler à tes côtés et de bénéficier de ton enseignement, mais j'aime surtout partager ton bureau car je profite ainsi de ta bonne humeur et de ton sourire (je dois former qq pour te faire tes piqûres).

A Liana, j'ai eu la chance de travailler à tes côtés pendant 6 mois, et j'ai aimé ton professionnalisme, tes raisonnements judicieux et avisés et surtout ta patience. J'espère vraiment faire le DU de cytologie avec toi.

A mes co-internes grâce à qui ce service est dynamique, je n'aurai pas la chance de tous bien vous connaître : Nicolas, Emilie, Florent, Maxime, Hélène, Marie et ses gâteaux délicieux, Claire et Laetitia.

A tous mes chefs qui avec beaucoup de pédagogie et de générosité ont partagé leur savoir : Mr Picquenot (vous m'avez appris à être plus autonome), Mme Lemoine, Mme Gobet, Florence, Arnaud, Philippe, Christelle, Sophie, Mr Roussel et Mme Laquerrière.

A Laurence, je me réjouis de terminer mon internat sous ta formation et ta bonne humeur, je suis très heureuse d'être ta 1^{ère} interne, j'espère que ça te donnera envie d'en encadrer d'autres par la suite.

A tous les médecins attachés du service que j'ai eu le plaisir de côtoyer : Mme Pellerin, Mme Mace, Mr De Kergal et Mme Maillard.

A toute l'équipe d'anatomopathologie, travailler à vos côtés a toujours été un réel plaisir, vous cherchez et trouvez très souvent des solutions pour nous faciliter la vie !

Tout d'abord à Carole sans qui ce travail n'aurait pu se faire : merci pour ta motivation et ton professionnalisme!

Au « 3^{ème} », merci à Fabien, Annie, Michèle, Myriam, Chantal, Marie-Noel, Rose, Céline, Nadine, Marion, et Sylvain (j'espère qu'ils sont aussi gentils que vous ailleurs).

A Danny, tu as du mal à nous laisser le scalpel mais tu es un expert pour nous apprendre à faire proprement une autopsie.

Au « 4^{ème} », merci à Stéphanie, Alexandra, Michèle, Sylvie, Lydie, Annie, Odile et Marianne (c'est toujours très plaisant de monter à votre étage, je trouve ça toujours amusant lorsque vous me dites merci pour le travail que je vous dépose).

Au « 1^{er} » étage, merci à Aude, France, Jessie, Elodie, Elodie et Marianne, vous avez su me donner envie de m'intéresser à la biologie moléculaire et à la recherche même-ci ce n'était pas ce qui m'attirait spontanément.

Merci à Damien pour ta gentillesse même si je n'ai pas eu l'occasion de travailler avec toi.

Et bien évidemment merci à nos secrétaires toujours calmes, souriantes et patientes malgré le flux continu d'appels téléphoniques et le nombre de compte-rendus plus ou moins bien articulés : Valérie, Christine, Florence, Julie, Adélaïde, Bénédicte, Sandrine et Céline.

Bref, merci à tous, le départ fin octobre ne va pas être facile.

SOMMAIRE

INTRODUCTION	21
1. Tumeurs broncho-pulmonaires.....	21
1.1. Epidémiologie.....	21
1.2. Facteurs de risques.....	23
1.3. Classification histologique	26
2. L'adénocarcinome.....	31
2.1. Epidémiologie.....	31
2.2. Prise en charge macroscopique d'un prélèvement pulmonaire	31
2.3. Présentation macroscopique des adénocarcinomes	33
2.4. Classification histologique des adénocarcinomes pulmonaires selon l'OMS 2004	34
2.5. Classification des adénocarcinomes pulmonaires proposée par l'IASLC/ATS/ERS	39
2.6. Facteurs pronostiques histologiques	41
2.7. Immunohistochimie.....	41
2.8. Classification TNM	41
2.9. Prise en charge thérapeutique	45
3. Cancérogénèse.....	47
3.1. Introduction.....	47
3.2. Instabilité génomique.....	48
3.3. Hypothèse sur les modèles séquentiels histologiques et moléculaires à l'origine des adénocarcinomes	57
4. Identification d'une nouvelle anomalie génétique intéressant les cancers pulmonaires non à petites cellules	58
4.1. Oncogenèse de ALK.....	58
4.2. Implication du gène <i>ALK</i> dans le cancer du poumon	60
4.3. Facteur pronostic de l'altération du gène <i>ALK</i> dans les CPNPC	62
4.4. <i>ALK</i> un nouveau candidat pour la thérapie ciblée.....	63
4.5. Caractéristiques épidémiologiques, histologiques, immuno-histochimiques et moléculaires	66
4.6. Détection du réarrangement du gène <i>ALK</i>	68
4.7. Existe-t-il une corrélation entre le pourcentage de cellules tumorales <i>ALK</i> + détectées en FISH et la réponse thérapeutique ?.....	74
OBJECTIFS DE L'ETUDE.....	76

MATERIEL ET METHODES	77
1. Données anatomopathologiques et cliniques	77
2. Diagnostic histologique	78
3. Analyse par technique de FISH sur blocs de paraffine	78
3.1. Etapes techniques	78
3.2. Sonde Vysis Break Apart (Abbott®)	79
3.3. Sonde de fusion Poseidon (Kreatech®)	80
4. Analyse par immunohistochimie	81
RESULTATS	82
1. Résultats par FISH (sonde Abbott®)	82
2. Résultats par sonde FISH Kreatech®	83
3. Résultats de l'immunohistochimie (IHC)	83
3.1. Anticorps ALK clone 5A4 (Abcam®)	83
3.2. Anticorps ALK clone ALK1 (DAKO®)	84
3.3. Anticorps anti-p63	85
3.4. Sous-types histologiques des cas présentant un remaniement du gène ALK avec la FISH85	
DISCUSSION	92
1. Evaluation de la FISH Abbott®	92
1.1. Taux de FISH non contributives	92
1.2. Lecture de la FISH	92
1.3. Résultats des cas de FISH interprétables	93
1.4. Comparaison entre la sonde de split d'Abbott® et la sonde de fusion de Kreatech®	93
2. Immunohistochimie	94
2.1. ALK clone 5A4 (Abcam®)	94
2.2. ALK clone 1 (Dako®)	95
3. Discordance entre la FISH et l'IHC	95
3.1. Comment expliquer ces deux cas discordants ?	96
4. La p63 est-elle une aide au diagnostic de remaniement ALK ?	98
5. Quel test pour détecter les CPNPC/ALK+, FISH ou IHC ?	99
5.1. Avantage de la FISH sur l'IHC	99
5.2. Avantages de l'IHC sur la FISH	100
CONCLUSION	102

INTRODUCTION

1. Tumeurs broncho-pulmonaires

1.1. Epidémiologie

Le cancer bronchique pulmonaire (CBP) primitif est, de longue date, la première cause de mortalité par cancer aussi bien dans les pays développés que dans les pays en voie de développement. Son incidence mondiale était estimée en 2008 à 1,61 millions de cas et le nombre de décès à 1,38 millions soit 18,2% des décès par cancer (1).

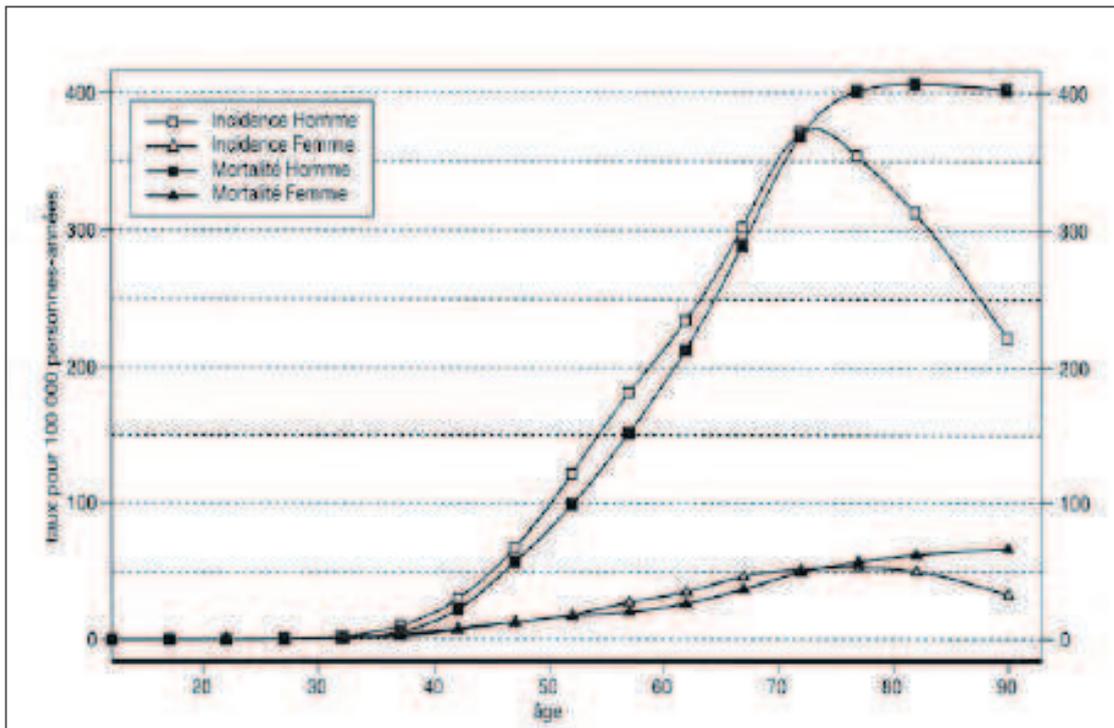
En Europe et notamment en France, l'incidence du CBP primitif est au troisième rang derrière le cancer colorectal et le cancer du sein et juste avant le cancer de la prostate. Mais il est la première cause de mortalité par cancer soit 20% de l'ensemble des décès par cancer (2).

Si le taux de mortalité par CBP se stabilise en Europe et aux Etats-Unis pour les hommes, il augmente de façon très importante chez la femme. En France, il est passé au deuxième rang chez la femme en 2005 après avoir été au sixième rang en 1975 (3).

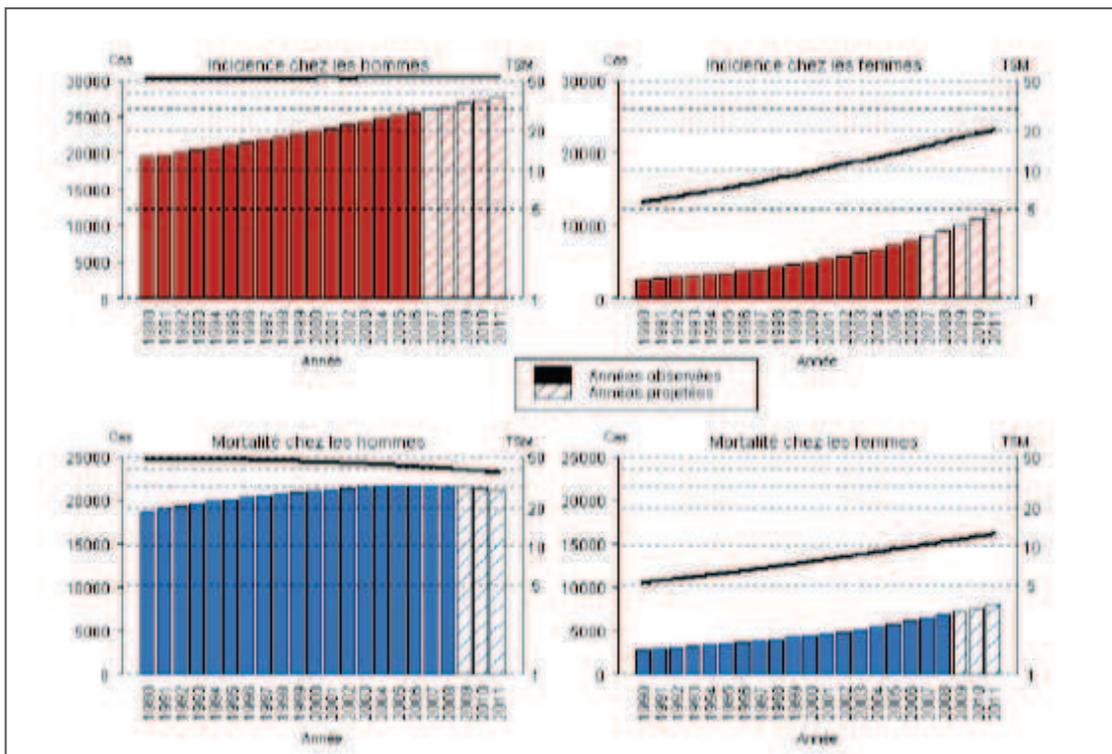
L'âge médian au diagnostic diffère selon les pays et leur politique de santé. Il se situe à 70 ans aux Etats-Unis et aux environs de 65 ans en France (4, 5).

La répartition par type histologique a considérablement changé durant ces dernières décennies. Le carcinome épidermoïde était initialement le plus fréquent chez les fumeurs suivi du cancer bronchique à petites cellules. Petit à petit, l'adénocarcinome a supplanté le carcinome épidermoïde, d'abord dans les cohortes de patients les plus jeunes puis dans toutes les tranches d'âge. L'adénocarcinome est actuellement le type histologique le plus fréquent. Cette évolution est liée à de nombreux facteurs mais la raison principale est la modification des habitudes tabagiques: les Nord-

américains bien avant les Français ont utilisé des cigarettes avec du tabac blond dont le PH est plus acide et utilisé des filtres au contenu en goudrons diminué. La conséquence est une inhalation plus profonde, amenant les carcinogènes de la fumée de tabac très en périphérie - lieu de développement des adénocarcinomes – et ne les confinant pas aux grosses bronches, lieu de développement des carcinomes épidermoïdes (6).



Incidence et mortalité du cancer du poumon en fonction de l'âge (Frusch 2007).



Evolution du nombre de cas de cancer du poumon et de décès (barre) et des taux standardisés monde correspondant (échelle logarithmique) chez l'homme et chez la femme de 1990 à 2011 en France.

1.2. Facteurs de risques

Le CBP est au premier rang des cancers qui peuvent être prévenus. Les facteurs de risques sont bien identifiés : tabagisme actif et passif, exposition professionnelle et environnementale.

1.2.1. Tabagisme actif

Le lien entre CBP et tabac a été démontré pour la première fois dans une grande étude épidémiologique des années 1950. Le tabac confère un tel risque de CBP que la mortalité engendrée par celui-ci constitue l'indicateur le plus spécifique des effets du tabac sur la santé. La durée pendant laquelle on fume, semble plus importante que la quantité de cigarettes fumées. Les jeunes fumant de plus en plus tôt, l'âge de survenue de la maladie diminue et se manifeste dès 40 ans.

Au cours des dix dernières années, le nombre moyen de cigarettes fumées, entre 15 et 44 ans, a diminué chez les hommes et augmenté régulièrement chez les femmes. Les conséquences sont que, dans la tranche d'âge 35 à 44 ans le risque de CBP a diminué de moitié chez les hommes alors que le risque a été multiplié par quatre chez la femme. L'utilisation des cigarettes légères n'a pas entraîné de décroissance du risque de CBP, un rapport de 2004 de l'US Surgeon General concluait que, bien que le contenu des cigarettes ait changé avec un allègement en goudrons et nicotine, le risque de cancer bronchique n'a pas été modifié chez les fumeurs (7).

1.2.2. Tabagisme passif

L'argument essentiel sur le rôle du tabagisme passif dans la survenue du cancer bronchique réside dans le fait que des taux élevés de nicotine et de goudrons cancérigènes sont retrouvés dans les urines des sujets exposés au tabagisme environnemental (8).

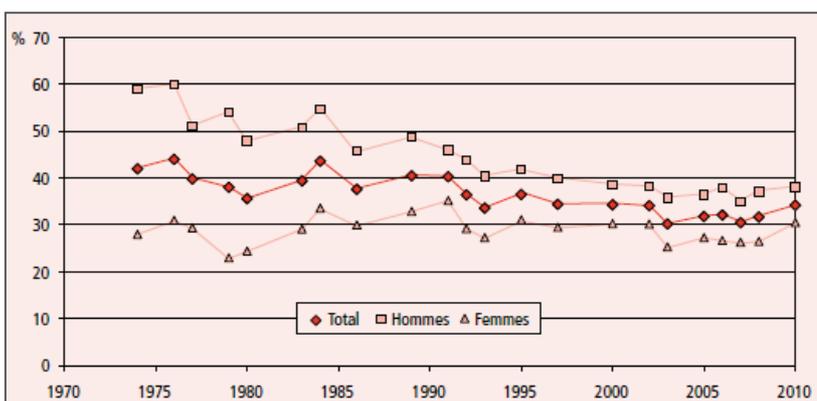
En 1984 le tabagisme environnemental a été classé comme carcinogène par la US Protection Agency. En 1997, *Hackshaw* publiait une méta-analyse regroupant 37 études épidémiologiques avec 4626 non-fumeurs vivant au contact de fumeurs. Les auteurs concluaient à un excès de risque de 26%(9).

1.2.3. Cancers bronchiques d'origine professionnelle

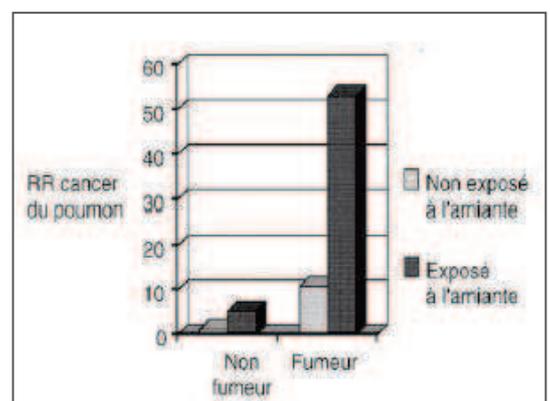
En France, en 2000, 4335 cancers chez les hommes (soit 2,5% de l'ensemble des cancers) et 403 cancers chez les femmes (soit 0.3% de l'ensemble des cancers) étaient attribués à une origine professionnelle. Le CBP représentait 75% de l'ensemble des décès (10).

L'amiante est un cancérigène bronchopulmonaire bien connu. On estime que de par le monde, 20 à 40% des travailleurs ont été exposés dans leur environnement professionnel à des fibres d'amiante et que 100 000 personnes meurent chaque année de cancers liés à l'amiante. La survenue des CBP est caractérisée par une longue période de latence de l'ordre de 20 ans. Le risque de CBP est corrélé à l'intensité de l'exposition. L'exposition à l'amiante et le tabac sont deux carcinogènes synergiques. En effet la fumée de tabac pourrait augmenter la rétention pulmonaire des fibres d'amiante (11).

La silice, le radon ou la peinture sont également des carcinogènes avérés. Le nickel, le chrome et le cadmium sont des facteurs cancérigènes pulmonaires pour les non-fumeurs ou les ex-fumeurs. D'autres matériaux sont fortement incriminés et font l'objet de nombreuses publications. On peut notamment citer les fibres céramiques, l'asphalte, les hydrocarbures polycycliques et le beryllium (12).



Evolution du tabagisme actuel (occasionnel ou quotidien) des 18-75 ans en France depuis les années 1970.



Effet multiplicateur du tabagisme et de l'exposition à l'amiante sur le risque relatif de cancer du poumon (Frush 2007).

1.2.4. Cancer du poumon et cannabis

La fumée de cannabis est qualitativement identique à celle du tabac même si elle contient deux fois plus d'hydrocarbures polycycliques. Par ailleurs, les "joints" sont moins tassés que les cigarettes manufacturées, ils sont fumés sans filtre et avec un mégot résiduel plus petit. Les fumeurs de cannabis inhalent plus profondément et retiennent davantage leur respiration. Mais les effets biologiques diffèrent grandement. Le tétrahydrocannabinol (THC), contrairement à la nicotine, inhibe l'enzyme clé (à savoir le CYP1A1) du métabolisme des goudrons qui aboutit à des substances carcinogènes. " noter également qu'il n'y a pas de récepteurs au THC dans l'arbre respiratoire alors qu'il y en a pour la nicotine, lesquels vont induire un signal apoptotique. De plus, le cannabis inhibe l'angiogénèse alors que la nicotine active l'angiogénèse tumorale.

Le rôle du cannabis dans la survenue des cancers bronchiques est l'objet de controverses. Un premier biais est dû au fait que dans la plupart des pays, le cannabis est fumé mélangé au tabac et dans ces conditions il est difficile d'identifier ce qui revient au cannabis. La Nouvelle-Zélande est un pays original car les fumeurs de cannabis ne mélangent pas ce dernier au tabac. Une étude cas-témoins a montré une augmentation du risque de cancers bronchiques chez les personnes ayant fumé une grande quantité de cannabis (>10,5 joints x années). Le risque augmenterait de 8% pour chaque "joint" x année (13, 14)

1.3. Classification histologique

Le typage histologique est à ce jour un moyen simple et reproductible pour classer les lésions cancéreuses. Cette classification est associée à des données de biologie moléculaire afin de mieux caractériser les tumeurs. La classification est une étape clé puisqu'elle permet de choisir la stratégie thérapeutique la plus adaptée mais aussi d'élaborer des bases épidémiologiques et biologiques indispensables à la recherche.

OMS 2004	
Carcinome épidermoïde Papillaire A cellules claires A petites cellules Basaloïde	Carcinome à petites cellules Carcinome à petites cellules combiné
Adénocarcinome Adénocarcinome sous-type mixte Adénocarcinome acineux Adénocarcinome papillaire Carcinome bronchioalvéolaire Non-mucineux Mucineux Mixte mucineux et non-mucineux ou indéterminé Adénocarcinome solide avec formation de mucine Adénocarcinome fœtal Adénocarcinome mucineux (colloïde) Cystadénocarcinome mucineux Adénocarcinome à cellules en bague à chaton Adénocarcinome à cellules claires	Tumeur carcinoïde Carcinoïde typique Carcinoïde atypique
	Carcinome à grandes cellules Carcinome neuroendocrine à grandes cellules Carcinome neuroendocrine à grandes cellules combiné Carcinome basaloïde Carcinome de type lymphoépithélial Carcinome à cellules claires Carcinome à grandes cellules avec phénotype rhabdoïde
	Carcinome adénoquameux
	Carcinome sarcomatoïde Carcinome pléomorphe Carcinome à cellules fusiformes Carcinome à cellules géantes Carcinosarcome Blastome pulmonaire
	Carcinome de type carcinome des glandes salivaires Carcinome mucoépidermoïde Carcinome adénoïde kystique Carcinome épithélial-myoépithélial

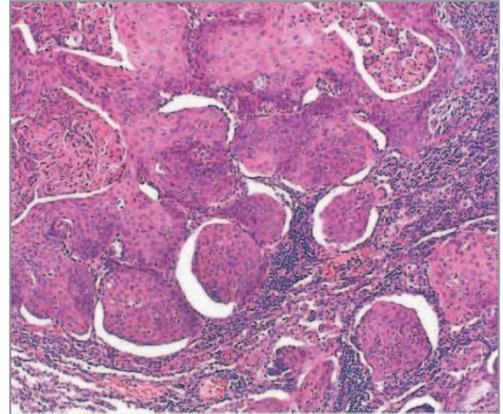
Les grands types histologiques sont :

- les carcinomes épidermoïdes
- les adénocarcinomes
- les carcinomes à petites cellules
- les tumeurs carcinoïdes typiques et atypiques
- les carcinomes à grandes cellules
- les carcinomes adénoquameux
- les carcinomes sarcomatoïdes
- les carcinomes de type des carcinomes des glandes salivaires

1.3.1. Les carcinomes épidermoïdes

Les carcinomes épidermoïdes représentent environ 30% des CBP en Europe et aux Etats-Unis et leur fréquence décroît régulièrement au profit des adénocarcinomes.

Il s'agit de tumeurs malignes dont les cellules sont séparées par des ponts d'union intercellulaires et qui synthétisent de la kératine. Il existe plusieurs variants : le carcinome épidermoïde papillaire, à cellules claires, à petites cellules (cellules de petite taille, comportant un noyau à la chromatine granuleuse au sein d'un cytoplasme ample) et basaloïde (cellules de petite taille, formant des lobules délimités par une assise palissadique et s'accompagnant de plages de différenciation épidermoïde).



1.3.2. Les adénocarcinomes

Les adénocarcinomes sont en augmentation constante, ils représentent en Europe et aux Etats-Unis, 50% des cancers pulmonaires.

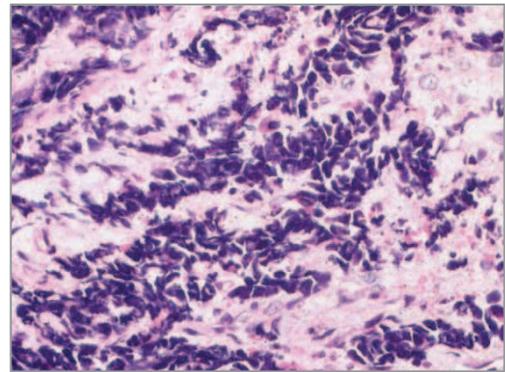
Il s'agit de tumeurs malignes d'architecture glandulaire et / ou sécrétant de la mucine. Ils peuvent prendre une architecture acinaire, papillaire, solide, à sécrétion intracellulaire de mucus ou bronchioalvéolaire. Ils sont d'architecture mixte dans la majorité des cas (85%).

Contrairement aux carcinomes bronchioalvéolaires de localisation alvéolaire, les adénocarcinomes papillaires, acinaires, solides ou mixtes se développent à partir de l'épithélium bronchique pour infiltrer par la suite les alvéoles. Ils se présentent donc soit sous la forme d'une lésion endobronchique soit sous la forme d'une masse périphérique parenchymateuse. La forme bronchioalvéolaire correspond à un adénocarcinome ayant une croissance "lépidoïde" (en nappe) le long des parois alvéolaires sans envahissement de l'interstitium alvéolaire, ni envahissement vasculaire ou pleural (il s'agit de l'équivalent du carcinome *in situ*).

Il existe plusieurs variants : l'adénocarcinome bien différencié de type foetal, l'adénocarcinome colloïde muqueux, le cystadénocarcinome mucineux, l'adénocarcinome à cellules en bague à chaton, l'adénocarcinome à cellules claires.

1.3.3. Les carcinomes à petites cellules

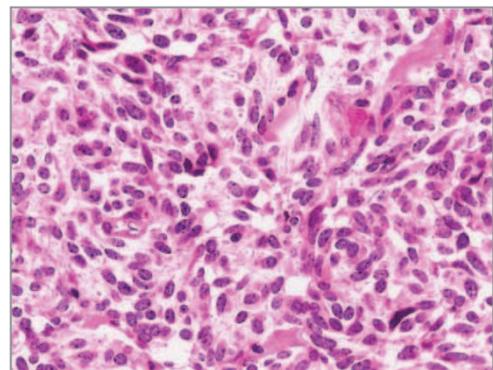
Il s'agit de tumeurs malignes faites de cellules de petite taille avec un rapport nucléocytoplasmique élevé et dont la chromatine est finement granulaire, avec un nucléole difficilement identifiable. Les cellules sont rondes ou fusiformes, l'activité mitotique est très élevée (plus de 11mitoses/2mm²) et la nécrose souvent extensive. Il existe également plusieurs variants appelés carcinomes à petites cellules composites (10% d'un contingent composite suffit) et donc associés à des contingents glandulaires, squameux ou à grandes cellules. Même si l'aspect morphologique est typique, l'immunohistochimie est une aide supplémentaire avec notamment une expression d'au moins un marqueur neuroendocrine (chromogranine A, synaptophysine ou CD56) et du facteur de transcription TTF1 dans environ 80% des cas.



1.3.4. Les tumeurs carcinoïdes typiques et atypiques

Il s'agit de tumeurs neuroendocrines présentant une architecture insulaire, trabéculaire ou palissadique avec la présence de rosettes.

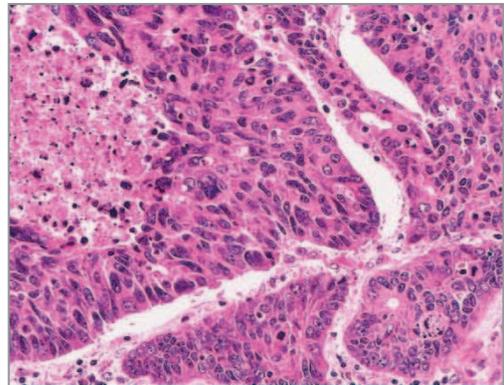
- ✓ Les tumeurs carcinoïdes typiques présentent moins de 2mitoses/2mm², sans nécrose
- ✓ Les tumeurs carcinoïdes atypiques ont de 2 à 10 mitoses/2mm² et peuvent s'accompagner de foyers de nécrose souvent focale



1.3.5. Les carcinomes à grandes cellules

Il s'agit de tumeurs malignes ne présentant pas les critères de différenciation des carcinomes épidermoïdes, des adénocarcinomes ou des carcinomes à petites cellules. Il suffit d'un contingent différencié d'au moins 10% pour écarter le diagnostic de carcinome à grandes cellules. En raison de ces imprécisions leur incidence varie de 2 à 20%. Il existe plusieurs variants :

- ✓ Le carcinome neuroendocrine à grandes cellules : d'architecture neuroendocrine (palissade, travées, rosettes), son index mitotique est élevé (≥ 11 mitoses / 2mm^2) avec de larges zones de nécrose et renfermant fréquemment un noyau proéminent. On retrouve au moins un marqueur neuroendocrine positif dans au moins 50% des cellules tumorales. Le TTF1 est positif dans environ 40% des tumeurs.



- ✓ Le carcinome basaloïde à grandes cellules : il s'agit de lésions de mauvais pronostic très souvent proximales faites de cellules d'allure basale et formant des palissades en périphérie des lobules tumoraux. La kératinisation est absente ou réduite à une kératinisation abrupte contrairement à la variante basaloïde des carcinomes épidermoïdes. La nécrose comédonienne est très fréquente et dans 30% des cas, on observe des rosettes. Les marqueurs neuroendocrines sont classiquement négatifs et la 34 β e12 est toujours positive. Enfin, les carcinomes basaloïdes n'expriment pas le TTF1.
- ✓ Le carcinome lymphoepithélioma-like : plutôt présent en Asie, il se caractérise par l'association d'une prolifération en nappes de cellules de grande taille, à noyau nucléolé, et une infiltration lymphocytaire dense. Les cellules tumorales expriment le génome de l'Epstein-Barr Virus.
- ✓ Le carcinome à cellules claires ressemble à un carcinome à cellules claires du rein.

1.3.6. Les carcinomes adénosquameux

Ils représentent de 0,6 à 2,3% de tous les CBP. Il s'agit de tumeurs malignes associant un contingent glandulaire et un contingent épidermoïde, chacun devant représenter au moins 10% du volume tumoral.

1.3.7. Les carcinomes sarcomatoïdes

Ce sont des tumeurs rares représentant moins de 1,5% des cancers pulmonaires et qui sont liées au tabagisme dans 90% des cas.

Il s'agit de lésions malignes non à petites cellules avec une composante épithéliale (c'est-à-dire associant des contingents épidermoïdes, glandulaires ou à grandes cellules avec des contingents à cellules géantes et / ou fusiformes) et /ou une composante sarcomatoïde. Cinq sous-types sont individualisés : le carcinome pléomorphe, le carcinome à cellules géantes, le carcinome à cellules fusiformes, le carcinosarcome et le blastome pulmonaire.

2. L'adénocarcinome

2.1. Epidémiologie

L'adénocarcinome est le type histologique le plus fréquent, 40 à 50% des carcinomes pulmonaires non à petites cellules (CPNPC). Il touche aussi bien les fumeurs que les non-fumeurs mais est plus représenté chez la femme (40% des CPNPC vs 30% chez les hommes).

2.2. Prise en charge macroscopique d'un prélèvement pulmonaire

2.2.1. Avant fixation

Quelles que soient les modalités de l'intervention (wedge puis exérèse complémentaire ou lobectomie/pneumectomie d'emblée), les recommandations restent les mêmes.

Les informations importantes doivent être fournies à l'anatomopathologiste : les principaux antécédents notamment cancérologiques, les traitements entrepris avant la chirurgie (chimiothérapie néo-adjuvante, radiothérapie, traitement par laser pour les tumeurs endobronchiques), la situation de la tumeur, les données endoscopiques, le type histologique s'il est connu, le tabagisme et d'éventuelles expositions professionnelles (amiante, silice, cobalt...).

- **Wedge**

Il s'agit d'une exérèse chirurgicale non systématisée, généralement effectuée pour la résection de métastases ou quand la nature exacte de la lésion n'a pas pu être établie en préopératoire, dans ce cas, elle est toujours accompagnée d'un examen extemporané. Ces résections comportent une face externe tapissée par la plèvre et une face interne parenchymateuse fermée par une ou plusieurs rangées d'agrafes qu'il faut retirer au ciseau au plus près. Le parenchyme dégagé est considéré comme la limite de résection. La pièce est mesurée et palpée sans compression afin de

percevoir grossièrement la consistance et la forme du foyer d'induration. La petite taille de la lésion ne représente pas une contre-indication à l'examen extemporané.



Wedge à l'état frais renfermant une lésion tumorale



Coupe de wedge fixée renfermant une lésion tumorale

- **Lobectomie, bi-lobectomie ou pneumectomie**

L'examen de la coupe chirurgicale est systématique si la tumeur est proximale, il est éventuellement complété par un examen extemporané des sections vasculaires en cas de lésion macroscopiquement suspecte. La présence de cellules tumorales associées à du mucus dans la lumière ne doit pas être assimilée à une extension pariétale et n'est donc pas signalée au chirurgien.

Il faut consigner la présence d'un épaissement, de rétraction, d'accolement scissural sur la face externe, la présence d'un lambeau péricardique ou un segment d'oreillette gauche sur le versant hilare.

La palpation du parenchyme pulmonaire est un geste capital, très informatif qui permet de localiser la tumeur et d'en évaluer la taille. Elle permet également de repérer d'autres anomalies à distance et s'avère plus rentable que les sections centimétriques.

La fixation de la pièce se fait par injection endobronchique.

2.2.2. Examen macroscopique des pièces fixées

Après 18 à 24 heures de fixation formolée (formol tamponné), la pièce est disséquée le plus souvent en suivant l'axe bronchique. L'examen doit permettre de fournir les éléments suivants :

- Site (proximal ou distal) et localisation segmentaire la plus précise possible
- Taille selon au moins 2 axes, parfois difficile à évaluer parfois du fait des pneumopathies de voisinage
- Forme, teintes et consistance
- Distance macroscopique à la section chirurgicale (sans omettre la coupe bronchique prélevée pour l'examen extemporané) ; cette distance qui est mesurée à partir de la base d'implantation n'est pas toujours facile à évaluer
- Rapport avec une bronche
- Distance macroscopique à la plèvre viscérale
- Présence de foyers tumoraux satellites
- Présence de lésions non tumorales à distance de la tumeur
- Examen et mesure des ganglions prélevés sur la pièce ou transmis à part par le chirurgien

2.3. Présentation macroscopique des adénocarcinomes

Les adénocarcinomes pulmonaires peuvent être uniques ou multiples, de petite ou de grande taille. Cinq modes de présentation sont décrits :

- La plus fréquente est la localisation distale. La lésion blanchâtre est centrée par une fibrose desmoplasique et s'accompagne d'une rétraction de la plèvre en regard (n°1 sur la figure 1).
- Le deuxième mode de présentation est la localisation endobronchique ou centrale (n°2 sur la figure 1).
- Le troisième mode est la présentation mimant une pneumopathie comme on l'observe fréquemment dans les carcinomes bronchioloalvéolaires ou papillaires (n°3 sur la figure 1).
- La quatrième forme est une réaction pleurale diffuse et épaisse dite « carcinome pseudoépithéliomateuse » (n°4 sur la figure 1).

- La dernière forme est très rare et survient dans des zones de fibrose interstitielle (n°5 sur la figure 1).

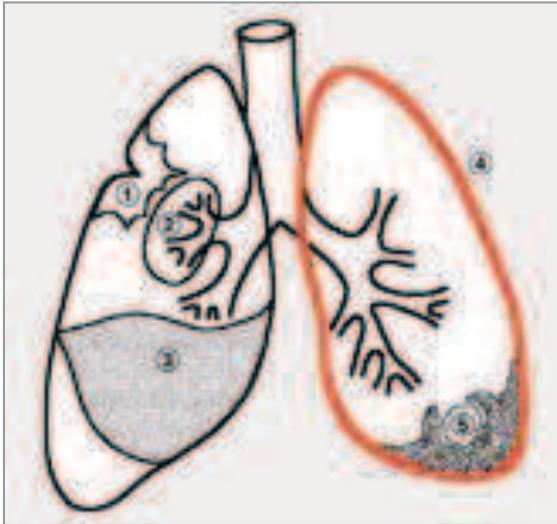


Figure 1 : Modes de présentation des adénocarcinomes (OMS 2004)



Localisation endobronchique d'un adénocarcinome



Adénocarcinome avec rétraction pleurale

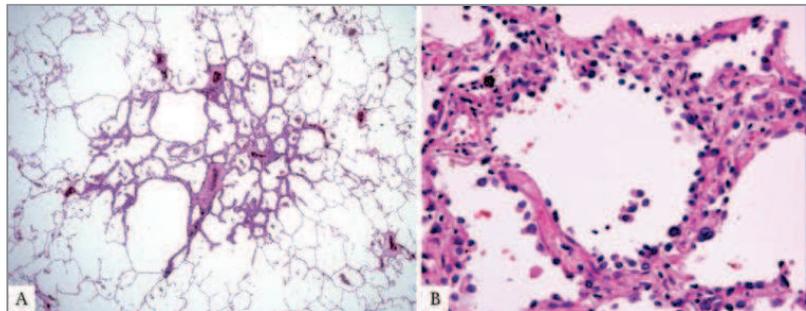
2.4. Classification histologique des adénocarcinomes pulmonaires selon l'OMS 2004

Les classifications de cancers du poumon publiées en 1967, 1981 et 1999 ont été écrites par des pathologistes pour des pathologistes. Ce n'est qu'en 2004 que la classification a introduit des données cliniques et génétiques. Malgré les précisions et la clarification apportée en 2004, la classification selon l'OMS n'est toujours pas satisfaisante et ce, notamment pour les adénocarcinomes.

L'adénocarcinome est le sous type histologique le plus fréquent dans les cancers du poumon, ils représentent près de 50% de tous les cancers de cet organe. Il existe de grandes différences au sein de cette entité histologique aussi bien sur le plan clinique, histologique, moléculaire et même histologique. Récemment, l'IASLC (International Association for the Study of Lung Cancer), l'ATS (American Thoracic Society) et l'ERS (European Respiratory Society) ont conjointement proposé une nouvelle classification des adénocarcinomes pulmonaires a été élaborée. Cette nouvelle classification doit être intégrée dans la prochaine version de l'OMS (15).

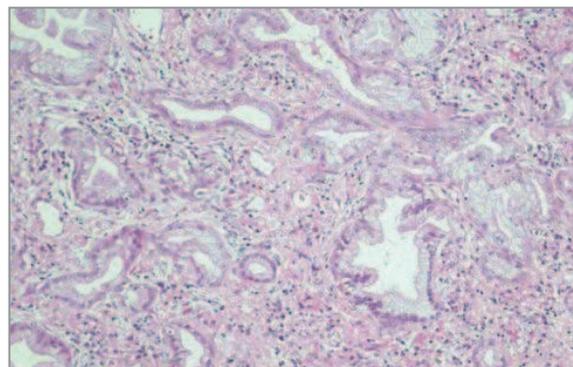
2.4.1. Classification des lésions pré-néoplasiques glandulaires et des adénocarcinomes pulmonaires selon l'OMS 2004

- **Hyperplasie adénomateuse atypique (AAH)** : il s'agit d'une lésion millimétrique (< 5mm) considérée comme la lésion précurseur du carcinome bronchiolo-alvéolaire. Cette lésion est le plus souvent de découverte fortuite sur un scanner ou lors d'une analyse histologique d'un prélèvement. Son incidence varie de 5,7% dans les séries autopsiques pour atteindre 21,4% chez des patients porteurs d'adénocarcinomes. Elle correspond histologiquement à une prolifération faite de cellules alvéolaires modérément atypiques et reposant le long des parois alvéolaires et des bronchioles respiratoires.

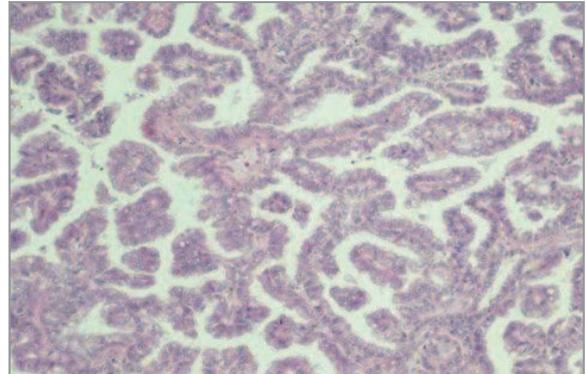


Travis 2011 JTO

- **Adénocarcinome acineux** : il s'agit d'une tumeur dont les cellules cubiques ou cylindriques forment des tubes ou des glandes.



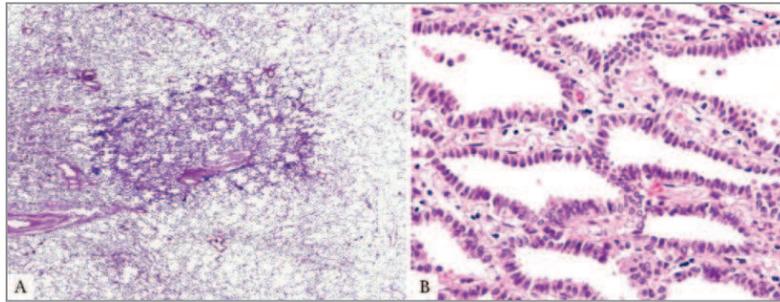
- **Adénocarcinome papillaire** : les tumeurs sont constituées de papilles néoformées à partir des parois alvéolaires et revêtues de cellules tumorales cubiques ou cylindriques sécrétant de la mucine ou non. Le contingent papillaire présente un caractère agressif. En 2010, une équipe japonaise a identifié une composante papillaire dans 60% des cas de cancers pulmonaires primitifs qu'elle a étudiés (228 cas sur 445), cependant cette composante n'est majoritaire (contingent papillaire > 75%) que dans de très rares cas (3,8% des adénocarcinomes) (16, 17).



- **Carcinome bronchioloalvéolaire (BAC)** : il est constitué de cellules bronchiolo-alvéolaires atypiques qui colonisent les parois alvéolaires et bronchiolo-alvéolaires de proche en proche sans modifier l'architecture pulmonaire sous-jacente. Il s'agit donc d'une tumeur *in situ* qui n'envahit ni le stroma, ni la plèvre, ni les vaisseaux. Ce diagnostic, qui requiert l'analyse de toute la lésion, ne peut donc être formulé sur une biopsie et encore moins sur un prélèvement cytologique. Le carcinome bronchiolo-alvéolaire, dans sa forme pure, représente 3% à 6% des carcinomes pulmonaires et mesure généralement moins de 2 cm. Il survient préférentiellement chez les femmes, les non-fumeurs et les asiatiques. Son traitement chirurgical conservateur est curatif.

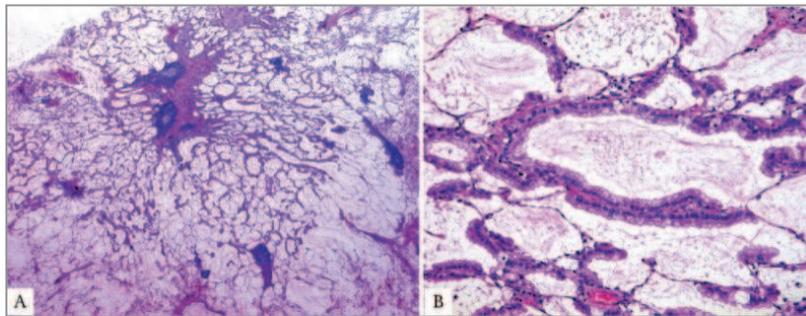
Depuis 2004, les tumeurs d'architectures bronchiolo-alvéolaires et présentant un foyer d'invasion au centre de type acinaire ou papillaire doivent être appelées adénocarcinomes mixtes. Il en existe trois types :

- ✓ les non-mucineux : ils sont souvent uniques dérivant de cellules de Clara (cellules cylindriques au cytoplasme éosinophile et au noyau apical) et de pneumocytes II (cellules cubiques au cytoplasme clair)



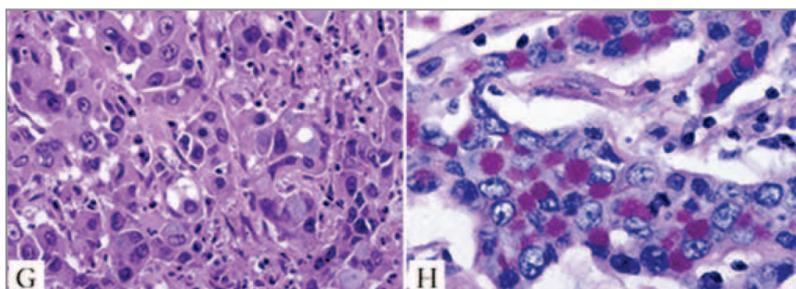
BAC non mucineux (Travis 2011 JTO)

- ✓ les mucineux : ils peuvent être multicentriques, ils sont de bas grade et peu atypiques



BAC mucineux Travis 2011 JTO

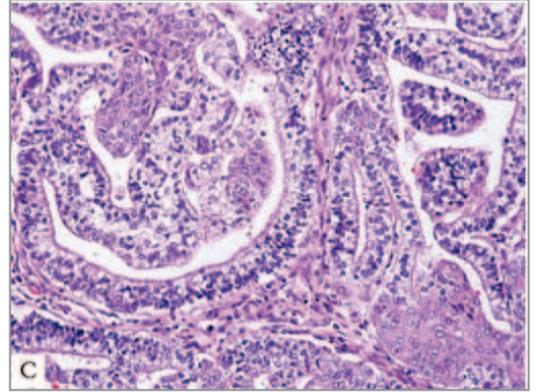
- ✓ les mixtes mucineux et non-mucineux : ils représentent environ 10% des BAC
- **Adénocarcinome solide avec formation de mucine** : il est fait de cellules de grande taille dont la nature glandulaire n'est affirmée que lorsque l'on peut démontrer la présence de vacuoles de mucines dans leur cytoplasme.



Adénocarcinome solide, avec coloration HES (G) et PAS (H) Travis 2011 JTO

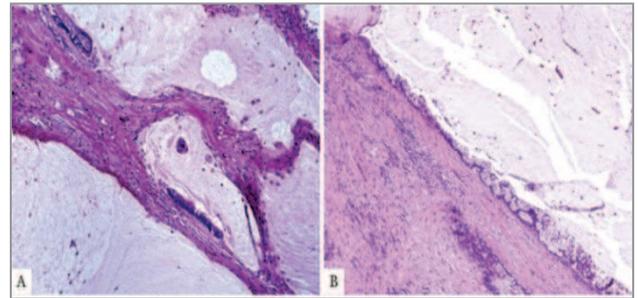
- **Adénocarcinome mixte** : il représente la grande majorité des adénocarcinomes pulmonaires (85%), il associe deux contingents ou plus.

- **Adénocarcinome fœtal** : il est constitué de structures glandulaires faites de cellules non ciliées riches en glycogène ressemblant aux tubules pulmonaires fœtaux. Il peut prendre un aspect endométrioïde. La forme bien différenciée est la plus fréquente, elle est de bon pronostic et s'observe chez les jeunes femmes non fumeuses.



Travis JTO 2011

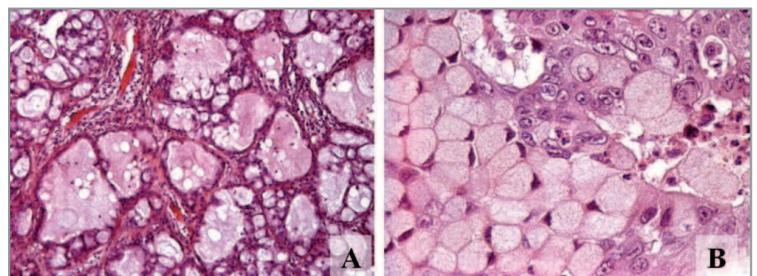
- **Adénocarcinome mucineux (colloïde)** : il s'agit de lésions semblables à leurs homologues du tractus gastro-intestinal, on observe des flaques de mucus sécrété par des cellules atypiques bien différenciées.



Travis 2011 JTO

- **Cystadénocarcinome mucineux** : Il s'agit d'une lésion bien limitée parfois encapsulée, kystisée au centre et sécrétant de la mucine.

- **Adénocarcinome à cellules en bague à chaton** : il est fréquemment associé à d'autres contingents tumoraux pulmonaires. Avant de poser le diagnostic, il est indispensable d'éliminer la possibilité d'une métastase d'un adénocarcinome gastrique.



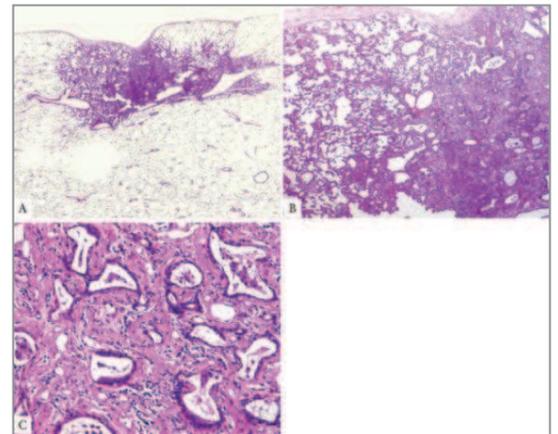
Travis 2011 JTO

- **Adénocarcinome à cellules claires** : fréquemment associé à d'autres contingents tumoraux, il peut être dans de rares cas majoritaire. Il faut avant éliminer la présence d'une tumeur primitive rénale.

2.5. Classification des adénocarcinomes pulmonaires proposée par l'Iⁿ SLC/TS/ERS

Les changements majeurs de cette nouvelle classification par rapport à celle de l'OMS 2004 sont (18) :

- La disparition du terme bronchiolo-alvéolaire : l'ancienne terminologie de carcinome bronchiolo-alvéolaire est remplacée par celle d'adénocarcinome *in situ*, le plus souvent non mucineux et dont l'architecture est lépidique pure, c'est-à-dire sans zone d'invasion ni envahissement vasculaire ou pleural (respect absolu de l'architecture alvéolaire).

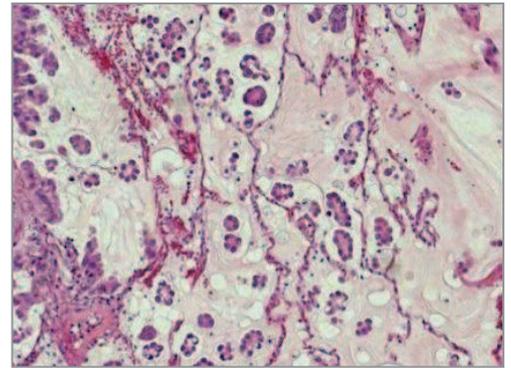


Adénocarcinome à invasion minime Travis 2011 JTO

- L'apparition d'une catégorie supplémentaire avec l'adénocarcinome à invasion minime : il s'agit d'adénocarcinome isolé d'architecture lépidique de moins de 3cm et comportant une zone invasive de moins de 5mm. Tout comme pour les adénocarcinomes *in situ* la survie à 5 ans est de 100%.

- La suppression de la vaste catégorie des adénocarcinomes invasifs mixtes : la vaste catégorie des adénocarcinomes mixtes a été supprimée et le diagnostic d'adénocarcinome invasif doit maintenant préciser la composante architecturale prédominante, en déclinant par ordre de pourcentage dégressif toutes les composantes.

- Les adénocarcinomes d'architecture micro-papillaire apparaissent comme un nouveau sous-type histologique car ils sont reconnus comme étant de mauvais pronostic.



- Le terme de carcinome bronchiolo-alvéolaire mucineux est remplacé par celui d'adénocarcinome infiltrant mucineux (en effet les carcinomes bronchiolo-alvéolaires *in situ* mucineux sont extrêmement rares). Ces derniers sont très différents des adénocarcinomes *in situ* (anciennement carcinome bronchiolo-alvéolaire non mucineux). Ces différences sont cliniques, radiologiques, pronostiques et moléculaires (les adénocarcinomes mucineux présentent le plus souvent une mutation de *KRAS* sans mutation du gène *EGFR* et d'expression du TTF1) (19, 20).

L'intérêt de cette nouvelle classification réside dans sa valeur pronostique, démontrée pour les adénocarcinomes de stade I, permettant d'identifier trois groupes pronostiques selon leur sous-type histologique :

- ceux de bon pronostic incluant les adénocarcinomes *in situ* et les adénocarcinomes à invasion minime
- ceux de pronostic intermédiaire comprenant les adénocarcinomes à prédominance tubulaire ou papillaire
- ceux de mauvais pronostic, constitués par les adénocarcinomes à prédominance solide, mucineux ou micro-papillaire

Classification des adénocarcinomes pulmonaires proposée par l'IASLC/ATS/ERS
<p>Lésions pré-invasives Hyperplasie pneumocytaire atypique Adénocarcinome <i>in situ</i> (≤ 3 cm, anciennement carcinome bronchiolo-alvéolaire)</p>
<p>Adénocarcinome avec invasion minime (≤ 3 cm avec infiltration ≤ 5 mm)</p>
<p>Adénocarcinome invasif</p> <ul style="list-style-type: none"> • Prédominance lépidique (anciennement carcinome bronchiolo-alvéolaire) • Prédominance tubulaire • Prédominance papillaire • Prédominance solide <p>Autres variants Adénocarcinome mucineux à prédominance lépidique Cystadénocarcinome mucineux Adénocarcinome colloïde Adénocarcinome fœtal Adénocarcinome entérique</p>

2.6. Facteurs pronostiques histologiques

Comme dans tous les cancers, la taille, le grade, la présence de nombreuses mitoses, d'embolies vasculaires, de nécrose, l'invasion (notamment pleurale) et la présence de métastases ganglionnaires sont des facteurs de mauvais pronostic.

Plus spécifiquement, pour les adénocarcinomes mixtes majoritairement bronchiolo-alvéolaires, la taille de la zone centrale d'invasion est un facteur pronostique (100% de survie à 5ans si < 5mm, 70% si < 15 mm, 40% si > 15mm).

2.7. Immunohistochimie

L'expression des marqueurs épithéliaux est partagée avec celle des autres cancers pulmonaires. La CK7 est fréquemment exprimée de façon intense contrairement à la CK20 confinée aux tumeurs les plus mucineuses (21).

L'expression du facteur de transcription TTF-1 est exprimée dans 80% des adénocarcinomes pulmonaires primitif et sur les métastases d'origines pulmonaires.

Le TTF-1 n'est pas pathognomonique des adénocarcinomes pulmonaires puisqu'il est également exprimé dans les cellules dérivées de la thyroïde (22, 23). Il est très souvent négatif dans les adénocarcinomes pulmonaires mucineux et également dans les adénocarcinomes d'origine autre (sein, colon, prostate, rein) et les mésothéliomes (24).

2.8. Classification TNM

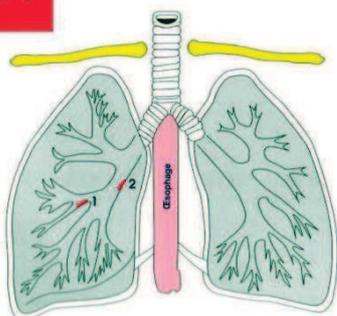
La classification TNM, proposée historiquement par Pierre Denoix (1912-1990) a été le premier système de classification des tumeurs cancéreuses permettant de répartir les malades au sein de groupes relativement homogènes en terme de pronostic. Elle tient compte de données cliniques (métastases), macroscopiques (taille de la tumeur, distance à la carène) et histologiques (extension ganglionnaire, pleuropariétale ou médiastinale). Cette classification a été actualisée en 2009. L'American Joint Committee on Cancer a mis au point à partir de la classification TNM une stratification par stade. De tous les facteurs pronostiques identifiés du cancer bronchique non à petites cellules, le stade est très certainement le facteur prépondérant.

Tx Tumeur prouvée par la présence de cellules malignes dans les expectorations ou les lavages bronchio-alvéolaires, mais non visible à l'imagerie ou à la bronchoscopie

T0 Absence de tumeur primitive décelée

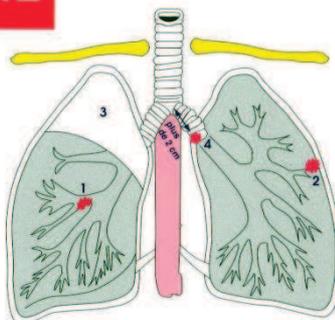
Tis Carcinome *in situ*

T1



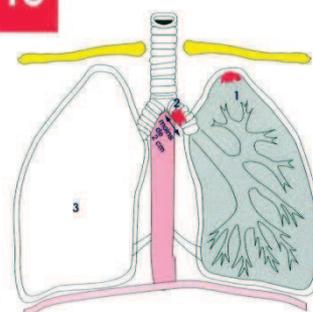
- Tumeur de 3 cm ou moins dans sa plus grande dimension entourée par du poumon ou de la plèvre viscérale (1)
- ou ● tumeur endobronchique proche d'une bronche lobaire mais pas dans la bronche souche (2)

T2



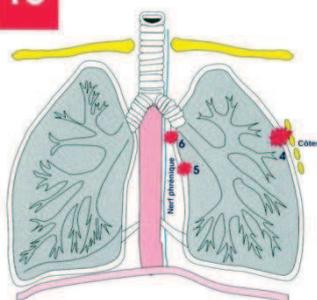
- Tumeur de plus de 3 cm dans sa plus grande dimension (1)
- ou ● extension à la plèvre viscérale (2)
- ou ● atelectasie (3) ou pneumopathie obstructive s'étendant à la région hilaira mais n'intéressant pas l'ensemble du poumon
- ou ● tumeur endobronchique lobaire ou d'une bronche principale à 2 cm ou plus de la carène (4)

T3

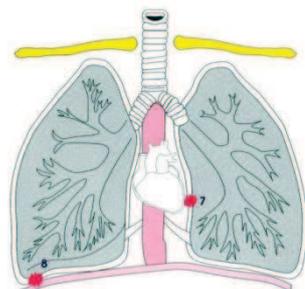


- Tumeur de l'apex (1)
- ou ● tumeur endobronchique d'une bronche principale à moins de 2 cm de la carène mais ne l'envahissant pas (2)
- ou ● atelectasie ou pneumopathie obstructive intéressant l'ensemble du poumon (3)

T3

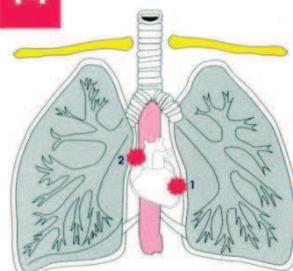


- tumeur de toute taille avec extension directe aux structures adjacentes :
 - à la paroi (4)
 - à la plèvre médiastinale (5)
 - à la graisse médiastinale ou au nerf phrénique (6)

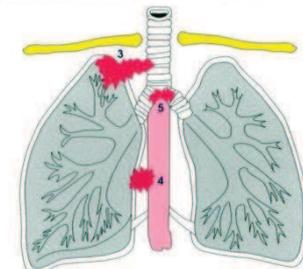


- ou feuillet pariétal du péricarde (7)
- ou diaphragme (8)

T4

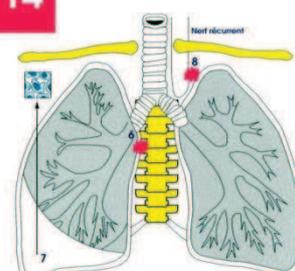


- Extension macroscopique ou histologique :
- au médiastin
 - ou ● au cœur (1)
 - ou ● aux gros vaisseaux (2) (aorte, veine cave supérieure, veine cave inférieure, tronc de l'artère pulmonaire, portions intrapéricardiques des artères pulmonaires droites et gauches, portions intrapéricardiques des veines pulmonaires supérieures et inférieures droites et gauches) ou obstruction de la veine cave supérieure

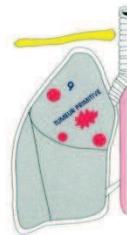


- ou ● à la trachée (3) ou compression de la trachée
- ou ● à l'œsophage (4) ou compression de l'œsophage
- ou ● envahissement de la carène (5)

T4

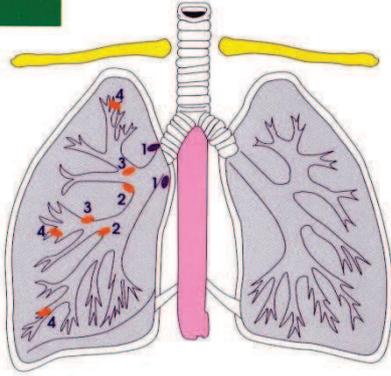


- ou ● extension à un corps vertébral (6)
- ou ● épanchement pleural (7) ou péricardique malin (si l'épanchement n'est pas lié à la tumeur, il ne devrait pas être pris en compte pour l'évaluation du stade et la tumeur devrait être classée au stade T1, T2 ou T3)
- ou ● atteinte du nerf récurrent (8)
- ou ● envahissement de la plèvre viscérale ou pariétale homolatérale ne pouvant résulter de l'extension directe de la tumeur



- ou ● multiples nodules tumoraux dans la même lobes (9)

N1



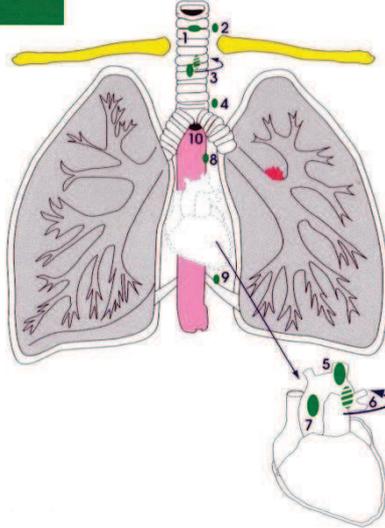
Métastases :

- Aux ganglions lymphatiques hilaires homolatéraux (1)

et/ou

- Aux ganglions lymphatiques péribronchiques homolatéraux :
 - interlobaires (2)
 - lobaires (3)
 - segmentaires (4)

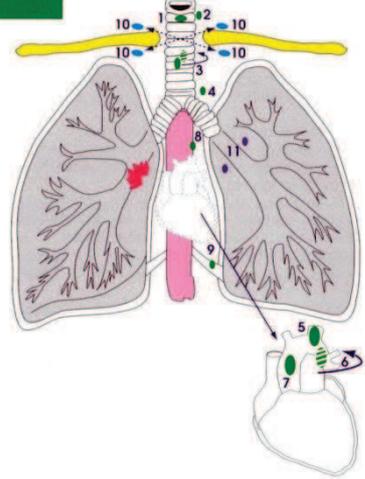
N2



- Métastases aux ganglions médiastinaux homolatéraux
 - médiastinal le plus haut (1)
 - paratrachéaux supérieurs (2)
 - pré et rétrotrachéaux (3)
 - paratrachéaux inférieurs (incluant les ganglions azygos) (4)
- ou - aortiques (5)
- ou - sous-aortiques (fenêtre aortique) (6)
- ou - para-aortiques (7)
- ou - para-cesophagiens (8)
- ou - ligament pulmonaire (9)

ou ● Sous-carénaux (10)

N3



- Métastases aux ganglions médiastinaux controlatéraux
 - médiastinal le plus haut (1)
 - ou - paratrachéaux supérieurs (2)
 - ou - pré et rétrotrachéaux (3)
 - ou - paratrachéaux inférieurs (incluant les ganglions azygos) (4)
- ou - aortiques (5)
- ou - sous-aortiques (fenêtre aortique) (6)
- ou - para-aortiques (7)
- ou - para-cesophagiens (8)
- ou - ligament pulmonaire (9)
- Métastases aux ganglions sus-claviculaires ou scaléniques homo ou controlatéraux (10)
- Métastases aux ganglions hilaires controlatéraux (11)

Carcinome occulte	Tx N0 M0		
Stade 0	Tis N0 M0		
Stade I	T1 N0 M0	T2 N0 M0	
Survie à 5 ans	61 %	38 %	
	↓	↓	
	Ia	Ib	
Stade II	T1 N1 M0	T2 N1 M0	T3 N0 M0
Survie à 5 ans	34 %	24 %	22 %
	↓	↓	↓
	IIa	IIb	IIb
Stade III	T3 N1 M0	T1-3 N2 M0	
Survie à 5 ans	9 %	13 %	
	↓	↓	
	IIIa	IIIa	
Stade III	T4 N0-2 M0	T1-4 N3 M0	
Survie à 5 ans	7 %	3 %	
	↓	↓	
	IIIb	IIIb	
Stage IV	M1 ou plusieurs nodules dans des lobes différents		
Survie à 5 ans	1 %		
	↓		
	IV		

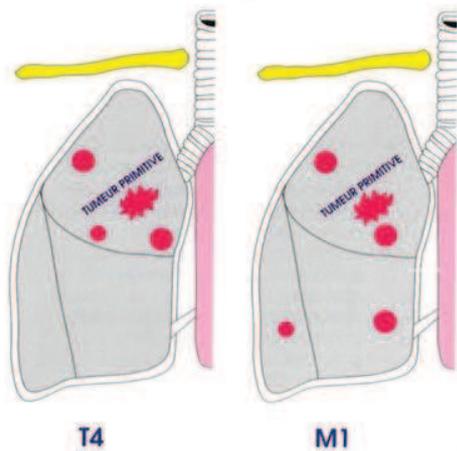
MX Métastases à distance ne pouvant être évaluées

M0 Absence de métastase à distance

M1 Présence de métastase(s) à distance (spécifier le site)

Il est à rappeler que l'existence de **multiples nodules** néoplasiques dans le même lobe pulmonaire permettra un classement en **T4** de ces tumeurs.

D'un autre côté, l'existence de **multiples nodules** dans plusieurs lobes signifiera un classement **M1**.



Septième édition de la classification TNM (2009)	
T	
T0	Pas de tumeur
Tis	Carcinome in situ
Tx	Tumeur non évaluée
T1	Tumeur < 3 cm de grand axe, sans infiltration pleurale, sans invasion de la bronche souche T1a : < 2cm T1b : > 2 cm et < 3 cm
T2	Tumeur > 3 cm et < 7 cm de grand axe ou présentant une infiltration pleurale (PL1, PL2) ou atteignant la bronche souche à > 2 cm de la carène ou associé à une atélectasie ou une pneumopathie obstructive s'étendant à la région hilare sans atteindre le poumon complet T2a : > 3 cm et < 5 cm T2b : > 5 cm et < 7 cm
T3	Tumeur > 7 cm ; ou toute tumeur envahissant paroi thoracique, le diaphragme, le nerf phrénique, la plèvre médiastinale ou pariétale (PL3), le péricarde; ou tumeur de la bronche souche à < 2 cm de la carène ou associée à une atélectasie complète du poumon entier ; ou nodule(s) satellite(s) du même lobe
T4	Tumeur de toute taille envahissant une des structures suivantes : médiastin, cœur, gros vaisseaux, trachée, nerf récurrent laryngé, œsophage, corps vertébral, carène; ou nodule(s) satellite(s) dans un autre lobe ipsilatéral
N	
NX	Non déterminé
N0	Pas de métastase ganglionnaire
N1	Métastase(s) ipsilatérale intrapulmonaire, péribronchique ou hilare incluant les métastases par contiguïté
N2	Métastase(s) médiastinale ipsilatérale et/sous carénaire
N3	Métastase(s) médiastinale ou hilare contralatérale ou sus claviculaire
M	
MX	Non déterminé
M0	Absence de métastase à distance
M1	M1a : nodule satellite dans un lobe contralatéral ; ou carcinome pleurale ou péricardique M1b : métastase(s) extrapulmonaire

2.9. Prise en charge thérapeutique

L'âge moyen au moment du diagnostic est tardif, il est d'environ 65 ans tandis que celui du décès est de 68 ans. La prise en charge thérapeutique est donc importante et doit être entreprise le plus précocement possible (12).

Stade I et II

Le traitement standard repose sur la chirurgie. Pour les patients non opérables, une irradiation externe à visée curative avec fractionnement classique doit être réalisée si l'état respiratoire du patient le permet. Il est recommandé de n'irradier que les volumes tumoraux envahis. Pour les cancers de stade II, une irradiation peut être discutée en complément de la chirurgie en cas d'atteinte pariétale ou d'exérèse incomplète. Dans le cas particulier où la tumeur se présente sous une forme endobronchique exclusive, une curiethérapie peut constituer une alternative.

Stade III

Les cancers de stade III doivent être séparés en ceux de stade IIIA, résécables et éligibles à un traitement chirurgical, et ceux de stades IIIA et IIIB, non résécables, pour lesquels la chimiothérapie est le traitement de référence.

En pratique, pour les cancers de stade III", il n'existe pas à ce jour d'attitude thérapeutique standardisée. La prise en charge doit être discutée dans le cadre d'une réunion de concertation pluridisciplinaire. Elle repose sur un traitement multimodal, associant la chimiothérapie et la radiothérapie voire la chirurgie. Pour les cancers de stade IIIB, le traitement de référence repose sur une chimiothérapie concomitante.

Stade IV

Une métastase unique synchrone à un stade T1-3, N0-1 doit bénéficier d'un traitement à visée curative (chirurgie ou radiothérapie). Chez un malade opéré, l'apparition ultérieure d'une métastase unique (cérébrale, pulmonaire ou surrénalienne) est une indication à une chirurgie et/ou une radiothérapie à visée curative. L'existence de deux ou trois métastases cérébrales (synchrone ou métachrone) doit conduire en réunion de concertation pluridisciplinaire à la discussion d'un éventuel traitement à visée curative. Une irradiation complémentaire

de l'encéphale en totalité ou du lit opératoire peut être réalisée après neurochirurgie ou radiothérapie en condition stéréotaxiques.

Le traitement standard par chimiothérapie des patients atteints d'une forme non opérable de cancer du poumon non à petites cellules (CPNPC) repose soit sur une bithérapie associant un sel de platine à une molécule de troisième génération (les taxanes (docetaxel, paclitaxel), la gemcitabine, le pemetrexed et la vinorelbine), soit sur une chimiothérapie de troisième génération en monothérapie. Le choix du traitement se fait en fonction de l'histologie de la tumeur pour le pemetrexed, du score de performance, des comorbidités associées et du souhait du malade.

La prise en charge des patients atteints d'une forme non opérable de CPNPC dépend désormais du statut mutationnel d'EGFR de leur tumeur. Des recommandations nationales INCa concernant la prise en charge thérapeutique de ces patients sont en cours de finalisation. Les patients dont la tumeur porte une mutation activatrice et sensibilisante de l'*EGFR* bénéficieront d'un inhibiteur tyrosine kinase ciblant la protéine EGFR (TKI-EGFR) en première ou en deuxième ligne de traitement. Les patients éligibles à un traitement par chimiothérapie seront traités par la séquence chimiothérapie/TKI-EGFR ou par la séquence TKI-EGFR/chimiothérapie. Les patients n'étant pas en mesure de recevoir un traitement par chimiothérapie recevront le gefitinib/erlotinib comme traitement de première intention en première ligne.

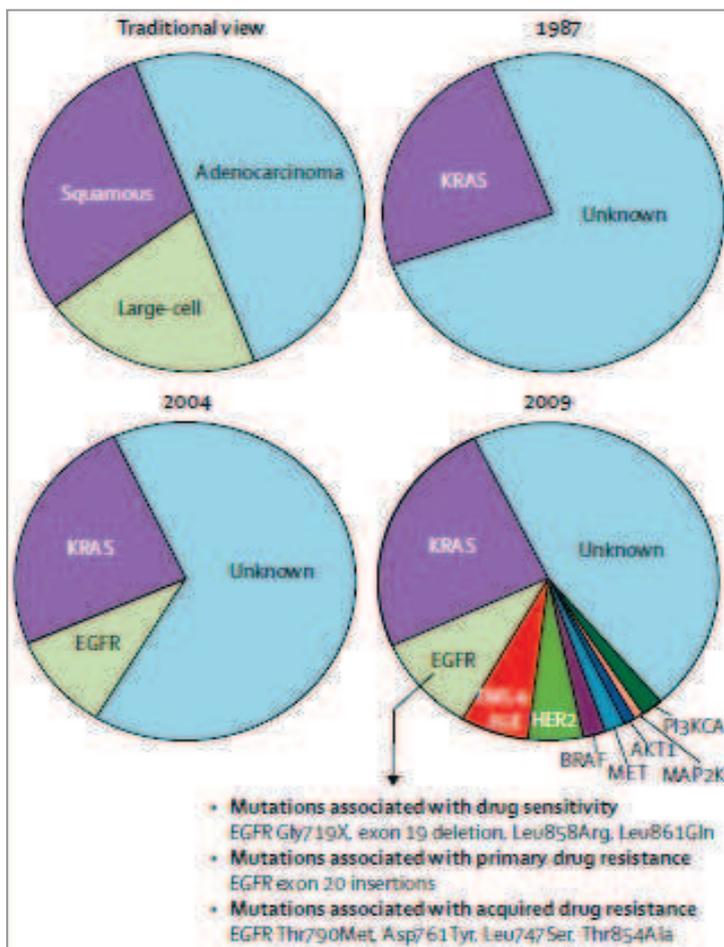
Quand la recherche de mutation n'a pas donné de résultat interprétable, l'agence européenne du médicament (EMA) considère que le traitement par gefitinib peut être prescrit malgré tout aux patients présentant des facteurs cliniques prédictifs de la présence d'une mutation activatrice *EGFR*.

3. Cancérogénèse

3.1. Introduction

Les cellules cancéreuses présentent des altérations génétiques (acquises ou parfois héritées), elles résultent d'une instabilité génomique qui s'installe progressivement par instabilité chromosomique et /ou instabilité microsatellitaire (MSI), ces deux mécanismes n'étant pas exclusifs l'un de l'autre. Une succession d'évènements, épigénétiques et génétiques, impliquant un grand nombre de gènes, transforme l'épithélium normal en cancer. Le développement de mutations sur les gènes de réparation et de maintenance de l'ADN, (oncogènes et gènes suppresseurs de tumeur), ainsi que des modifications épigénétiques (notamment la méthylation anormale de promoteurs de gènes impliqués dans la réparation de l'ADN et la dysrégulation des micro-RNAs) jouent un rôle fondamental dans l'initiation et le développement des tumeurs malignes.

La chaîne de progression et /ou les évènements responsables de l'apparition de ces « driver mutations » ne sont pas encore totalement connus mais on sait néanmoins qu'elles intéressent un nombre restreint de gènes cibles (driver mutations) (25).



Découverte des driver mutations au cours des 20 dernières années

Les adénocarcinomes pulmonaires ne dérogent pas à la règle. En effet, on retrouve des altérations génétiques intéressant des oncogènes tels que *KRAS*, *EGFR* ou *ALK* et des gènes suppresseurs de tumeur comme *p53* ou *p16*.

3.2. Instabilité génomique

Dans 2 à 50% des cancers pulmonaires non à petites cellules (CPNPC), l'instabilité génomique n'intéresse qu'un unique locus chromosomique. Les anomalies surviennent dans l'épithélium normal puis leur nombre et leur sévérité augmente avec l'aggravation des lésions pré-néoplasiques. L'anomalie la plus fréquente (90% des CPNPC) connue à ce jour est la perte allélique dans la région 3p qui survient très précocement dans la carcinogénèse.

Il semblerait que l'on retrouve au niveau de la région 3p des gènes suppresseurs de tumeur tels que *RASSF1* (Ras association domain family), *LMD1*, *SEMA3B*, *SEMA3F* et *FHIT* (fragile histidine triade)(26). Le rôle de *FHIT* est controversé mais une délétion homozygote est identifiée dans un grand nombre de lésions pré-néoplasiques et de CPNPC. *RASSF1* est un gène suppresseur de tumeur qui régule négativement la voie RAS-MAPK ainsi que la progression cellulaire en empêchant la dégradation de la protéine p53. Dans 40% des CPNPC, son promoteur est inactivé par méthylation. *SEMA3F* et *SEMA3B* font partie de la famille des sémaphorines et seraient des gènes suppresseurs de tumeurs impliqués dans l'apoptose et la croissance cellulaire.

Des pertes d'hétérozygotie sont également observées en 9p21 (gène p16), en 8p21-23, 13q14 (gène Rb) et 17p13 (p53). Dans 85% des cas de dysplasies, on observe une aneuploïdie intéressant notamment les gènes *EGFR* et *MYC*(27).

3.2.1. Oncogènes

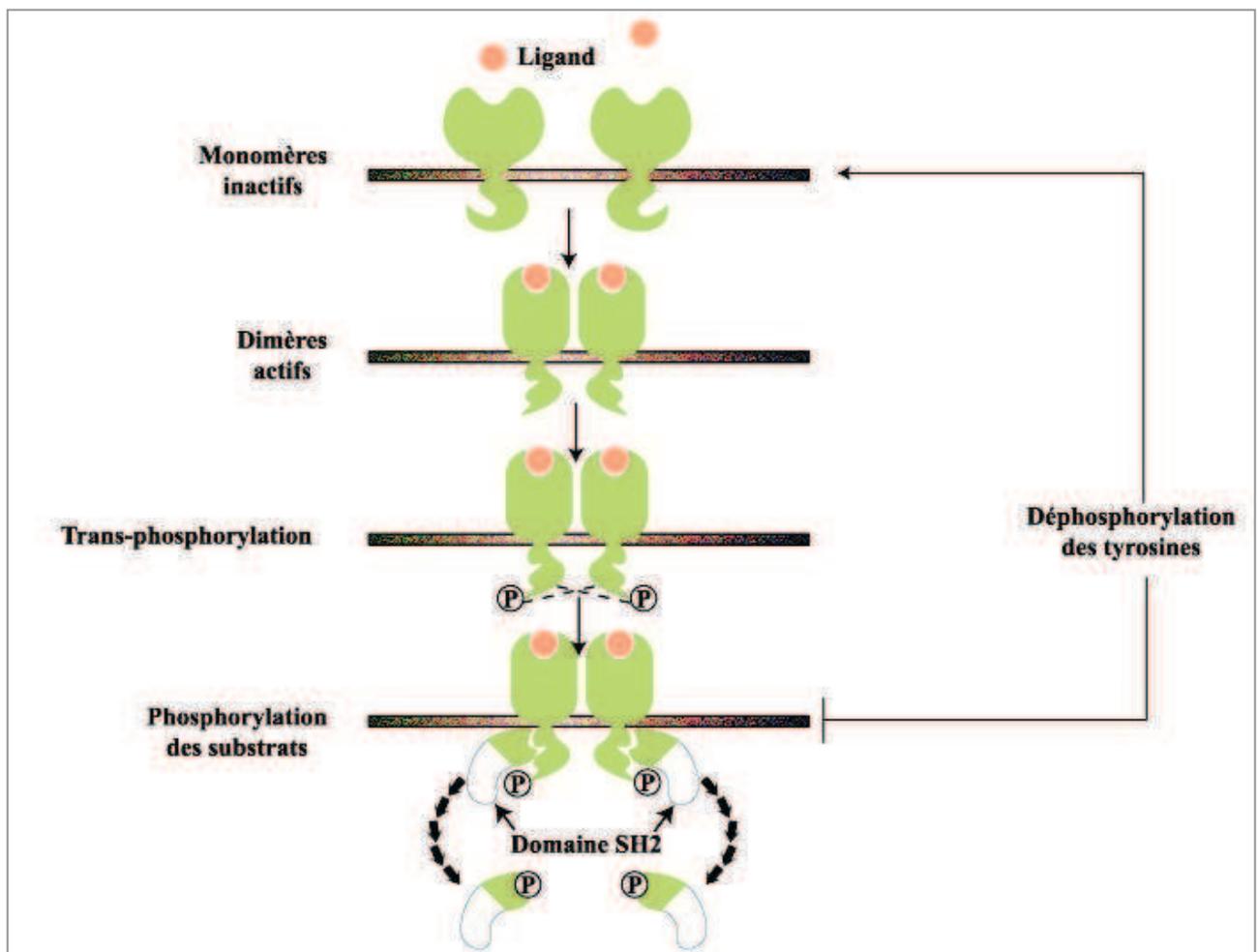
L'activation des oncogènes est consécutive à des anomalies génétiques telles que mutations, amplification ou modifications épigénétiques.

- EGFR

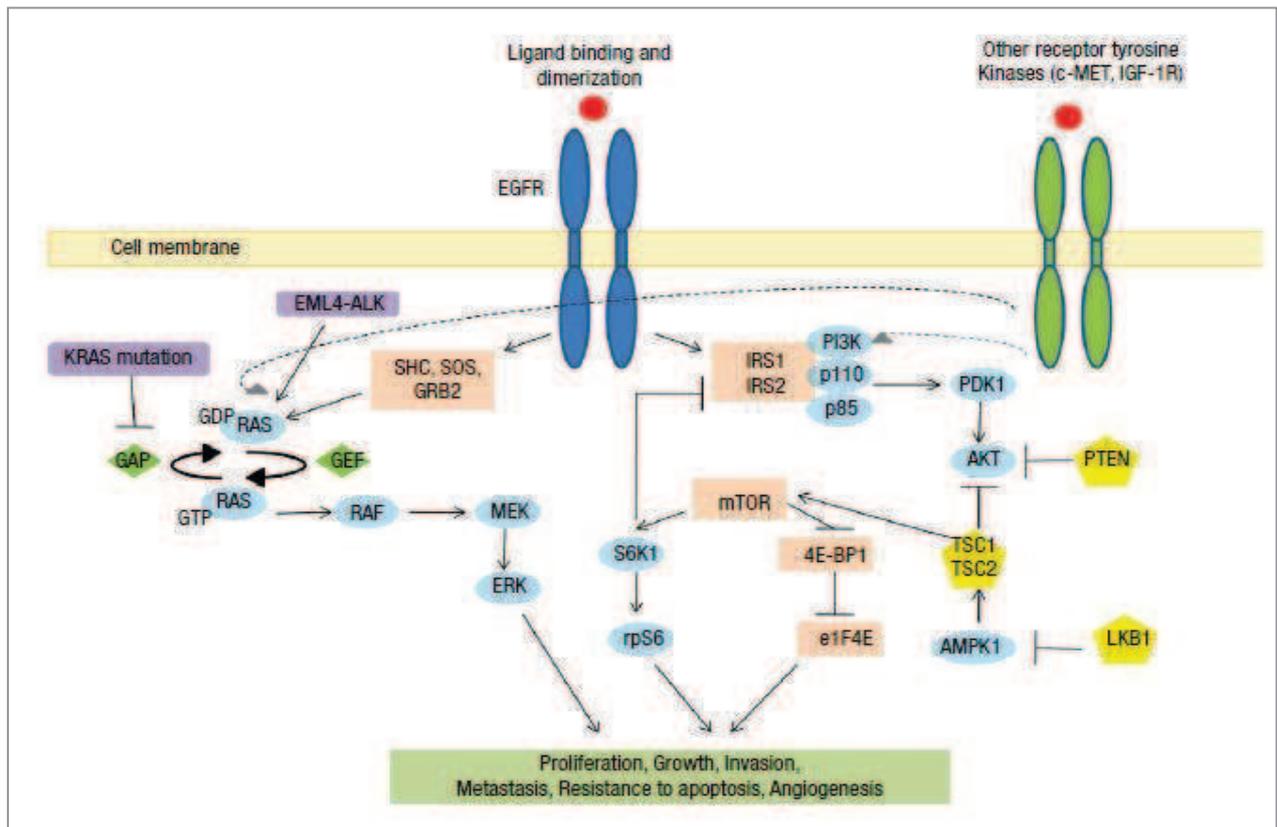
Les récepteurs à EGF (ou ERB) sont des protéines transmembranaires qui appartiennent à la famille des récepteurs à tyrosine kinase (RTK). Ils sont composés de trois domaines :

- extramembranaire (fixation du ligand)
- transmembranaire
- intracellulaire (activité tyrosine kinase)

La fixation du facteur de croissance sur ce récepteur permet sa dimérisation et l'autophosphorylation du domaine tyrosine kinase suivie de l'activation en cascade de voies de signalisation intracellulaire favorisant la prolifération, l'angiogénèse et l'inhibition de l'apoptose.



Mécanisme de d'homodimérisation des RTK

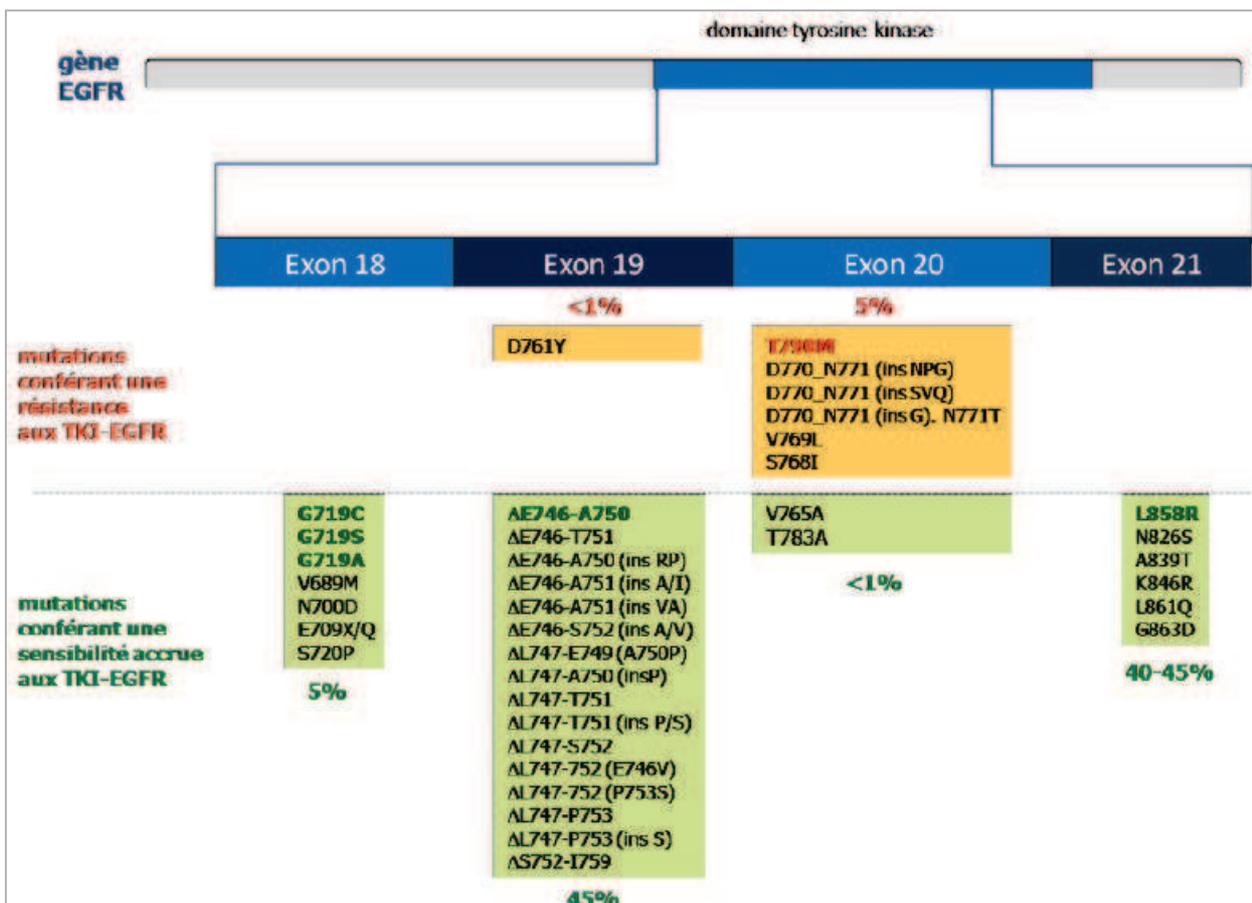


Voie d'activation de l'EGFR

Cette famille de RTK comprend quatre types de récepteurs : HER1 (classiquement EGFR), HER2, HER3 et HER4.

La protéine EGFR est un récepteur membranaire, ubiquitaire, elle est codée par un gène situé en 7p12-13. Les mutations les plus fréquentes sont situées sur le domaine tyrosine kinase codant pour les exons 18 à 21. Elles sont essentiellement décrites dans les adénocarcinomes et plus fréquentes chez les patients d'origine asiatique, de sexe féminin et peu ou non tabagiques. Les mutations prédictives de réponse aux inhibiteurs de tyrosine kinase (TKI) sont les mutations sur l'exon 21 et les délétions sur l'exon 19 qui représentent plus de 85% des mutations. Les autres mutations plus rares sont les substitutions dans l'exon 18 et les insertions de 1 à 3 codons dans l'exon 20. Les insertions dans l'exon 20 semblent être associées à un défaut de sensibilité aux TKI. Ces mutations sont souvent associées à une amplification génique, elle-même corrélée à la surexpression protéique mais qui n'est pas prédictive de la réponse à la thérapie ciblée (28).

Les inhibiteurs des tyrosines kinases de l'*EGFR* ont l'avantage d'avoir peu d'effets secondaires et leur administration est non invasive (per os). Cependant, la majorité des patients initialement répondeurs progressent après 6 à 18 mois de traitement, une partie de ces résistances acquises étant liée à la présence d'une autre mutation, située sur l'exon 20 empêchant la fixation des TKI. Cette mutation de résistance qui est parfois détectée au stade initial de la maladie ne doit pas faire récuser la thérapie par TKI.



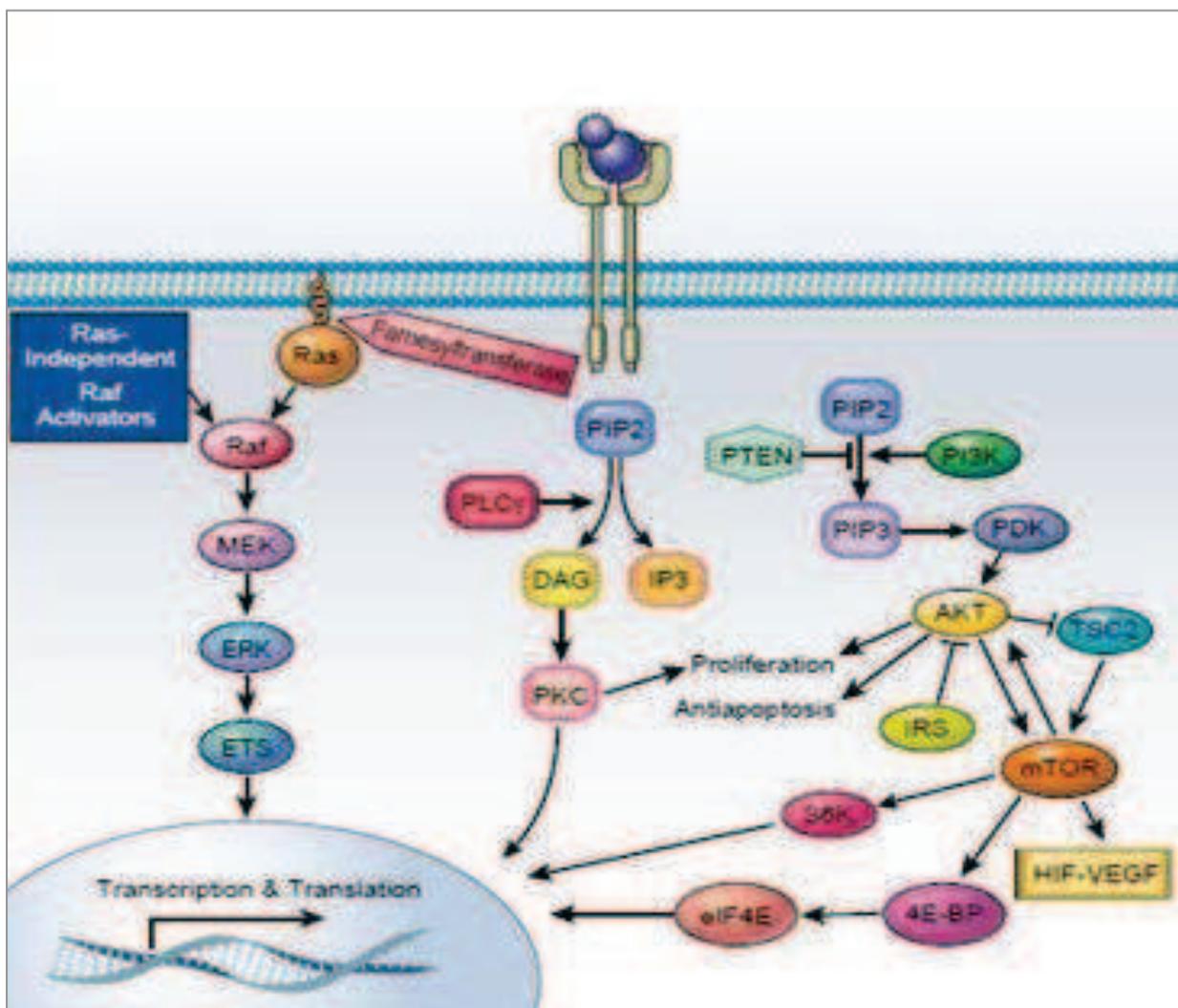
Mutations d'*EGFR* conférant une sensibilité ou une résistance aux TKI (INCa)

- La voie RAS/RAF/MAP

La famille RAS comporte 3 membres nommées HRAS, KRAS et NRAS. Ce sont des protéines G assurant la transduction du signal grâce à l'échange GDP à GTP. La protéine KRAS a la capacité d'activer la cascade RAS/RAF/MEK/ERK. C'est également celle qui est le plus fréquemment mutée (29).

Lorsque les facteurs de croissance adaptés se lient au récepteur EGFR, le complexe Shc/Grb2 /SOS s'active et transforme par phosphorylation RAS-GDP en RAS-GTP. RAS-GTP va pouvoir alors recruter la protéine BRAF au niveau de la membrane cellulaire (30).

Les mutations de la voie RAS/RAF/MAPK en aval de l'EGFR confèrent également des résistances primaires aux TKI. Des mutations activatrices de *RAS* ont été retrouvées dans 20 à 30% des adénocarcinomes de patients fumeurs. Dans plus de 95% des cas, ces mutations se situent dans les exons 12 et 13 comme c'est le cas dans les adénocarcinomes du colon. Ces mutations seraient liées à un mauvais pronostic et à une résistance aux TKI (31). La présence de mutation *BRAF* est retrouvée dans 1 à 2 % des carcinomes pulmonaires non à petites cellules. Les patients porteurs de ces mutations présenteraient une résistance aux TKI anti-EGFR. De plus, les mutations de *KRAS*, *BRAF* et *EGFR* sont exclusives.



Voies RAS/RAF/MAPK et PI3K/mTOR

- La voie PI3KCA/AKT/ mTOR

Cette voie, qui a été la première à être identifiée dans les années 1990, est en aval d'EGFR. Elle est activée précocement dans la carcinogénèse pulmonaire, elle joue un rôle dans la prolifération cellulaire, l'angiogénèse et la synthèse des protéines (32).

La voie PI3KCA (phosphatidyliositol 3-kinase) est activée par de nombreux récepteurs membranaires, la phosphorylation de PI3KCA permet d'activer en cascade AKT puis mTOR (mammalian target of rapamycin). L'activation de cette voie peut être consécutive à des mutations de gènes codant pour cette voie mais aussi par la mutation de gènes suppresseurs de tumeur comme *PTEN* régulant négativement cette voie. Des mutations ou des amplifications de *PI3KCA* sont identifiées dans respectivement 2% et 17% des cancers pulmonaires non à petites cellules (33).

- C-myc

C-myc joue un rôle dans la prolifération et la différenciation cellulaire. Il est amplifié dans 10% des CNPC et surexprimé dans 45% des CNPC.

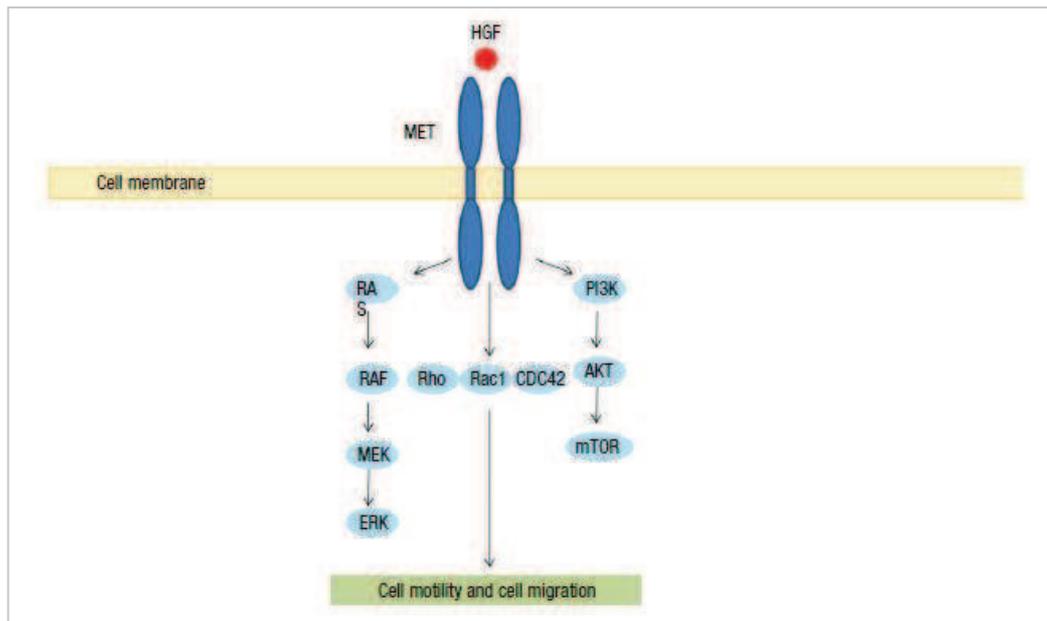
- La voie HGF/MET

La protéine MET (mesenchymal epithelial transition factor) est un récepteur dont le ligand est HGF (hepatocyte growth factor). Elle peut notamment activer des voies telles que RAS/RAF/MAP ou PI3K /AKT/mTOR, elle est impliquée dans la prolifération cellulaire, l'invasion, la migration et l'angiogénèse des tumeurs.

La voie HGF/MET peut être dérégulée par une surexpression de HGF ou MET, une amplification, ou des mutations du gène *MET*.

L'amplification de *MET* est présente dans 1 à 5% des cancers pulmonaires non à petites cellules et est associée à un faible pronostic.

Engelman et al ont rapporté que 22% des cancers présentant une résistance aux inhibiteurs de tyrosine kinase (TKI) de *EGFR* ont une amplification de *MET* et que cette résistance pouvait parfois être inhibée par la prise de TKI de *MET*(34). Cette équipe a également montrée que l'amplification de *MET* pouvait engendrer des résistances aux TKI de *EGFR* (33).



Voie HGF/MET

- La voie ALK

En 2007, pour la première fois, une protéine de fusion impliquant le gène *ALK* (anaplastic lymphoma kinase) et le gène *EML4* (echinoderm microtubule associated protein like 4) a été décrite. Cette protéine de fusion est présente dans 3 à 7% des CPNPC (35).

Nous traiterons plus en détail, dans un prochain chapitre, le mécanisme oncogénique de *ALK*, son rôle et sa détection dans les CPNPC et notamment l'intérêt thérapeutique de cette découverte.

3.2.2. Les gènes suppresseurs de tumeur

La perte de matériel chromosomique et les modifications épigénétiques (hyperméthylation) sont les mécanismes les plus fréquemment impliqués dans l'inactivation des gènes suppresseurs de tumeur. Les gènes les plus souvent délétés sont *P53*, *Rb1* et *P16*.

- Le gène *LKB1* ou *STK11*

La protéine *STK11* est une sérine /thréonine kinase, identifiée en 1997 en raison de son implication dans le syndrome de Peutz-Jeghers. Cette protéine est mutée chez 30 % des patients caucasiens présentant un adénocarcinome pulmonaire.

Ji et al. ont démontré que les délétions de *STK11*, chez des modèles murins mutés pour *KRAS* et porteurs d'un cancer pulmonaire, favorisent la prolifération, l'invasion et les métastases tumorales mais qu'une mutation unique de *STK11* n'engendre pas l'apparition d'un cancer pulmonaire (33).

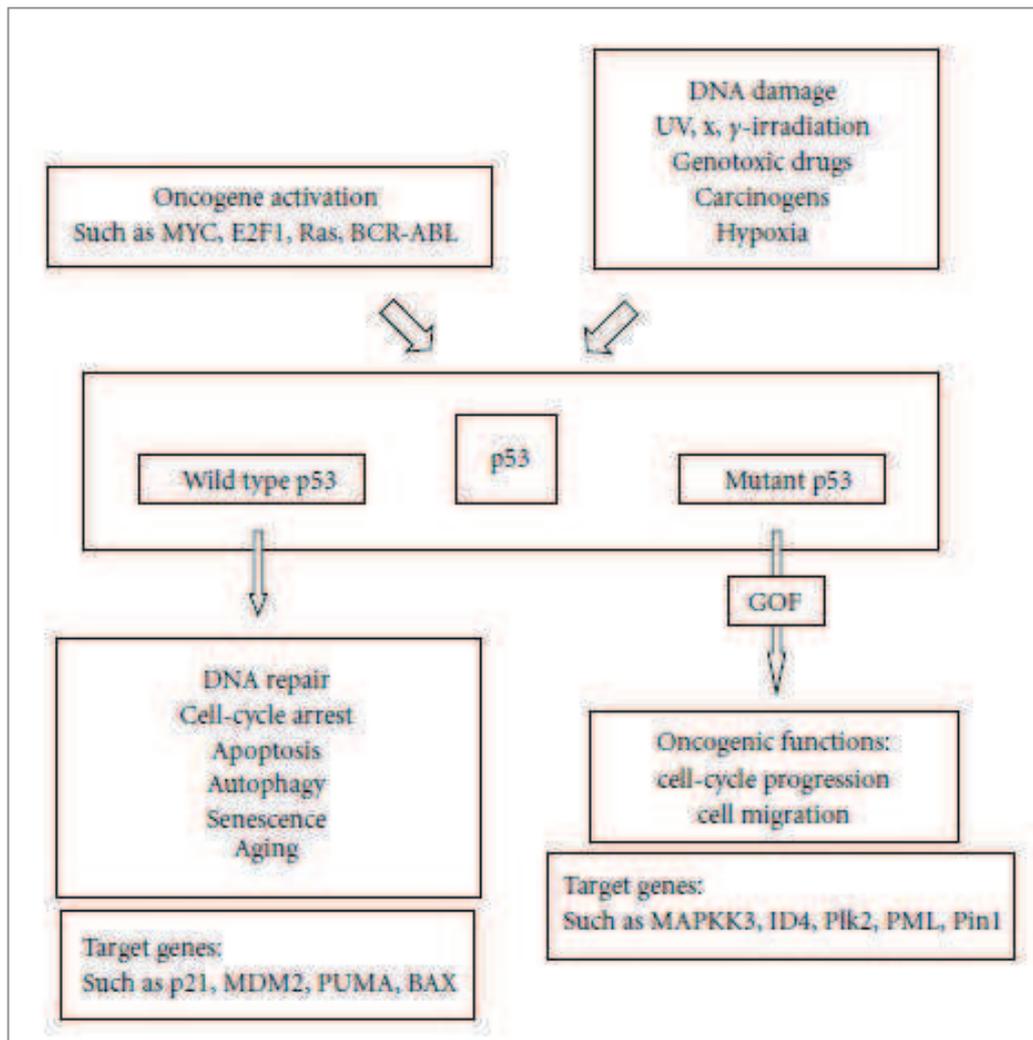
- Le gène *P53*

Il a pour la première fois été décrit en 1979. Le gène *P53* est situé sur le bras court du chromosome 17 (17p13). Il est constitué de 11 exons et code pour un facteur transcription de 53 kDa impliqué dans un grand nombre de processus biologiques comme la réparation de l'ADN, l'arrêt du cycle cellulaire ou encore l'apoptose (36).

Une perte d'hétérozygotie est détectée dans environ 50% des cancers pulmonaires non à petites cellules. Plusieurs études montrent que les mutations de *P53* seraient plus fréquentes dans les carcinomes épidermoïdes que dans les adénocarcinomes, les mécanismes mutationnels diffèrent pour ces deux types histologiques. Il semblerait également que les mutations de *P53* soient conservées dans la progression tumorale et dans l'extension métastatique.

Le tabac serait l'un des protagonistes à l'origine des mutations de *P53*, en effet selon certaines études, elles seraient présentes chez 26 à 71% des patients fumeurs contre 8 à 47% des patients non-fumeurs.

L'un des objectifs de nombreuses équipes de recherche est de mettre au point une molécule capable de cibler et d'inhiber les mutations de *p53*, d'autant plus que ces dernières confèrent une résistance aux chimiothérapies actuelles (37).



Vue synthétique de la voie p53 : les mutations de ce gène entraînent des gains de fonction (GOF) qui contribuent à la progression tumorale (Mogi 2011)

- La voie *Rb /P16*

La protéine Rb a un rôle majeur dans l'arrêt de la phase G1 en cas de réplication anormale de l'ADN. Une perte d'expression de Rb, par phosphorylation, est identifiée dans 15% des CPNPC mais n'est jamais observée dans les lésions pré-néoplasiques.

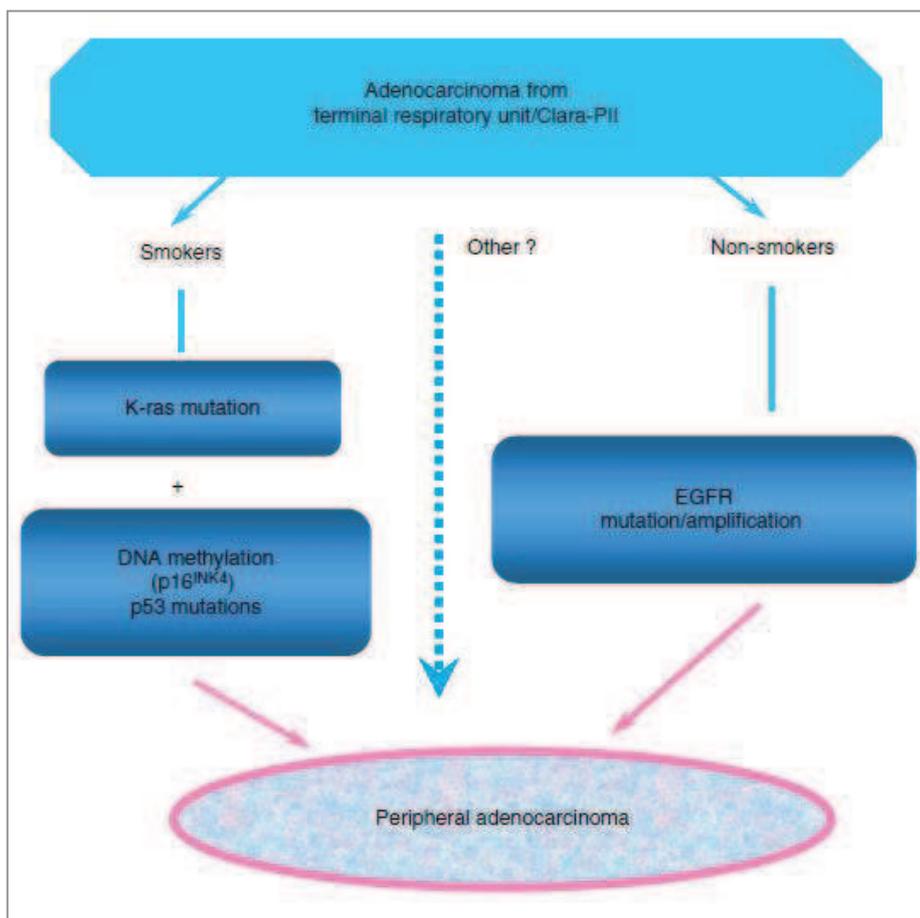
Deux mécanismes sont impliqués, l'inactivation de la protéine p16 et la surexpression de la cycline D1 (38).

3.3. Hypothèse sur les modèles séquentiels histologiques et moléculaires à l'origine des adénocarcinomes

Les voies de carcinogénèse à l'origine des adénocarcinomes, développés à partir des revêtements épithéliaux bronchiolo-alvéolaires distaux, sont différentes selon le statut tabagique du patient.

La voie observée chez les non-fumeurs (préférentiellement des femmes d'origine asiatique) implique des mutations et des amplifications du gène *EGFR*. La voie impliquée chez les fumeurs met en jeu des mutations de *KRAS* ainsi que l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeur tels que *P16* ou *P53* (39, 40).

Les mécanismes à l'origine des adénocarcinomes développés à partir de l'épithélium bronchique proximal ne sont, quant à eux, toujours pas élucidés (27).



Les 2 principales voies supposées à l'origine du développement de l'adénocarcinome périphérique du poumon (Lantuejoul 2009)

4. Identification d'une nouvelle anomalie génétique intéressant les cancers pulmonaires non à petites cellules

4.1. Oncogenèse de ALK

Parmi les grands groupes d'oncogènes, la famille des récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK) est particulièrement impliquée dans les processus oncogéniques (41). Ces protéines RTK appartiennent au groupe des récepteurs enzymes et sont à l'origine de plusieurs cascades jouant un rôle majeur dans la prolifération cellulaire, le contrôle de l'apoptose ou encore la migration cellulaire.

La majorité des RTK sont des monomères formés d'un domaine extracellulaire capable de se lier à un ligand, d'un domaine transmembranaire et d'un domaine intracellulaire pourvu d'une activité tyrosine kinase intrinsèque. Leur activation nécessite une dimérisation capable de phosphoryler le site catalytique qui pourra alors recruter des protéines relais intracellulaires et ainsi déclencher de nombreuses cascades de signalisation.

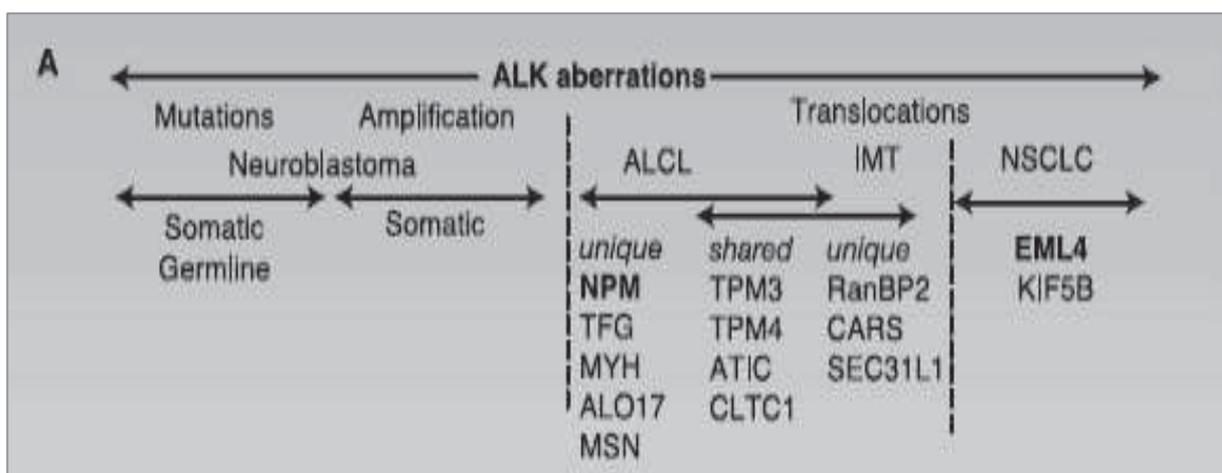
Le gène *ALK* (anaplastic lymphoma kinase), localisé sur le bras court du chromosome 2 (2p23) code pour une protéine membranaire RTK appartenant à la superfamille des récepteurs à l'insuline. Chez les mammifères, la protéine ALK est peu exprimée et sa fonction exacte n'est pas encore clairement définie : il semblerait cependant qu'elle joue chez l'homme un rôle dans le développement du système nerveux central et périphérique (42, 43).

L'implication du gène *ALK* en cancérogénèse a été identifiée suite à la découverte en 1994 d'une protéine de fusion chimérique associant une partie de la protéine NPM (nucleoplasmin) au domaine tyrosine kinase de la protéine ALK (42). Cette protéine de fusion est fortement exprimée dans les lymphomes anaplasiques et les lymphomes B diffus à grandes cellules. Depuis, de nombreuses équipes de recherche ont prouvé son rôle déterminant dans d'autres cancers non hématopoïétiques (41, 44, 45) tels que les tumeurs myofibroblastiques inflammatoires (1999), les neuroblastomes ou encore certains cancers pulmonaires non à petites cellules (2007) (35).

Les remaniements du gène *ALK* correspondent majoritairement à des translocations impliquant invariablement le même point de cassure. Celui-ci est situé en 2p23 au

sein de l'intron encadré par les exons 19 et 20. Chacun des réarrangements comporte les exons 20 à 29 qui codent pour la partie intracytoplasmique du récepteur et donc pour son site catalytique. Suite à ces remaniements, le gène *ALK* se trouve au contact de régions promotrices capable de l'activer exagérément pour aboutir *in fine* à une synthèse importante de protéines chimériques. Ces dernières sont composées à l'extrémité N-terminale d'une protéine partenaire fortement exprimée dans les cellules et à l'extrémité C-terminale du domaine tyrosine kinase (domaine catalytique) de la protéine ALK (44). La localisation cellulaire de la protéine de fusion est déterminée par la portion partenaire N-terminale, la dimérisation (homologue ou hétérologue) n'étant possible que par leur intermédiaire. En fonction des partenaires, les différentes protéines de fusion du gène *ALK* resteront intracytoplasmiques ou traverseront la membrane nucléaire.

Si l'implication des protéines de fusion de ALK joue un rôle majeur dans les lymphomes anaplasiques (la translocation NPM-ALK est présente dans 70 à 80% des cas), leur fréquence est plus faible – mais néanmoins non négligeable - dans les cancers solides. En effet, les protéines chimériques TPM3 (tropomyosin 3)-ALK et TPM4-ALK sont présentes dans 50 à 60% des tumeurs myofibroblastiques inflammatoires (43, 46). La protéine de fusion EML4 (echinoderm microtubule-associated protein-like 4)-ALK est détectée dans 3 à 7 % des cancers du poumon non à petites cellules. D'autres gènes partenaires ont également été détectés pour ces différents cancers mais leur fréquence est infime (47).



Différents gènes partenaires du gène *ALK* (d'après Mossé 2009)

4.2. Implication du gène *ALK* dans le cancer du poumon

ALK est impliqué dans le développement de certains cancers du poumon, le gène partenaire principal est *EML4* (echinoderm microtubule associated protein like 4). D'autres gènes partenaires (*KIF5B* et *TFG*) ont été identifiés, 3 cas ont été décrits témoignant de la rareté de ces variants(48-51).

La protéine fusion *EML4-ALK* est détectée dans 3 à 7 % des cancers du poumon non à petites cellules. Cette protéine résulte d'une inversion au sein du bras court du chromosome 2, liant un intron de *EML4* à l'intron 19 du gène *ALK* en 2p23. Comme mentionné précédemment le point de cassure de *ALK* ne varie pas, en revanche *EML4* peut être scindé à proximité des exons 2, 6, 13, 14, 15, 18 ou 20. En fonction des points de cassure, la taille des protéines de fusion *EML4-ALK* varie, la littérature rapporte à ce jour treize variants ont été identifiés. Cependant, on ne sait pas si leur implication oncogénique est différente.

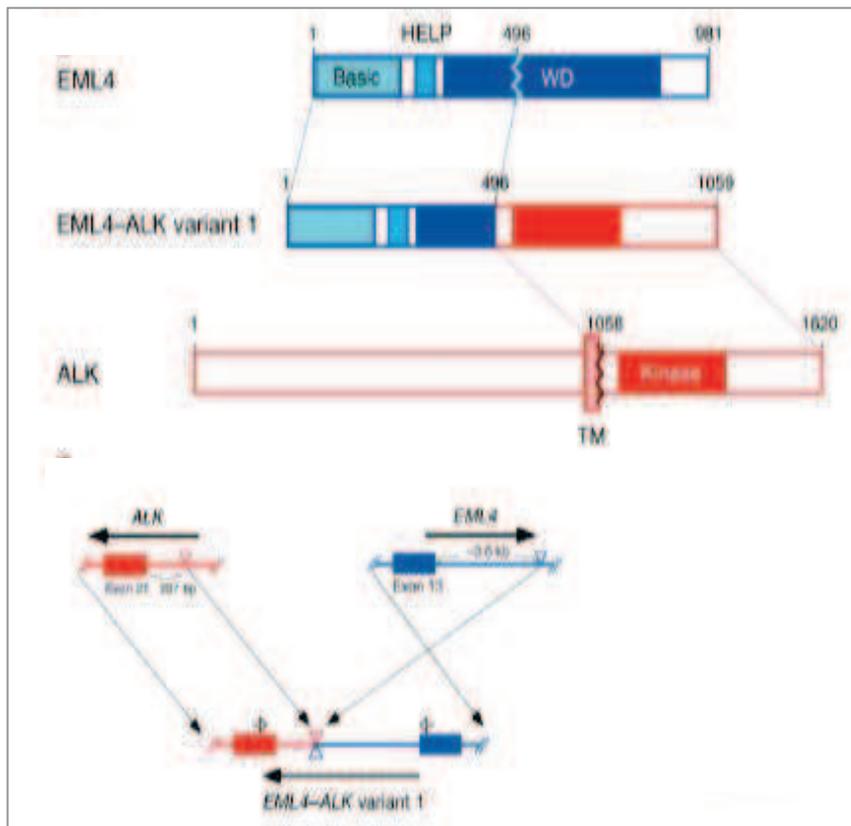
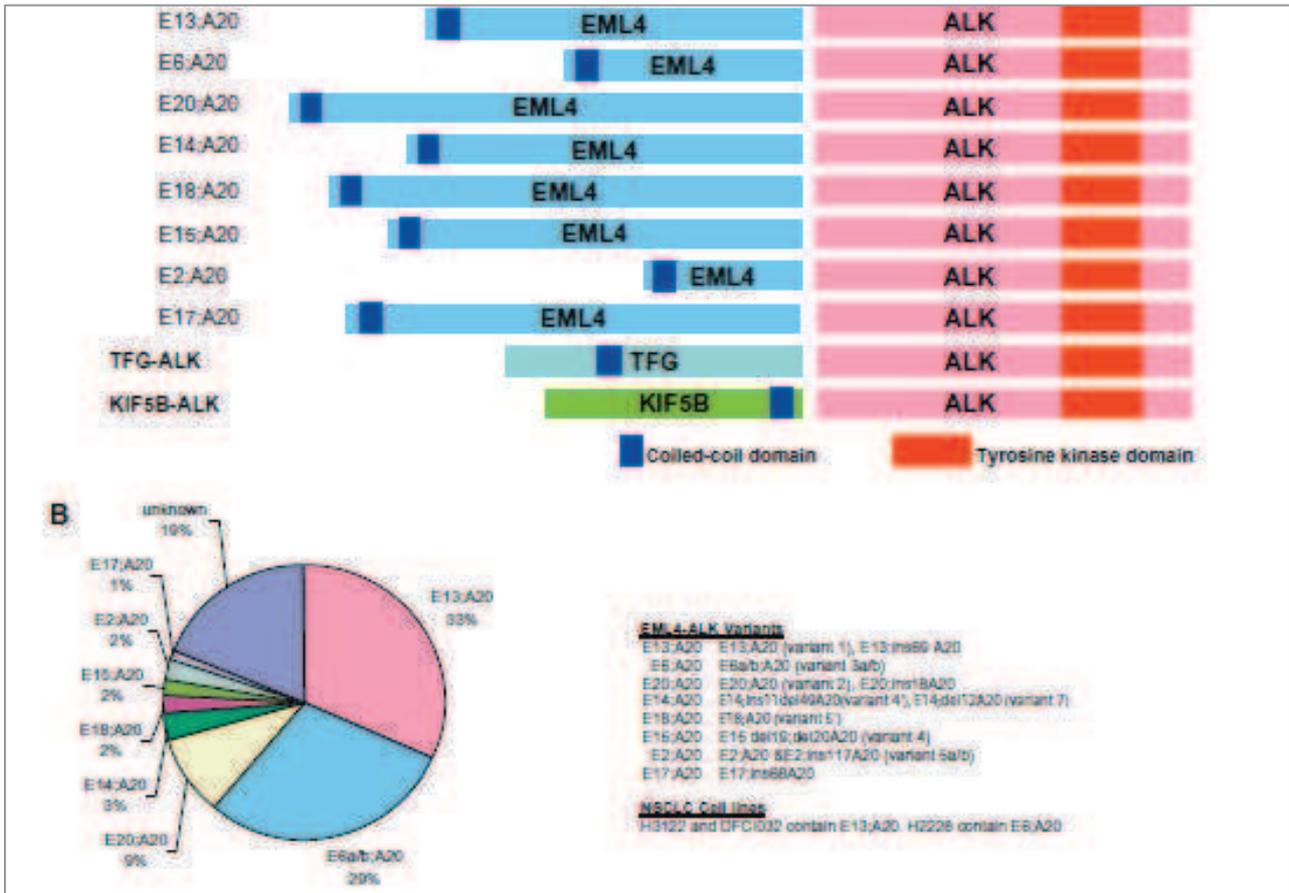


Illustration de l'inversion entre *ALK* et *EML4* (Soda 2007)



Différents variants de *ALK* et de ses gènes partenaires dans les CPNPC (Sasaki 2010)

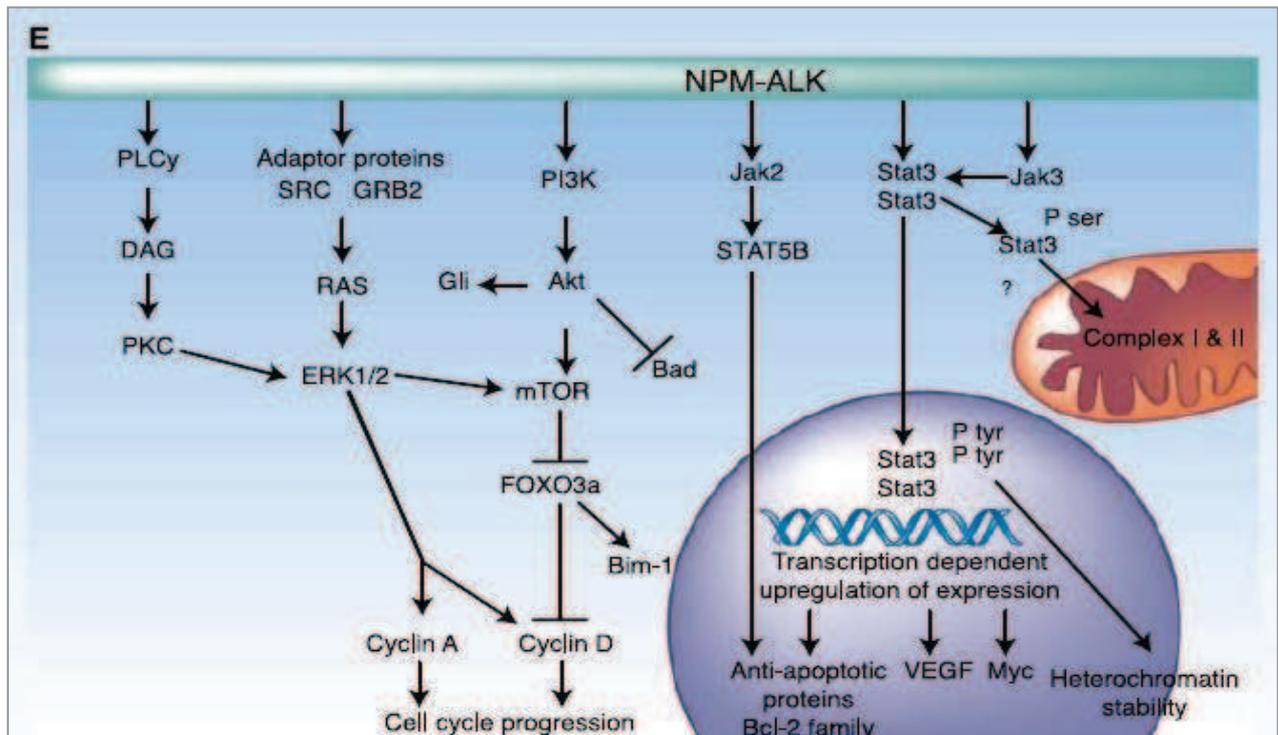
Les protéines de fusion du gène *ALK* ont sans conteste un potentiel oncogénique déclenché par le fonctionnement aberrant du site tyrosine kinase de *ALK*. Tout comme les protéines sauvages *ALK*, elles activent de nombreuses cascades qui interagissent les unes avec les autres. Dernièrement, différentes voies ont été étudiées dont trois sont considérées comme les plus pertinentes. Il s'agit des voies RAS-ERK (Ras-Extracellular signal-Regulated Kinase), JAK-STAT (Janus Kinase-Signal Transducers and Activators of Transcription) et enfin PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase)(52).

Les travaux de recherche qui se sont penchés plus particulièrement sur le lymphome anaplasique ont montré que ces trois voies étaient activées par la protéine de fusion NPM-*ALK*.

La voie Ras-ERK joue un rôle principalement dans la prolifération cellulaire, les voies JAK-STAT et PI3K dans la survie, la migration cellulaire et le réarrangement du cytosquelette qui influence l'aspect morphologique des cellules tumorales.

En raisonnant par analogie, on peut donc supposer que les autres protéines de fusion du gène *ALK*, impliquées dans les cancers solides, activent les mêmes cascades. Et c'est notamment, ce à quoi a abouti très récemment une équipe de

recherche américaine qui a travaillé sur la protéine de fusion EML4-ALK exprimée dans des cancers du poumon non à petites cellules. Cette équipe a en effet démontré que chez la souris, les cascades activées par les protéines de fusion NPM-ALK et EML4-ALK étaient identiques (53).



Voie d'activation de la protéine de fusion NPM-ALK (Mossé 2009)

4.3. Facteur pronostic de l'altération du gène *ALK* dans les CPNPC

Les recherches de *Kwak et al.* mais aussi de *Yang et al.* ont établi que l'altération du gène *ALK* dans les CPNPC est un facteur de mauvais pronostic avec notamment un risque accru de développer des métastases hépatiques et cérébrales (54, 55).

Kwak a comparé 36 patients *ALK* altérés (*ALK+*) à 253 patients *ALK* et *EGFR* sauvages (*ALK-/EGFR-*), ces patients ont été traités par des lignes de chimiothérapies classiques. La moyenne de survie globale du groupe *ALK+* est proche (absence de différence significative) de celle des patients *ALK-/EGFR-* (20 mois versus 15 mois). Malgré ces taux de survie semblables, l'équipe de *Kwak* estime que compte tenu du terrain des patients *ALK+* (patients non-fumeurs et plus jeunes), cette altération est un facteur de mauvais pronostic.

Une étude plus récente de *Wu et al.* contredit ces résultats et conclut que les patients ALK+ ont une meilleure survie que les patients ALK-/EGFR-(56). En effet, la moyenne de survie à 5 ans serait de 14,7 mois pour les patients ALK+ versus 10,3 mois pour les patients ALK-/EGFR-(différence significative). L'équipe de *Wu* a comparé 39 patients ALK+ à 77 patients ALK-/EGFR-, la prise en charge thérapeutique a été identique dans les 2 groupes qui ont reçus une chimiothérapie classique.

4.4. *ALK* un nouveau candidat pour la thérapie ciblée

ALK représente un excellent candidat pour les thérapies ciblées : d'une part ses mécanismes pathogènes sont de mieux en mieux décrits, d'autre part, la protéine ALK est faiblement exprimée dans les cellules normales et n'est présente en quantité importante que dans un petit nombre de cellules nerveuses ce qui limite les effets secondaires toxiques (42).

Plusieurs molécules sont en cours d'évaluation, la plus avancée étant le crizotinib qui a obtenu l'ATU de cohorte en février 2012 et qui obtiendra très prochainement l'AMM pour les cancers pulmonaires présentant un réarrangement du gène *ALK*.

Initialement développée en tant qu'inhibiteur du facteur de croissance hépatocytaire (C-MET), cette molécule s'est avérée être un puissant inhibiteur de ALK. En effet le crizotinib, en empêchant la phosphorylation et les signaux de transduction, stoppe le cycle cellulaire en phase G1-S et induit une apoptose des cellules tumorales porteuses de la protéine de fusion. Ceci a été démontré expérimentalement pour la protéine de fusion NPM-ALK (57). Cette molécule a montré des résultats concluants avec un taux de réponse et une survie moyenne largement supérieurs à ceux des lignes de chimiothérapie classiques.

En 2010, après avoir étudié plus de 1500 patients porteurs d'un CPNPC, *Kwack et al* ont inclus 82 patients transloqués pour *ALK* dans une étude d'extension de phase I, testant le crizotinib en monothérapie chez des patients déjà poly-traités (41% avec plus de 3 lignes de traitements)(58, 59). Les résultats sont très prometteurs avec un taux de réponse partielle de 57% (41/82 patients avec une réponse partielle et un patient avec une réponse complète). Vingt-sept patients sont restés stables et 6 ont vu leur cancer évoluer. En moyenne, la durée moyenne de traitement a été de 6,4

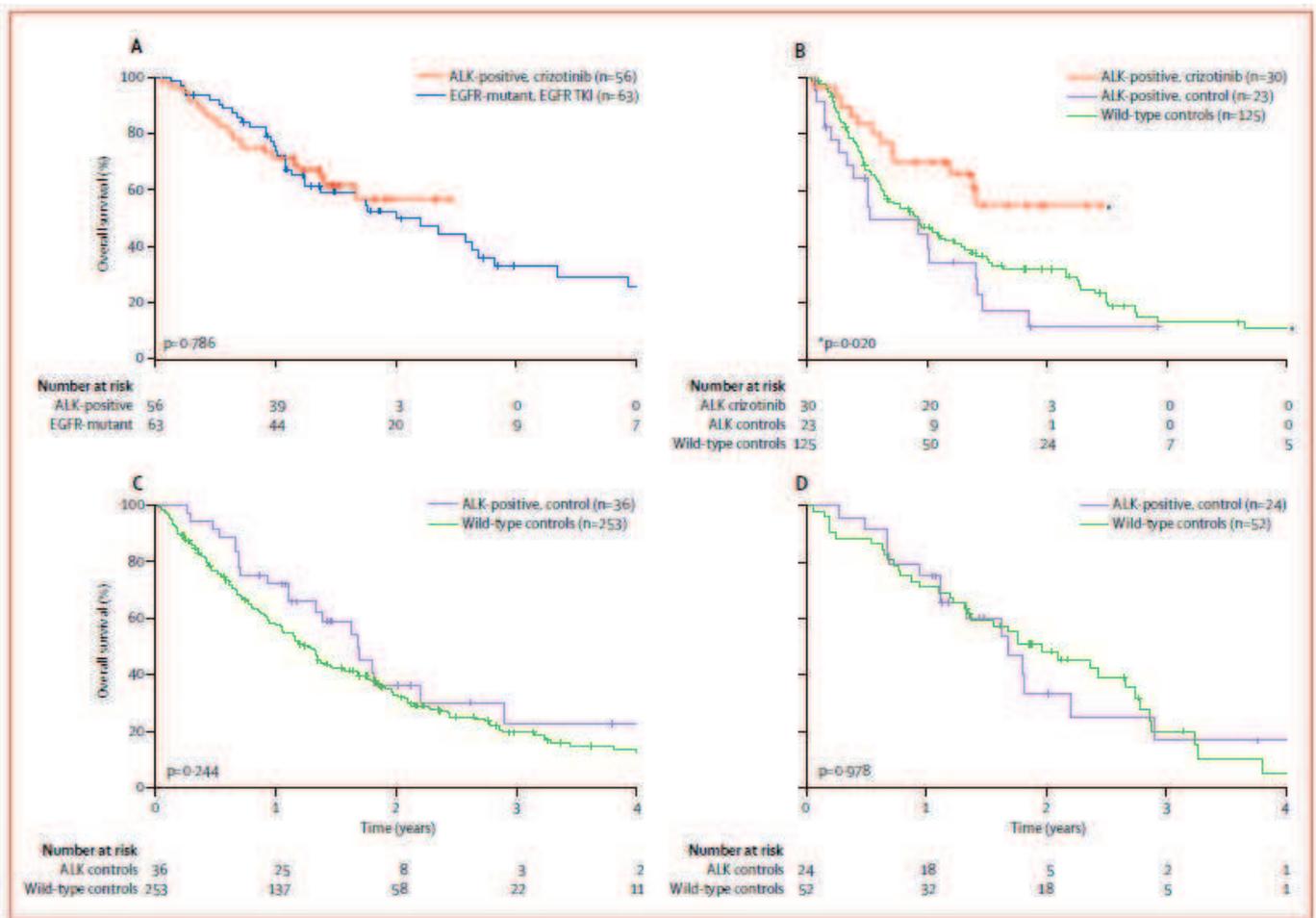
mois et le taux de survie sans progression à 6 mois de 72% alors qu'il n'était que de 27,2% pour des patients bénéficiant d'une chimiothérapie de seconde ligne.

En 2011, la même équipe a évalué la survie globale du groupe de 82 patients *ALK* transloqués, ayant bénéficié du traitement par crizotinib (" LK+/crizo+) et l'a comparé à trois autres groupes, un groupe de 36 patients, également *ALK* altérés, mais ne recevant pas de traitement par crizotinib (*ALK*+/*crizo*-), un autre groupe de 257 patients non altérés pour *ALK* et *EGFR* (*ALK*-/*EGFR*-) et un groupe de 63 patients non altérés pour *ALK* mais mutés pour *EGFR* (*ALK*-/*EGFR*+).

Cette étude comporte de nombreux biais (dont certains impossible à éviter dans les études évaluant des traitements anticancéreux) parmi lesquels l'absence de randomisation, le recrutement rétrospectif pour certains patients *ALK* altérés ne recevant pas le crizotinib, l'origine asiatique (population à risque) de certains patients ou encore le nombre et la nature des différentes lignes de chimiothérapies reçus précédemment par les différents groupes. Malgré tous ces biais, cette étude a le mérite de pouvoir apporter des réponses.

La survie du groupe de 82 patients *ALK*+/*crizo*+ est de 74% à 1 an et de 54% à 2 ans. Si l'on compare un sous-groupe de 30 patients *ALK*+/*crizo*+ recevant le crizotinib en 2^{ème} ou 3^{ème} cures à un groupe de 20 patients *ALK*+/*crizo*- ne recevant aucune ligne de chimiothérapie la survie à 1an est de 70% versus 44% et la survie à 2 ans est de 55% versus 12%. La survie des patients *ALK*+/*crizo*+ est sensiblement similaire à celle des patients *ALK*-/*EGFR*+ ayant reçu des inhibiteurs de l'*EGFR*.

Au final, cette étude conclut que la prise de crizotinib chez les patients *ALK* altérés est associée à une amélioration de la survie et que le réarrangement du gène *ALK* n'est pas un facteur de bon pronostic (59).



- Figure A : survie globale des patients ALK+ / crizo+ vs EGFR+ / TKI+
- Figure B : survie globale des patients ALK+ / crizo+ vs ALK+ / crizo- vs ALK- / EGFR-
- Figure C : survie globale des patients ALK+ / crizo- vs ALK- / EGFR-
- Figure D : survie globale des patients ALK+ / crizo- / < 60 ans vs ALK- / EGFR-

Shaw Lancet 2011

4.5. Caractéristiques épidémiologiques, histologiques, immuno-histochimiques et moléculaires

En fonction des séries, un réarrangement du gène *ALK* est identifié dans 3 à 13% des CPNPC. Quatre études importantes dirigées respectivement par *Kwak*, *Camidge* et *Crino*, *Paik* et *Shaw* ont permis de dresser un profil clinique des patients *ALK+* (54, 59-61):

- l'étude de *Kwak* a intéressé 1500 patients atteints d'un CPNPC dont 82 cas *ALK+*(54)
- *Paik* a colligé 735 prélèvements chirurgicaux dont 28 *ALK+*(61) (cf figure2)
- *Camidge* et *Crino* ont suivi 225 patients *ALK+* (cf figure 3)
- *Shaw* a comparé 92 patients *ALK+* à 67 patients mutés pour *EGFR*(59)

L'ensemble de ces données permet de brosser un portrait type des patients *ALK+* qui appartiendraient à une population non fumeuse ou avec un tabagisme faible (< 10 PA) et chez des patients plus jeunes que ceux touchés classiquement par les CPNPC, l'âge moyen se situe entre 50 et 55 ans.

Dans la très grande majorité des cas, les réarrangements de *ALK* intéressent les adénocarcinomes (entre 85% et 100%), de rares cas de carcinomes épidermoïdes ou de carcinomes adénosquameux ont été rapportés (62-65).

	<i>ALK</i> réarrangement, n (%)				p-Value
	Positive		Negative		
Total	28	3.8%	707	96.2%	(-)
Gender					
Male	11	39.3%	499	70.6%	<0.001
Female	17	60.7%	208	29.4%	
Age (y)					
Median (range)	55 (35-80)		64 (20-84)		<0.001 ^a
Smoking status					
Never-smoker	23	82.1%	234	33.1%	<0.001
Smoker	5	17.9%	472	66.8%	
Histology					
Adenocarcinoma	27	96.4%	368	52.1%	<0.001
Squamous cell carcinoma	0	0.0%	292	41.3%	
Others	1	3.6%	47	6.6%	
Tumor size	3.3 (2.0-5.5)		3.9 (0.7-20.0)		0.198 ^a
Tumor status					
pT1	13	46.4%	188	26.6%	0.02
pT2-4	15	53.6%	519	73.4%	
Lymph node status					
Negative	14	50.0%	426	60.3%	0.28
Positive	14	50.0%	281	39.7%	
Stage					
I	14	50.0%	374	52.9%	0.93
II	6	21.4%	153	21.6%	
III	8	28.6%	180	25.5%	

Figure 2: Caractéristiques clinico-pathologiques de 735 prélèvements pulmonaires dont 28 remaniés pour *ALK*. Paik66 Lung Cancer (2011)

Patient characteristics (n = 255)

Median (range) age (years)	51 (21–82)
Gender (%)	
Male	123 (48)
Female	133 (52)
Eastern Cooperative Oncology Group performance status (%)	
0	78 (30)
I	137 (54)
2–3	40 (16)
Race (%)	
Caucasian	161 (63)
African-American	8 (3)
Asian	77 (30)
Other	9 (4)
Smoking status (%)	
Never-smoker	178 (70)
Former smoker	71 (28)
Current smoker	6 (2)
Histology (%)	
Adenocarcinoma	246 (96.5)
Squamous cell carcinoma	2 (1)
Large cell carcinoma	1 (0.5)
Adenosquamous carcinoma	3 (1)
Other	3 (1)

Figure 3: Caractéristiques clinico-pathologiques de 735 prélèvements pulmonaires dont 28 remaniés pour *ALK*. (Ou SH et al. Drug Des Devel Ther. 2011)

Certains sous types d'adénocarcinomes seraient plus fréquemment observés, les chiffres varient d'une étude à l'autre, mais une équipe japonaise dirigée par *Yoshida A.* a rapporté, dans une série de 54 cas d'adénocarcinomes *ALK+*, que les variants les plus représentés étaient ceux avec une prédominance acineuse (46%), papillaire (30%) ou solide (24%)(66). A noter également que dans 65% des cas, il existerait une composante à cellules indépendantes (66). Pour certaines équipes, les adénocarcinomes acineux s'observeraient plus fréquemment dans la population asiatique féminine alors que l'adénocarcinome à cellules indépendantes serait plutôt présent chez les caucasiens (67, 68). Pour d'autres équipes, les sous-types histologiques seraient indépendants du facteur ethnique (63).

L'équipe de *Yoshida A.* a constaté une positivité de l'anticorps anti-TTF1 dans environ 70% des cas(69). L'anticorps anti-P63 serait également un élément supplémentaire pouvant faire suspecter un remaniement du gène *ALK* puisque cet

anticorps habituellement positif dans les carcinomes épidermoïdes serait présent dans environ 70% des cas (une étude française est actuellement en cours pour évaluer sa fréquence) (69).

Sur le plan moléculaire, de nombreuses études ont montré que les altérations des gènes *ALK*, *EGFR* et *KRAS* sont mutuellement exclusives et que seuls de très rares cas de concomitances ont été décrits (70).

4.6. Détection du réarrangement du gène *ALK*

Les mutations des gènes *EGFR*, *KRAS* et *ALK* étant exclusives un algorithme de détection a été proposé par certains auteurs. Ces derniers recommandent de ne prendre en considération que les adénocarcinomes et de rechercher tout d'abord une mutation *KRAS* (cette dernière étant la plus fréquente chez les patients caucasiens fumeurs) puis en cas de négativité de rechercher successivement une mutation *EGFR* puis un réarrangement *ALK* par hybridation in situ par fluorescence (FISH) ou par réaction en chaine par polymérisation associée à une transcriptase inverse (RT-PCR).

4.6.1. FISH

En 2011, l'institut national de lutte contre le cancer (INCa) a financé la détection des remaniements du gène *ALK* par FISH.

La FISH est une technique morphologique permettant la visualisation de séquences d'acides nucléiques dans une préparation cellulaire. La technique FISH consiste en l'hybridation d'une sonde simple brin, marquée par un fluorochrome sur la séquence cible complémentaire. L'hybridation de la sonde avec la région spécifique de l'ADN cellulaire est visible par détection directe à l'aide d'un microscope à UV.

- Principes biologiques du test " ALK" par FISH

Il existe actuellement plusieurs sondes sur le marché capable de détecter le remaniement du gène *ALK*. Le mélange de sondes le plus communément utilisé est le kit Vysis® ALK Break Apart FFPE de chez Abbott®. Ce mélange contient deux sondes marquées par des fluorochromes différents rouge et vert, encadrant le point de cassure du gène *ALK*. La sonde au niveau de la région télomérique est marquée au "Spectrum Rouge". La sonde couvrant la région centromérique est marquée au "Spectrum Vert". Ce mélange est déposé sur des coupes de tissus fixés au formaldéhyde, inclus en paraffine et prétraitées.

de fusion rouge/vert (parfois jaune) dans la région 2p23 du gène *ALK* resté à l'état natif. En revanche, en cas de réarrangement chromosomique au niveau de la région du point de cassure du gène *ALK* 2p23, on observera deux signaux distincts (1 rouge et 1 vert) ou un signal rouge seul (la région *ALK* sur le second gène non remanié continuera à émettre un signal de fusion rouge/vert). Une séparation entre 2 spots est considérée comme significative si la distance entre 2 signaux équivaut au moins à la taille d'un signal. " que noter la présence d'un unique signal vert n'est pas considéré comme le témoin d'un remaniement *ALK* pouvant répondre actuellement à une thérapeutique (cf Figure 4).

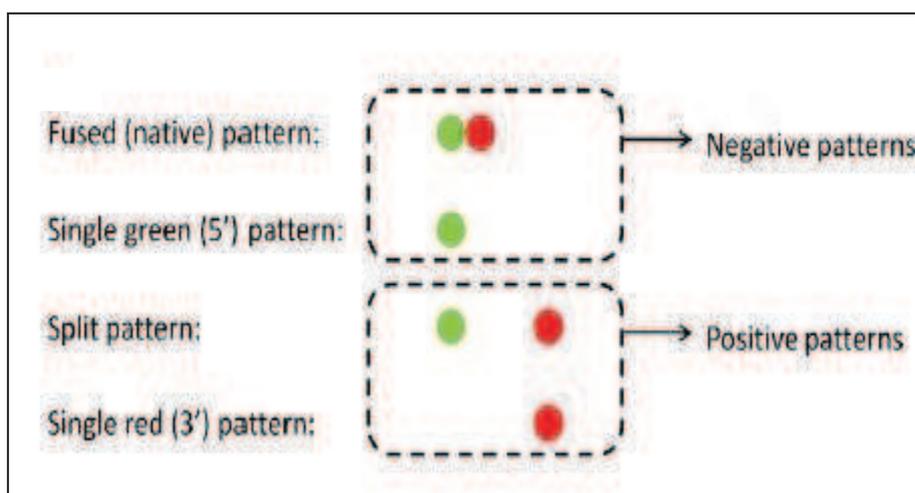
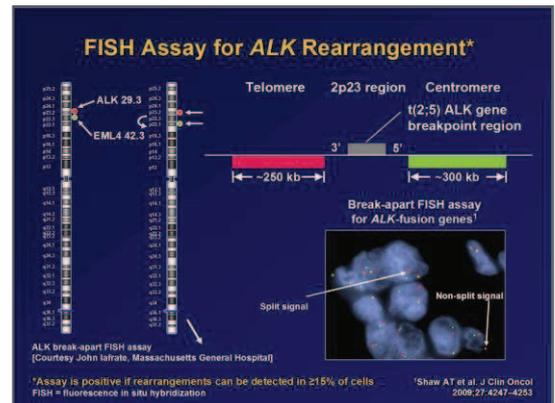


Figure 4: Illustration schématique de l'interprétation de la FISH. Camidge Cancer 2012.

- **Interprétation de la FISH**

Pour de nombreuses équipes d'anatomopathologie la FISH est considérée comme positive (présence d'une translocation du gène *ALK*) lorsque plus de 15% des cellules sont réarrangées (pour un minimum de 50 cellules comptées et analysées). Pour le laboratoire Abbott®, qui commercialise la sonde break apart, la FISH est positive si 50% des cellules tumorales sont réarrangées, si ce taux est inférieur à 10 % la FISH est négative. Entre 10 et 50%, il faut renouveler la technique puis faire une moyenne des deux tests, si cette dernière est supérieure à 15%, le test est considéré comme positif.



4.6.2. Immunohistochimie (IHC)

La technique de FISH est actuellement réalisée en France par une trentaine de plateformes, si cette technique est performante, elle est coûteuse financièrement (nécessité d'investir dans un microscope à fluorescence et dans un logiciel de capture d'images) et en temps technicien. Elle est également plus difficile à mettre en place pour un screening national à long terme de tous les patients porteurs d'un adénocarcinome bronchopulmonaire.

L'IHC est une technique parfaitement adaptée à un screening de routine, réalisable par tous les anatomopathologistes travaillant aussi bien en secteur public qu'en secteur privé. A ce jour, de nombreux anticorps sont disponibles et de nombreuses études ont comparé la FISH à l'IHC.

La plateforme de Grenoble a testé l'IHC (clone 5A4 de chez Abcam® avec un marquage cytoplasmique et membranaire) sur une série 441 adénocarcinomes supposés d'origine pulmonaire, 27 cas (60%) étaient fortement positifs et 2 cas faiblement positifs sur moins de 30% des cellules tumorales. Parallèlement, 100 cas, parmi les 441 et incluant les 27 cas positifs en IHC, ont été testés par FISH (sonde break apart de Vysis®). 19 cas avaient une FISH non interprétable mais 7 d'entre eux étaient positifs en IHC. Un cas fortement positif en IHC était négatif en FISH, les

21 autres cas positifs en IHC étaient également positifs en FISH et enfin parmi les 71 cas négatifs en IHC, 59 étaient négatifs en FISH et 12 non interprétables (cf figure 5). Au final en prenant la FISH comme référence et en ne prenant en compte que les 81 cas interprétables, la sensibilité et la spécificité de l'IHC sont de 100% et 95% (71).

TABLE 1. Concordance between IHC and FISH Data from the 100 Cases Analyzed by Both Techniques

<i>N</i> = 100	FISH Positive (<i>n</i> = 21)	FISH Negative (<i>n</i> = 60)	FISH Noninterpretable (<i>n</i> = 19)
IHC positive (<i>n</i> = 27)	19/21 (90.5%)	1/60 (1.7%)	7/19 (36.8%)
IHC doubtful (<30% cells) (<i>n</i> = 2)	2/21 (9.5%)	0	0
IHC negative (<i>n</i> = 71)	0	59/60 (98.3%)	12/19 (63.2%)

IHC, immunohistochemistry; FISH, fluorescence *in situ* hybridization.

Figure 5: Tableau de concordance entre la FISH et l'IHC sur 100 cas (McLeer-Florin 2011)

Paik a également comparé la technique de FISH à l'IHC (faite avec le clone 5" 4) sur une cohorte de 735 patients. La sensibilité et la spécificité de l'IHC sont respectivement de 100% et 96,2% (cf figure 6)(72, 73).

" l'instar de HER2, certaines équipes ont proposé des scores d'intensité pour décrire ce marquage (1+ marquage faible, 2 + marquage modéré et 3+ marquage granulaire intracytoplasmique intense) afin d'avoir une homogénéité entre les anatomopathologistes dans l'hypothèse où l'IHC deviendrait un jour la technique de détection première.

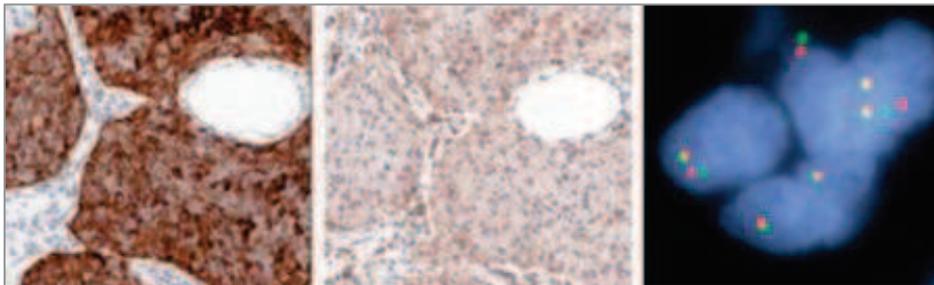
ALK IHC	ALK FISH		Total (%)
	(+)	(-)	
0	0 (0)	680 (92.5)	680 (92.5)
1+	0 (0)	20 (2.7)	20 (2.7)
2+	13 (1.8)	7 (1.0)	20 (2.7)
3+	15 (2.0)	0 (0)	15 (2.0)
Total	28 (3.8)	707 (96.2)	735 (100)

IHC, immunohistochemistry; FISH, fluorescence *in situ* hybridization; NSCLC, non-small cell lung cancer.

Figure 6: Comparaison de l'IHC et de la FISH sur 735 cas dont 28 remaniés pour ALK. (Paik Lung Cancer 2011)

L'IHC serait donc une excellente méthode de détection avec une sensibilité de 100%, capable de screener tous les cas remaniés (absence de faux négatifs pour ces séries).

D'autres immunomarquages existent, historiquement, le premier anticorps mis sur le marché est le clone ALK1 de DAKO® conçu pour les lymphomes anaplasiques, selon de récentes études sa sensibilité varie entre 67 et 90% , sa spécificité serait de 97% et son intensité serait plus faible que le clone 5A4 (74, 75). D'autres clones ont été testés, SP8 (Abcam®), ZAL4 (Zymed®) ou encore P80 (Nichirei®) mais une équipe japonaise a montré que tous les variants n'étaient pas détectés avec ces anticorps (51).



Comparaison des anticorps clone ALK 5A4 , clone ALK1 et de la FISH sur un cas muté (McLeer-Florin 2009)

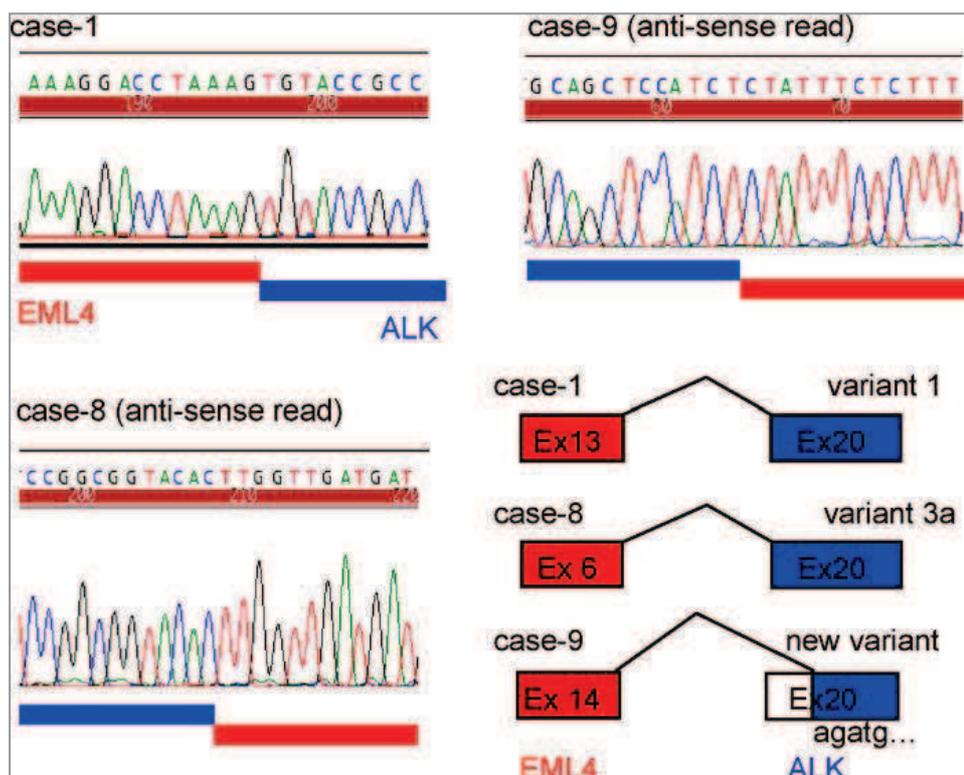
Récemment, un nouvel anticorps très prometteur a été produit, il s'agit du clone D5F3 (Cell signaling technology®), sa sensibilité serait de 100% et sa spécificité de 99%. Ce dernier est depuis peu en vente sur le marché (74).

4.6.3. RT-PCR

La réaction en chaîne par polymérisation est une méthode de biologie moléculaire d'amplification génique *in vitro*, qui permet de copier en grand nombre (avec un facteur de multiplication de l'ordre du milliard), une séquence d'ADN ou d'ARN connue, à partir d'une très faible quantité (de l'ordre de quelques picogrammes)

d'acides nucléiques (amorces spécifiques constituées d'oligonucléotides de synthèse de 20 à 25 nucléotides).

La RT-PCR est une technique qui associe une transcription inverse (RT) suivie d'une PCR. Elle permet de synthétiser le brin complémentaire d'un " RN avec des désoxyribonucléotides en utilisant une ADN polymérase ARN dépendante (transcription inverse). Cet ADNc est destiné à être amplifié par PCR (l'ADNc étant plus stable, il permet plus de liberté que les ARN pour les analyses suivantes). Cette technique nécessite une plateforme de biologie moléculaire et est coûteuse à appliquer en routine, elle présente certaines difficultés. En effet compte-tenu du nombre de variants, elle doit être réalisée en multiplex et l'extraction sur bloc de paraffine ne permet pas d'obtenir un ADNc de bonne qualité. Le taux d'échec de la technique est plus important que pour l'IHC et la FISH. Cependant, cette technique présente un avantage certain puisqu'elle permet d'identifier le variant impliqué.



Détection de réarrangement du gène *ALK* par RT-PCR

4.6.4. RT-PCR quantitative

La RT-PCR quantitative (qRT-PCR) est une technique destinée à pouvoir quantifier un type d'ARN initialement présent dans un échantillon. Ce terme désigne l'utilisation de deux techniques successivement, une transcription inverse suivie d'une PCR en temps réel. Pour l'équipe de *Just et al.*, la qRT-PCR à partir de tissu congelé est le gold standard : en effet, dans leur étude, cette technique a donné de meilleur taux de que la FISH, l'IHC ou la RT-PCR à partir de blocs de paraffine. Si cette technique semble être très sensible elle est difficile à appliquer en routine(76).

4.7. Existe-t-il une corrélation entre le pourcentage de cellules tumorales *ALK+* détectées en FISH et la réponse thérapeutique ?

Le pourcentage de cellules tumorales *ALK+* en FISH varie fortement dans les différentes séries, en moyenne ce taux oscille de 20% à 85%. Il ne serait donc pas illogique d'imaginer que le taux de réponse au crizotinib soit corrélé, proportionnellement, au taux de cellules *ALK+*.

Un premier constat surprenant est le marquage diffus de l'anticorps anti-*ALK* qui bien que d'intensité variable est constamment diffus. Il semblerait donc que la protéine de fusion soit présente dans toutes les cellules tumorales.

L'équipe de *Camidge* s'est intéressée récemment à ces deux points et a suivi 30 patients présentant des tumeurs *ALK+* et traités par crizotinib(77). Aucune corrélation n'a été identifiée entre le pourcentage de cellules *ALK+* et la réponse au traitement. L'hypothèse proposée est que le compte de cellules *ALK+* en FISH est faux et ce, en raison d'artéfacts techniques qui troubleraient la lecture.

L'une des observations de cette étude peut expliquer ce compte erroné : les tumeurs *ALK+*, comportant des cellules mutées avec un seul signal rouge, présentent un taux de cellules positives en FISH significativement plus important que les tumeurs comportant des cellules avec 2 spots (1 rouge et 1 vert) séparés (74% versus 48%). Cette différence peut s'expliquer par une détection à l'œil nu plus facile des spots rouges isolés qui ont un nombre restreint de signaux verts à leur périphérie. Une autre hypothèse est que la position spatiale de l'ARN DN peut donner de fausses images

de spots fusionnés alors qu'ils sont séparés et aboutir à une interprétation faussement négative pour certaines cellules.

En conclusion, le pourcentage de cellules tumorales *ALK+* en FISH ne refléterait pas une réalité biologique et serait la conséquence d'artéfacts techniques (60). Il serait, par ailleurs, intéressant de comparer le taux de réponse du crizotinib en fonction de l'intensité de marquage de l'IHC.

OBJECTIFS DE L'ETUDE

Les objectifs de cette étude étaient de :

- Rapporter l'expérience du CHU de Rouen de la détection par FISH d'un remaniement du gène *ALK* dans une série de 254 patients porteurs d'un adénocarcinome pulmonaire EGFR et KRAS sauvages.
- Analyser le profil morphologique et immunohistochimique des cas remaniés pour le gène *ALK*.
- Comparer deux techniques de détection pour les remaniements du gène *ALK* : l'hybridation in situ par immunofluorescence (FISH) et l'immunohistochimie (IHC).

MATERIEL ET METHODES

1. Données anatomopathologiques et cliniques

Les données ont été obtenues à partir de biopsies et de pièces opératoires de patients porteurs d'un adénocarcinome pulmonaire ou d'une métastase d'origine pulmonaire, de phénotype sauvage pour les mutations des gènes *EGFR* et *KRAS*. Cette étude rassemble l'ensemble des prélèvements parvenus dans le service entre le 01/07/2011 et le 15/02/2012 ainsi que toutes les demandes urgentes jusqu'au 01/04/2012.

Les prélèvements concernent 63 pièces opératoires (poumon uniquement) et 191 biopsies dont 124 biopsies bronchiques. Les autres biopsies correspondent 18 biopsies pleurales, 14 biopsies ganglionnaires, 8 biopsies cérébrales, 6 biopsies médiastinales, 4 biopsies cutanées, 4 biopsies hépatiques, 4 biopsies osseuses, 2 biopsies cervico thoraciques, 1 biopsie surrenalienne, 1 biopsie parasternale, 1 biopsie vertébrale et 1 biopsie rétrosternale (figure7).

Au total 254 patients ont été testés pour la recherche de remaniement du gène *ALK*, 124 par technique FISH seule et 130 par technique FISH et par IHC.

L'âge et le sexe des patients ont été recueillis à partir des compte-rendus anatomopathologiques.

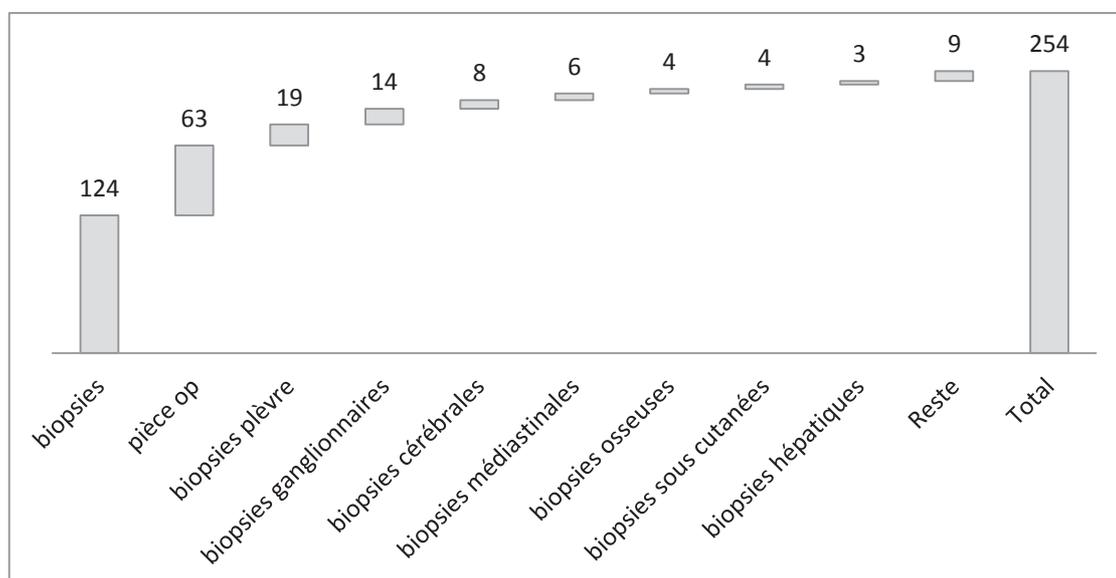


Figure 7: Répartition par type de prélèvement des 254 cas

2. Diagnostic histologique

Les caractéristiques morphologiques de chaque lésion ont été définies à partir de lames colorées à l'HES, avec l'aide pour certaines, de colorations spéciales telles le PAS (periodic acid schiff) et le bleu alcian.

L'origine pulmonaire a été déterminée notamment avec l'aide de l'anticorps anti-TTF1.

Pour le service d'anatomopathologie du CHU de Charles NICOLLE, l'anticorps anti-TTF1 utilisé est l'anticorps monoclonal de souris clone 8G7G3/1 isotype IgG1, kappa (DAKO®). Pour les cas provenant de l'extérieur, le TTF1 a également été réalisé par les anatomopathologistes en charge des prélèvements. Pour les cas TTF1 négatifs (environ 20% des cas selon la littérature), le tableau clinique était celui d'un adénocarcinome d'origine pulmonaire.

3. Analyse par technique de FISH sur blocs de paraffine

3.1. Etapes techniques

De nombreuses étapes sont nécessaires afin de préparer la coupe à recevoir la sonde :

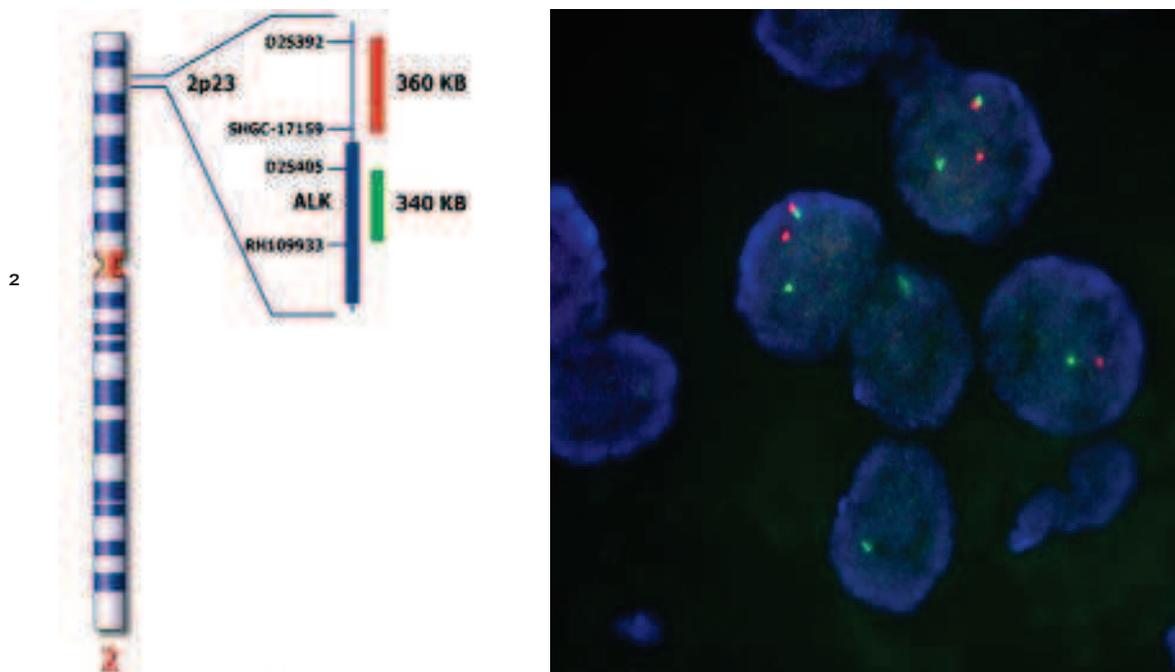
- réaliser des coupes de tissus inclus en paraffine de 4 à 5µ sur des lames superfrost
- sécher les lames blanches à l'étuve de 2h à une nuit à + 56-60°
- déparaffiner au xylène et hydrater à l'alcool
- repérer sur l'envers de la lame la zone de tissu à hybrider
- immerger la lame dans une solution de prétraitement (H₂O_d) pendant 12 à 15 min
- digestion enzymatique (pepsine) pendant 20 min
- nouvelle étape de déshydratation
- hybridation avec une sonde prête à l'emploi puis couvrir avec une lamelle
- co-dénaturer la lame à +73° puis +37°
- laver la lame et ôter délicatement la lamelle
- laver de nouveau la lame au bain marie à +74°
- sécher à l'abri de la lumière
- déposer un contre-colorant (DAPI) et sceller avec une lamelle
- conserver la lame à -20°

La lecture se fait dans une pièce sombre, à l'abri de la lumière, à l'aide d'un microscope muni d'un filtre capable de détecter les fluorochromes rouges et verts à la fois. Avant chaque séance de lecture, il est utile de relire les lames HES afin de garder en mémoire les zones d'intérêt et de pouvoir estimer le nombre de cellules tumorales.

Pour les 254 cas, nous avons utilisé la sonde Vysis Break Apart de chez Abbott® (réf 6N4320) qui est à ce jour la plus fréquemment utilisée. Pour les cas qui se sont avérés positifs, nous avons testé une autre sonde mise sur le marché, il s'agit de la sonde de fusion Poseidon ALK/EML4 t(2;2);inv(2) de chez Kreatech®.

3.2. Sonde Vysis Break Apart (Abbott®)

Sa description et son interprétation ont été décrits précédemment. Nous avons pris comme seuil de positivité celui proposé par l'équipe du Pr Brambilla à Grenoble (> 15% de cellules tumorales remaniées).

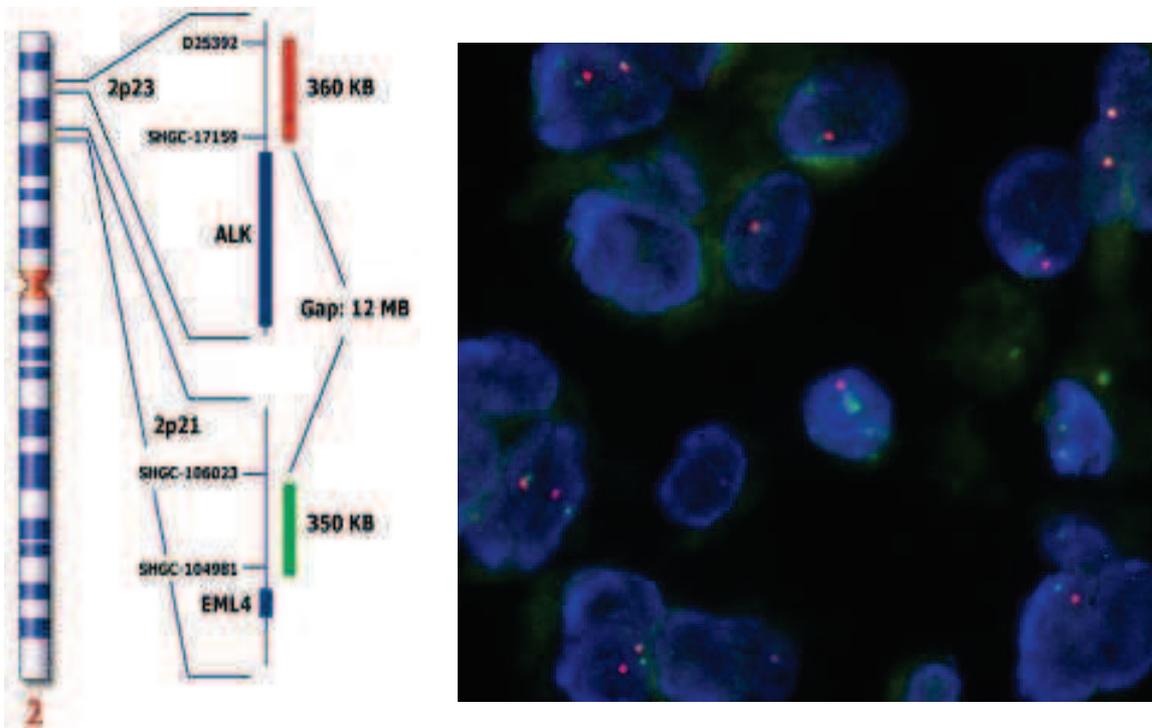


Localisation des fluorochromes de la sonde Abbott® sur le gène *ALK* (chromosome 2).

3.3. Sonde de fusion Poseidon (Kreatech®)

Les cas présentant un remaniement *ALK* ont également été testés avec une sonde de fusion. La particularité de cette sonde est qu'elle détecte spécifiquement les translocations entre *ALK* et *EML4* contrairement à la sonde Vysis® qui ne témoigne que des remaniements de *ALK* sans que l'on puisse identifier le gène partenaire.

La lecture est très simple un fluorochrome rouge est en aval du point de cassure de *ALK* et un fluorochrome vert est en amont du point de cassure de *EML4*. Ainsi dans une tumeur ne présentant pas de remaniement les spots rouges et verts seront distants l'un de l'autre alors qu'ils seront fusionnés deux à deux (aspect d'un seul spot jaune quand ils sont très proches) en cas d'inversion.



Localisation des fluorochromes de la sonde Kreatech® sur les gènes *ALK* et *EML4* (chromosome 2).

4. Analyse par immunohistochimie

- Anticorps anti ALK (Abcam®)

Cet anticorps a été testé sur 130 cas en prospectif. Il s'agit d'un anticorps monoclonal de souris, isotype IgG1, clone 5A4 (Abcam®), dilution 1/50. En cas de positivité le marquage est cytoplasmique et parfois membranaire.

- Anticorps anti P63 (Ventana®)

Cet anticorps a été testé sur 9 cas positifs et 9 cas négatifs (test par FISH). Il s'agit d'un anticorps monoclonal de souris, clone 4" 4. En cas de positivité le marquage est nucléaire.

- Anticorps anti ALK (DAKO®)

Cet anticorps a également été testé sur les 9 cas positifs. Il s'agit d'un anticorps monoclonal de souris, clone ALK1, isotype IgG3, kappa, dilution 1/30. En cas de positivité, le marquage est cytoplasmique.

RESULTATS

1. Résultats par FISH (sonde Abbott®)

Deux cent cinquante-quatre cas ont été adressés correspondant à 65% d'hommes (166 cas) et 35% de femmes (88 cas). La moyenne d'âge des patients est de 63 ans (figures 8 et 9).

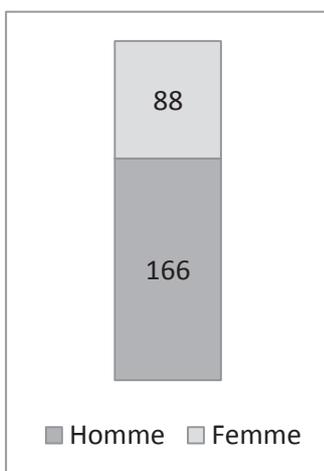


Figure 8 : Répartition homme- femme

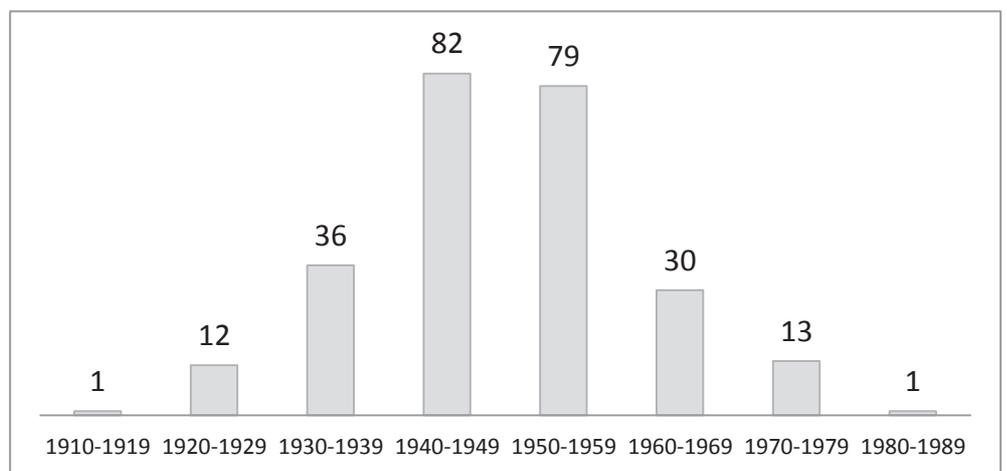


Figure 9 : Répartition des différentes tranches d'âge

Deux cent seize cas ont pu être testés par FISH : 207 cas négatifs (96% des cas testés) par technique de FISH et 9 cas positifs (4,3% des cas testés) (figure 11). Le taux de cellules tumorales variait entre 20% et 90% avec une moyenne à 54%.

La moyenne d'âge des cas " LK+ est de 61 ans parmi lesquels on compte 6 hommes et 3 femmes.

Trente-huit cas (15% de l'échantillon total) n'ont pu être correctement techniqués : pour 24 cas (9%), le matériel était insuffisant (<50 cellules tumorales) et pour 14 cas (6%) la technique d'hybridation a échoué (figure 10).

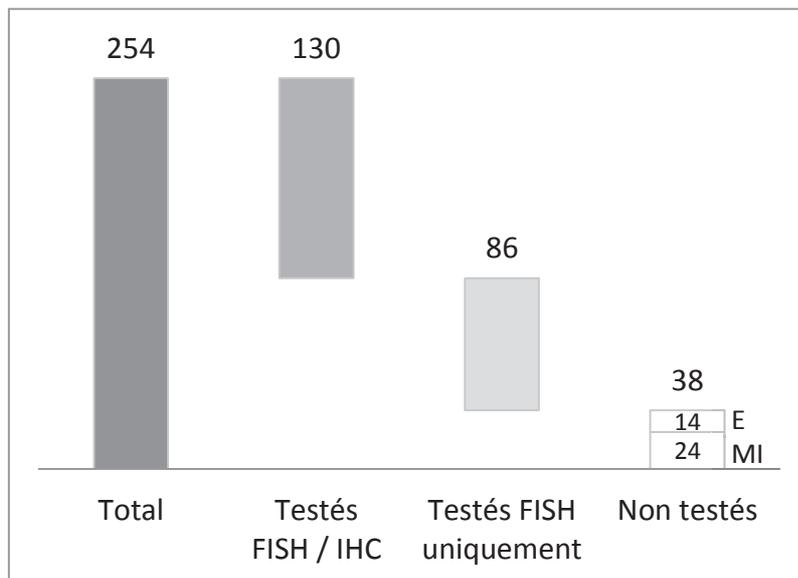


Figure 10: Nombre de cas testés par FISH et/ou IHC et nombre d'échec par FISH (E) et nombre non testé par manque de matériel (MI).

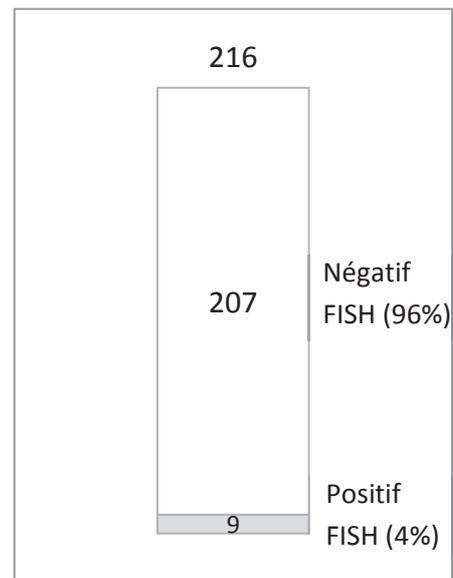


Figure 11: Nombre de cas négatif et positif par FISH

2. Résultats par sonde FISH Kreatech®

Parmi les 9 cas positifs testés par la sonde break apart d'Abbott®, 8 ont également été testés avec la sonde de fusion de Kreatech® (pour 1 cas le matériel était épuisé). A ce jour le seuil de positivité de cette sonde (% de spots fusionnés) n'a pas été défini dans la littérature.

Pour 7 cas nous avons observé de rares spots de fusion (en moyenne moins de 15% de spots fusionnés). Pour 1 cas nous n'avons pas détecté de spots fusionnés.

3. Résultats de l'immunohistochimie (IHC)

3.1. Anticorps ALK clone 5A4 (Abcam®)

Cent trente cas ont été testés avec cet anticorps : 123 cas (95%) se sont avérés négatifs et 7 cas (5%) positifs. Le marquage était intracytoplasmique d'intensité modérée pour 6 cas et plus intense pour 1 cas.

Les 121 cas négatifs en FISH l'étaient également en IHC, en revanche, parmi les 9 cas positifs en FISH, 2 ne l'étaient pas en IHC (figure12).

FISH \ IHC	N	P	Total
N	121	-	121
P	2	7	9
Total	123	7	130

Figure 12 : Sur les 130 cas testés en FISH et en IHC : présence de 2 cas discordants (en rouge).

3.2. Anticorps ALK clone ALK1 (DAKO®)

Les 9 cas positifs en FISH ont été testés avec cet anticorps. Les résultats se sont avérés sensiblement similaires à ceux du clone ALK 5A4, en effet les 7 cas positifs avec le clone 5A4 le sont également avec le clone ALK1 et les 2 cas négatifs avec le clone 5A4 le sont avec le clone ALK1.

La différence entre les 2 anticorps réside essentiellement dans l'intensité du marquage cytoplasmique, ce dernier étant discrètement plus intense avec le clone 5A4 (figure 13).

IHC	0+	1+	2+	3+	Total
ALK 5A4	2	0	6	1	9
ALK1	2	2	4	1	9

Figure 13 : Comparaison de l'intensité de marquage des clones 5A4 et clones 1

3.3. Anticorps anti-p63

Les 9 cas positifs testés en FISH ont été testés avec l'anticorps anti-p63 ; en parallèle 9 cas négatifs en FISH ont également été testés.

Parmi les 9 cas *ALK+*, 3 cas se sont avérés positifs dont 2 avec un marquage focal et au sein des 9 témoins négatifs 5 se sont révélés positifs dont 3 avec un marquage intense (cf figure 14).

Anticorps P63	Positif	Négatif	Total
Cas <i>ALK+</i>	3 (dont 2 avec un marquage focal)	6	9
Témoins négatifs	5 (dont 2 avec un marquage focal)	4	9

Figure 14 : comparaison de l'anticorps anti p63 entre des adénocarcinomes " *LK+* et des adénocarcinomes *ALK-*

3.4. Sous-types histologiques des cas présentant un remaniement du gène *ALK* avec la FISH

Parmi les 9 cas positifs, 4 cas sont des pièces opératoires pulmonaires et 1 cas est une biopsie bronchique. Les 4 pièces opératoires correspondent à 3 adénocarcinomes tubulo-papillaires (dont 2 mucineux) et 1 adénocarcinome acineux. La biopsie bronchique est de petite taille et écrasé mais on identifie un contingent plutôt acineux.

Les 4 autres cas sont des métastases (2 métastases cérébrales, 1 métastase pleurale et 1 métastase médiastinale) pour lesquelles la lésion primitive n'a pas été biopsiée ou opérée. La métastase pleurale montre un adénocarcinome acineux tandis que les 3 autres sites métastatiques sont infiltrés par un adénocarcinome peu différencié (cf figure 15).

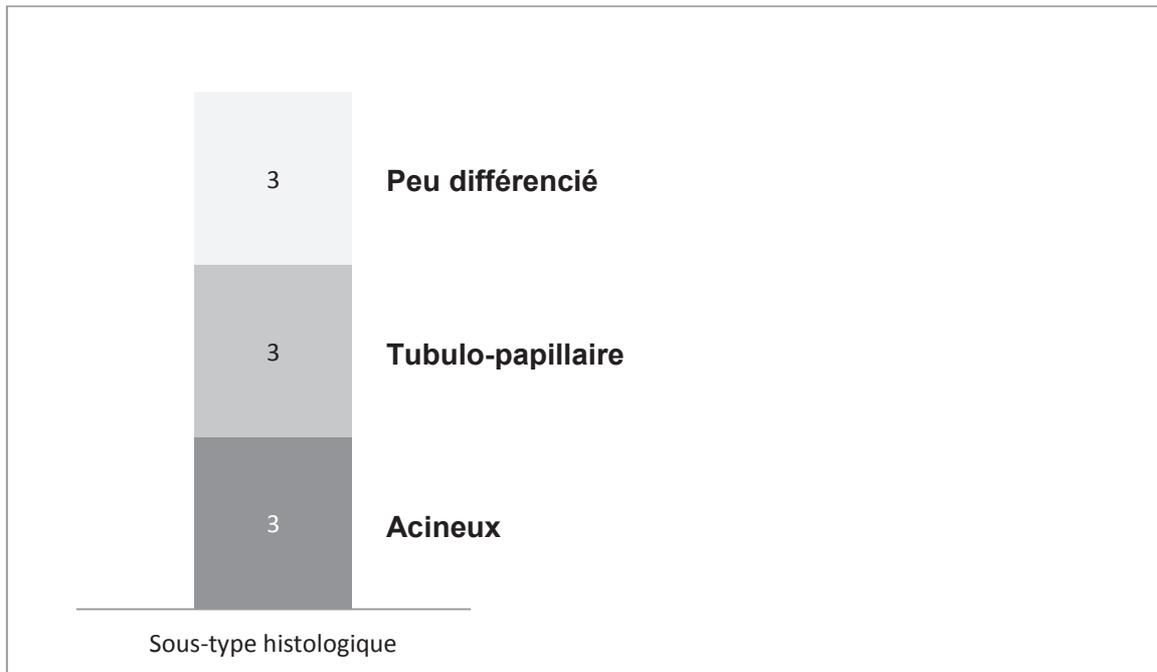
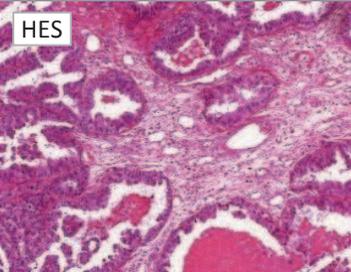
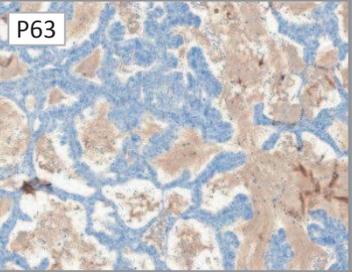
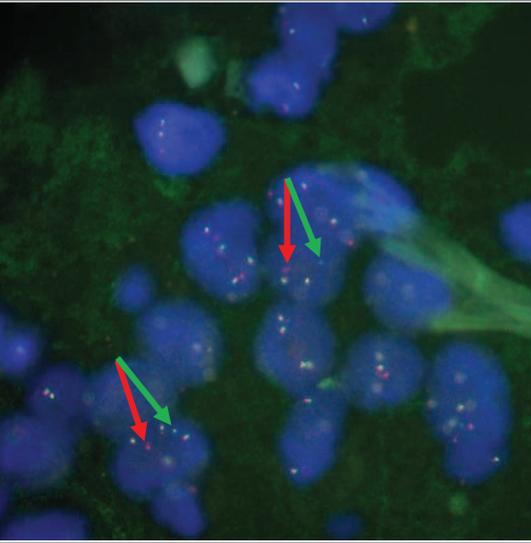
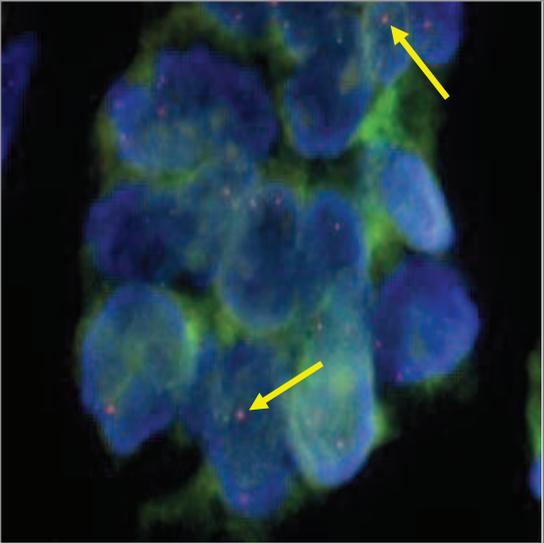
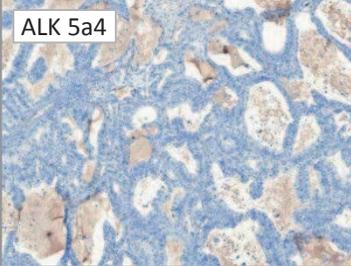
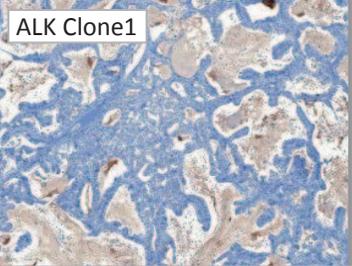
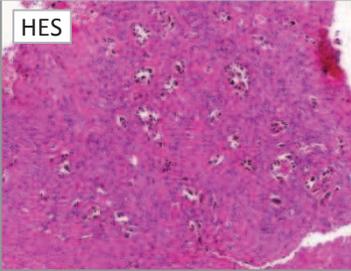
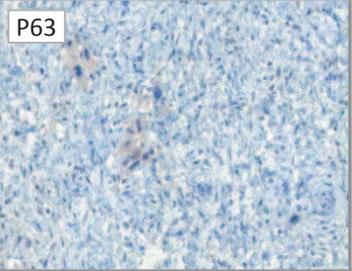
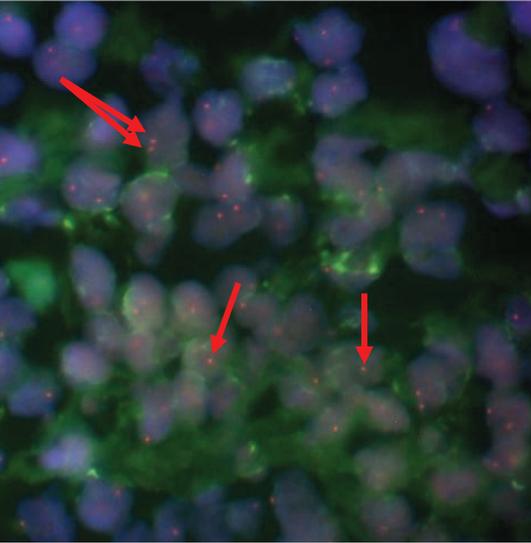
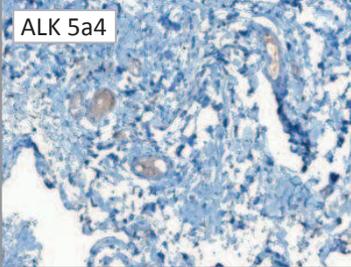


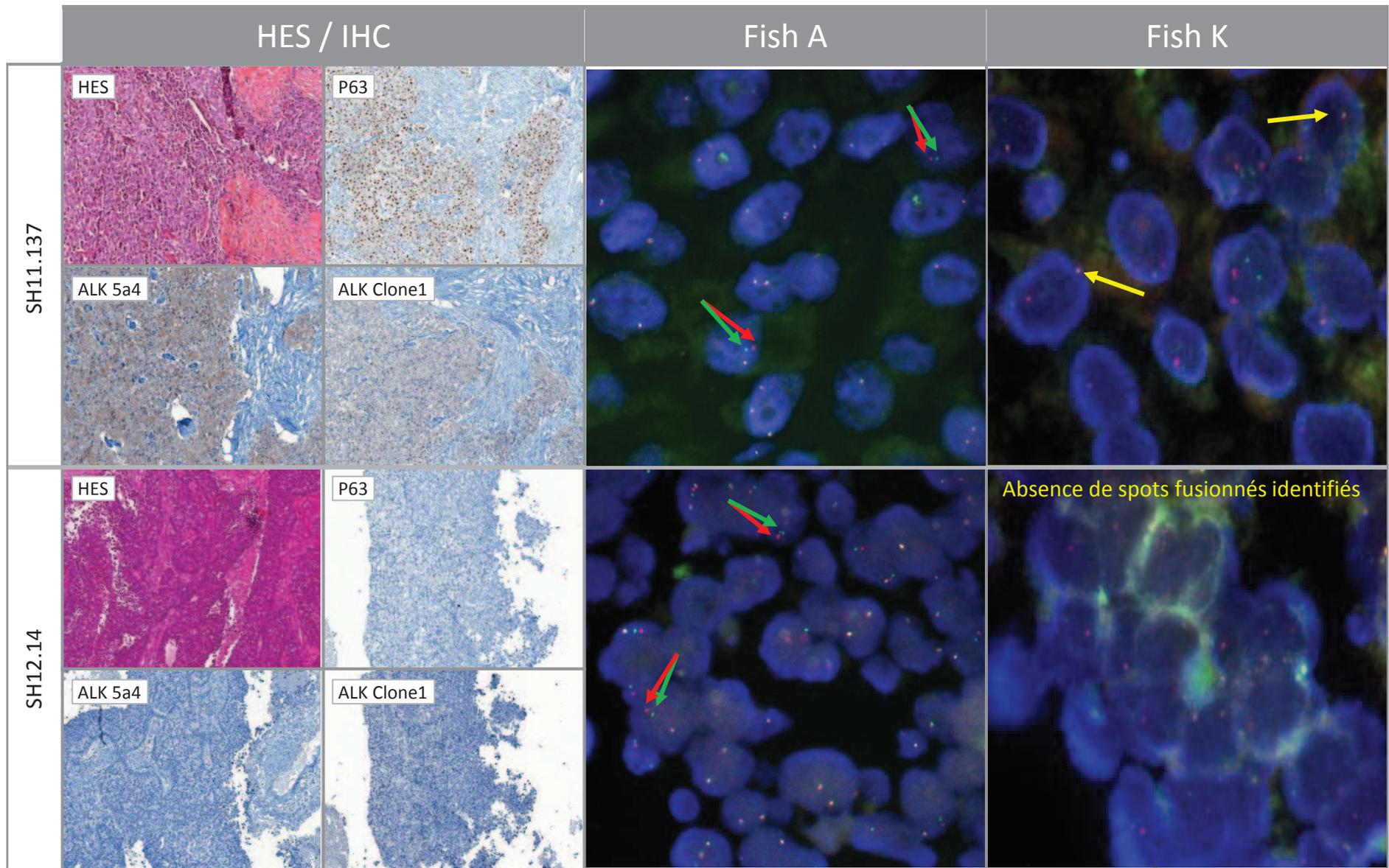
Figure 15 : répartition des sous-types histologiques des 9 cas d'adénocarcinomes *ALK+*

	HES / IHC		Fish A	Fish K
SH11.73				
				
SH11.95				<i>Non disponible</i>
		<i>Non disponible</i>		



 Sonde Abbott avec spots séparés :
 présence d'un remaniement ALK

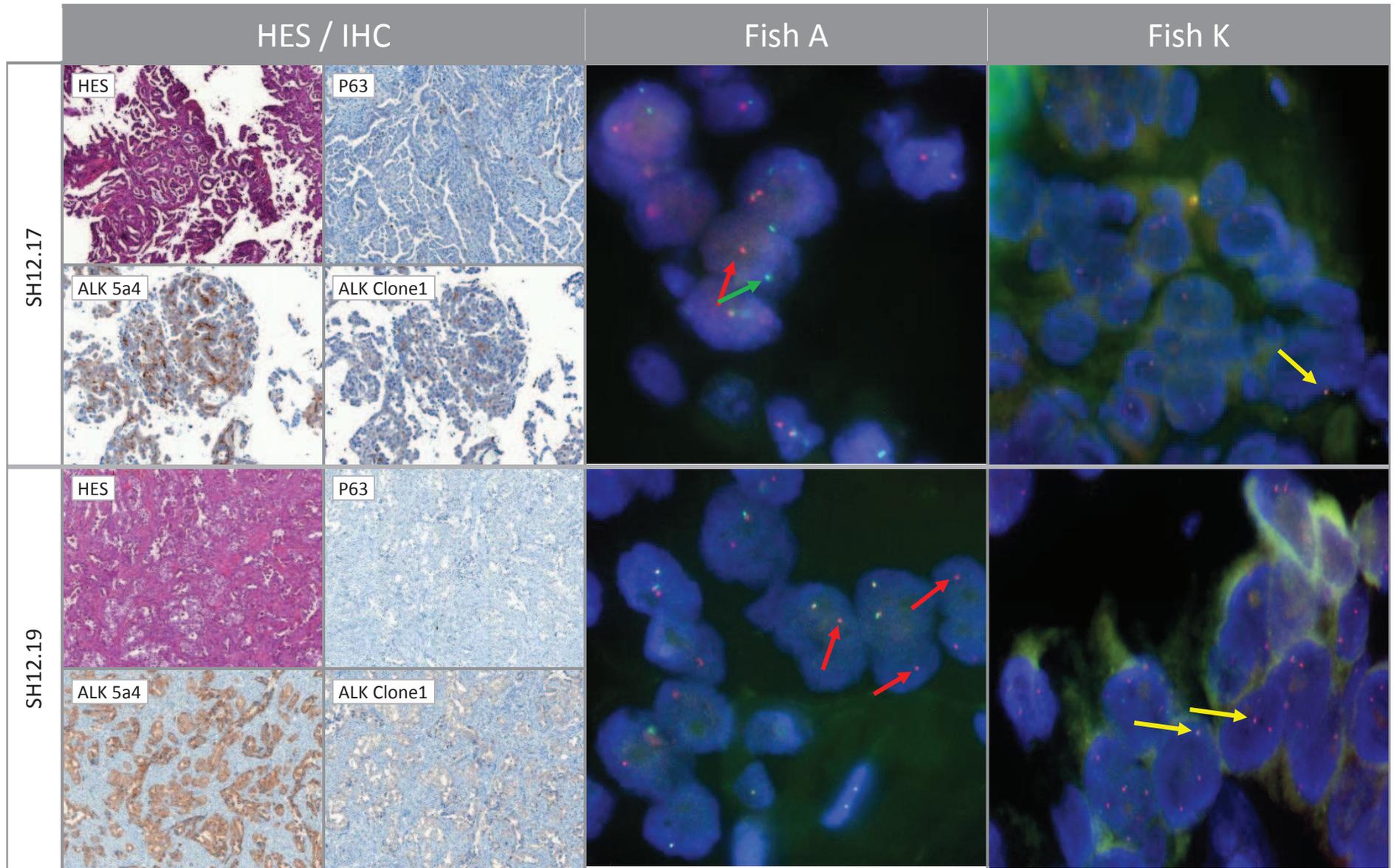

 Sonde Kreatech avec spots fusionnés :
 présence d'un remaniement EML4-ALK





 Sonde Abbott avec spots séparés :
 présence d'un remaniement ALK

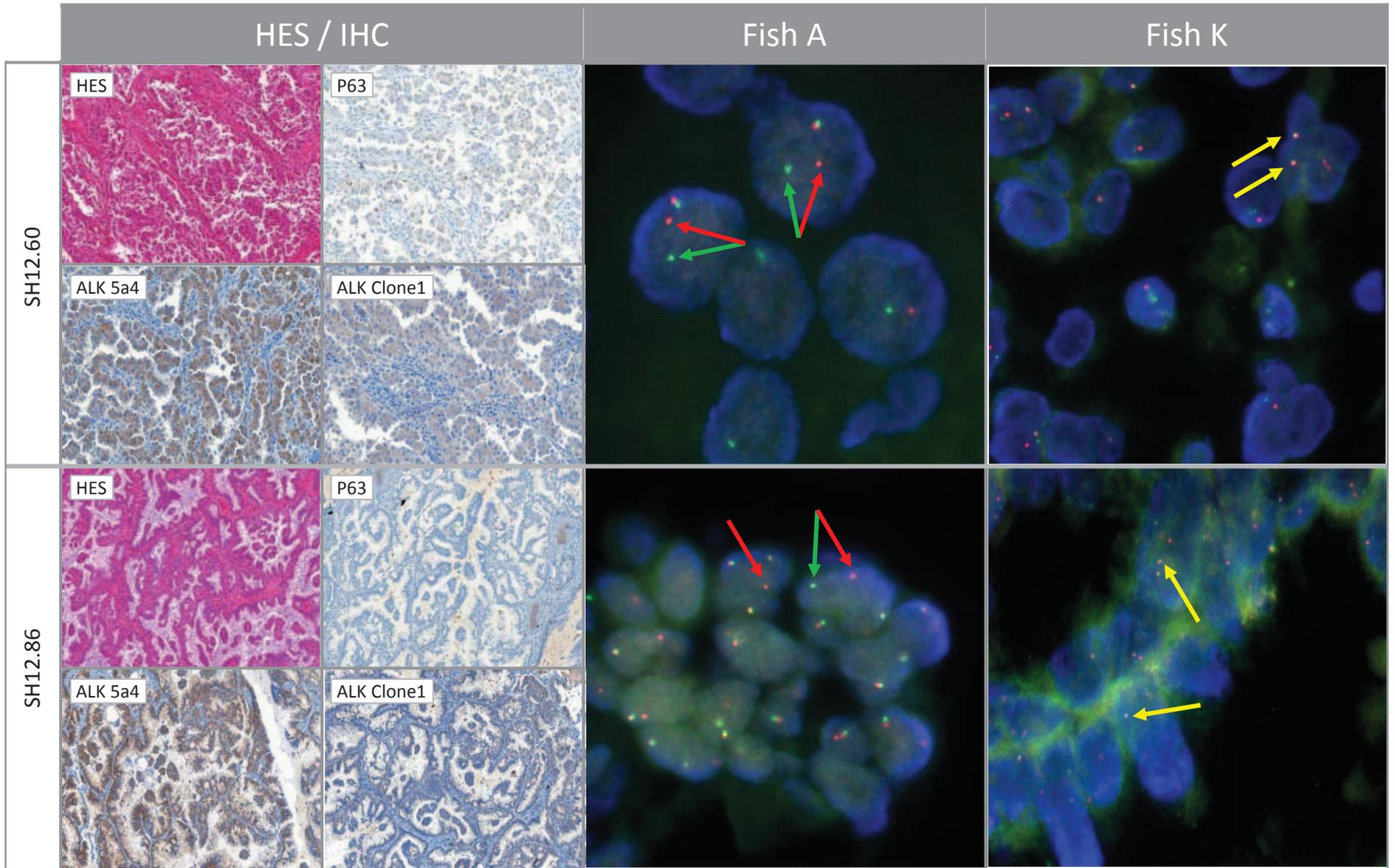

 Sonde Kreatech avec spots fusionnés :
 présence d'un remaniement EML4-ALK





 } Sonde Abbott avec spots séparés :
 présence d'un remaniement ALK

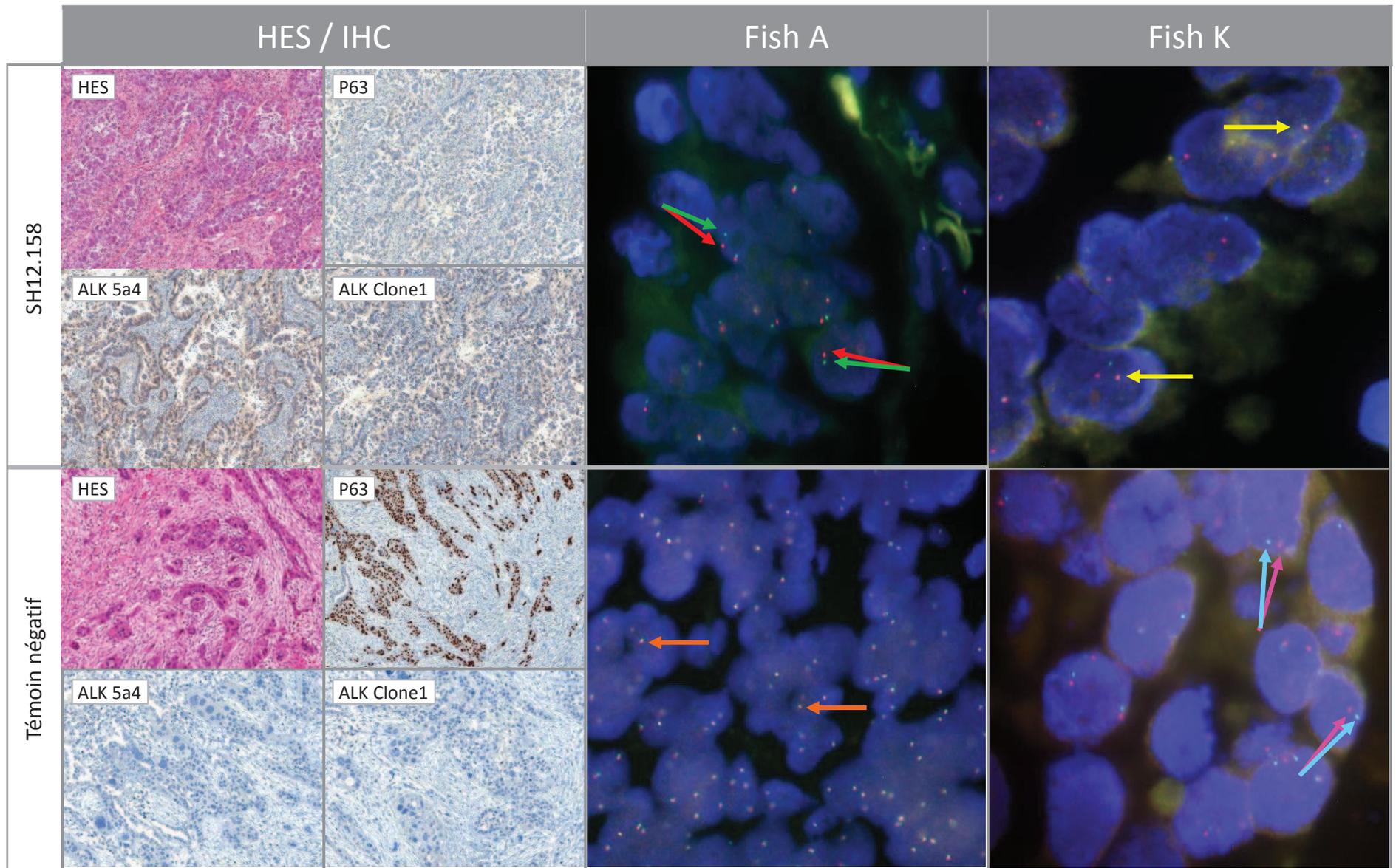

 Sonde Kreatech avec spots fusionnés :
 présence d'un remaniement EML4-ALK





 Sonde Abbott avec spots séparés :
 présence d'un remaniement ALK


 Sonde Kreatech avec spots fusionnés :
 présence d'un remaniement EML4-ALK



→ } Sonde Abbott avec spots séparés : présence d'un remaniement ALK
 → } Sonde Abbott avec spots fusionnés : absence de remaniement ALK
 → } Sonde Kreatech avec spots séparés : absence de remaniement EML4-ALK
 → } Sonde Kreatech avec spots fusionnés : présence d'un remaniement EML4-ALK

DISCUSSION

1. Evaluation de la FISH Abbott®

1.1. Taux de FISH non contributives

La FISH est actuellement la technique "gold standard" (de référence) pour la recherche de remaniement du gène *ALK* dans le cancer du poumon. Nous avons réalisé cette technique sur 254 prélèvements (63 pièces opératoires et 191 biopsies) ; pour 14 cas (6%) l'hybridation a échoué et pour 24 cas (9%) le matériel tumoral était insuffisant. Au total, dans 15% des cas nous n'avons pu répondre. Ce taux est inférieur à ceux mentionnés dans la littérature où ce taux d'échec avoisine les 20%.

Les quantités insuffisantes de matériels sont un problème récurrent en anatomopathologie, ce problème est d'autant plus fréquent qu'entre la nécessité d'établir un diagnostic et la multiplication des techniques de biologie moléculaire, le matériel tissulaire biopsié s'épuise rapidement. Bien évidemment cette contrainte disparaît sur les pièces opératoires mais un grand nombre de patients ne bénéficient pas de traitement chirurgical. Il est donc essentiel d'économiser le matériel mis à notre disposition.

L'échec de l'hybridation peut s'observer dans des cas de fixation inappropriée ou de décalcification. Si pour la seconde cause le pathologiste est impuissant, pour la première il suffit de respecter des règles simples de fixation (utiliser du formol tamponné, fixer les biopsies entre 12h et 24h et prélever les pièces 48h après les avoir injectées).

En cas d'échec, le renouvellement de la technique n'est pas recommandé puisque le taux de succès est très faible pour un deuxième essai.

1.2. Lecture de la FISH

" ce jour il n'existe aucun protocole de lecture pour interpréter la FISH. La distance minimale pour considérer 2 spots séparés n'est pas établie, pour certains un écart de 2 spots est nécessaire alors que pour d'autres équipes une distance d'un spot est

suffisante. De même, il n'existe pas de seuil de positivité validée. Pour que la lecture soit reproductible d'un service à l'autre, il sera indispensable à l'avenir de mettre en place des guidelines de lecture.

Actuellement au CHU de Rouen, nous utilisons la méthode d'interprétation du CHU de Grenoble qui a une grande expérience des lectures de remaniement de *ALK* par FISH (distance d'un spot pour la séparation et seuil de positivité >15% de cellules tumorales).

1.3. Résultats des cas de FISH interprétables

Dans cette série de 216 cas interprétables, 4,3% des adénocarcinomes pulmonaires (métastase ou primitif) présentent un remaniement du gène *ALK*. Ce chiffre est comparable aux taux rapportés dans la littérature qui oscillent entre 3,5 et 7%.

Pour les 9 cas positifs, nous avons 3 adénocarcinomes acineux, 3 adénocarcinomes tubulopapillaires et 3 adénocarcinomes peu différenciés. Pour certaines équipes, les deux premiers sous types histologiques sont plus fréquents dans les adénocarcinomes pulmonaires remaniés pour *ALK*. Selon la littérature, les CPNPC classés comme papillaire ne devraient représenter que 3,8% des adénocarcinomes. Ce taux élevé (3 cas soit 33,3%) d'adénocarcinomes tubulopapillaires observé dans notre série est donc en accord avec la littérature. Ces chiffres sont à interpréter prudemment, en effet, en raison du faible échantillon de cas positifs dans notre étude, les résultats ne sont pas significatifs.

1.4. Comparaison entre la sonde de split d'Abbott® et la sonde de fusion de Kreatech®

La sonde Abbott® met en évidence les remaniements de *ALK* sans donner d'information sur le gène partenaire ; la sonde Kreatech®, quant à elle, permet d'identifier spécifiquement la fusion entre *ALK* et *EML4*.

Le point de cassure de *ALK* est invariablement le même, indépendamment du gène partenaire. En dehors du gène *EML4*, seuls les gènes partenaires *KIF5B*, *TGF* et *KLC1* ont été décrits comme étant impliqués dans le CPNPC (4 cas rapportés). A ce jour, l'identification du gène partenaire ne change pas la prise en charge

thérapeutique puisque la cible du crizotinib est en aval du point de cassure de *ALK* (site tyrosine kinase de *ALK*) et n'est pas localisé sur le gène partenaire.

Tout comme pour la sonde Abbott®, il n'existe aucun guide d'interprétation pour la sonde Kreatech®. Mais contrairement à la sonde de split, la sonde de fusion est peu utilisée par les équipes d'anatomopathologie, peu de retour d'expérience sont donc disponibles.

En ce qui concerne notre expérience à Rouen, la lecture des FISH par sonde de fusion est biaisée puisqu'elle a été testée principalement sur les cas positifs avec la sonde de split. La lecture s'est avérée difficile puisqu'en moyenne, à l'exception d'un cas pour lequel nous n'avons pas trouvé de spots fusionnés, le pourcentage de spots fusionné était inférieur à 15%. Le temps de lecture a également été plus long, et ce, malgré la connaissance du résultat final, les spots fusionnés étaient non seulement plus difficiles à trouver car plus rares mais ils étaient également moins intenses.

2. Immunohistochimie

2.1. ALK clone 5A4 (Abcam®)

Selon la littérature cet anticorps a une sensibilité de 100% et une spécificité de 95% pour détecter les protéines de fusion de *ALK*.

L'équipe du Pr Lantuejoul a testé cet anticorps sur 21 cas remaniés pour *ALK* qui se sont tous révélés positifs, en parallèle 60 cas négatifs ont été testés avec un unique cas positif (71).

De même, dans l'étude de *Paik*, les 28 cas *ALK+* étaient positifs en IHC et au sein de leur série de 735 cas, 27 cas étaient faussement positifs en IHC (78). Dans une autre étude de *Yi* rapportant 12 CPNPC *ALK+*, l'IHC était positive sur chacun des cas (79, 80).

Dans ces trois études aucun faux négatif n'a été constaté ce qui fait de l'IHC une technique de détection fiable pouvant être corrigée par la FISH en cas de faux positif. Pour nos cas le marquage était cytoplasmique d'intensité modérée pour 6 cas, fortement positif pour 1 cas et négatif pour 2 cas (cf figure 14). La lecture n'a pas posé de difficulté mais elle était en partie biaisée par la lecture de la FISH au préalable.

2.2. ALK clone 1 (Dako®)

Cet anticorps est utilisé classiquement pour le diagnostic des lymphomes anaplasiques pour mettre en évidence la protéine chimérique NPM-ALK.

Il est considéré par certains comme inadapté pour la détection des remaniements du gène *ALK* dans le cancer du poumon puisque sa sensibilité est de 67% et sa spécificité de 97%. L'une des explications serait que la synthèse des protéines de fusion de *ALK* dans le poumon serait plus faible que celles des lymphomes anaplasiques et que le seuil de détection de l'anticorps " LK clone 1 ne serait pas suffisamment sensible (74).

Nous avons testé cet anticorps sur nos 9 cas positifs ainsi que sur 9 cas négatifs en FISH et les résultats ont été similaires aux immunomarquages effectués avec le clone 5A4.

Nous avons néanmoins remarqué que l'intensité du signal avec le clone 5A4 était légèrement plus forte que celle du clone 1 pour 2 cas, si nous avons classé nos marquages selon les scores d'intensité proposés la répartition aurait été différente pour les deux anticorps (cf figure16).

Cas	Sh11.73	Sh11.95	Sh11.137	Sh12.14	Sh12.17	Sh12.19	Sh12.60	Sh12 .86	Sh12.110
intensité clone 5A4	-	++	++	-	+++	+++	++	++	++
intensité clone1	-		++	-	++	++	+	+	++

Figure 16: Répartition des cas testés en IHC (clone 5" 4 et clone 1) en fonction de l'intensité du marquage

3. Discordance entre la FISH et l'IHC

Dans cette étude nous avons 2 cas discordants entre la FISH et l'IHC, ces cas concernent deux cas positifs en FISH et négatifs en IHC. Nous n'avons eu aucune discordance entre ces 2 techniques pour les 207 cas négatifs. En prenant la FISH comme gold standard la spécificité de l'IHC est de 100%.

3.1. Comment expliquer ces deux cas discordants ?

○ Cas SH12.14

Pour ce cas, le pourcentage de spots séparés était élevé (entre 60 et 70%) et malgré ce taux élevé, l'IHC s'est révélée négative aussi bien pour le clone 5A4 que pour le clone 1. Nous avons testé une dilution plus faible (1/10) pour le clone 5A4 qui est resté négatif, puis nous avons adressé ce cas au service du Pr Galateau (CHU de Caen), qui a également une forte expérience de la lecture par FISH. Son équipe a testé l'anticorps ALK 5A4 ainsi que la FISH par sonde de split ALK et les résultats ont été semblables à ceux que nous avons observés.

Au vu de ces premiers résultats, il semblerait que ce cas présente bien un remaniement de *ALK* mais que la protéine chimérique n'est pas été détectée. Nous pouvons supposer que :

- soit la transcription de ce remaniement n'a abouti à aucune protéine
- soit que la protéine de fusion synthétisée ne présente pas d'épitope pour les anticorps ALK clone 5A4 et clone 1.

" fin d'éliminer formellement une inversion *EML4-ALK* nous avons demandé une recherche par RT-PCR des différents variants *EML4-ALK* et aucun d'entre eux n'a été détectés. Par ailleurs, La sonde Kreatech® qui a été testée sur ce cas n'a pas mis en évidence de spots fusionnés en faveur d'un remaniement spécifique *EML4-ALK*.

A ce jour, seuls ont été décrits une douzaine de protéines de fusion de *ALK* qui en grande majorité ont pour gène partenaire *EML4*.

A ce jour, 3 autres gènes partenaires ont été identifiés : 1 cas avec le gène *TGF* (dans son étude en 2007, *Rikova K.* avait 6 cas remaniés pour *ALK* sur 137 CPNPC dont 5 cas avec le gène *EML4* et 1 cas avec *TGF*), 2 cas avec le gène *KIF5B* (*Wong D.* a détecté 1 cas sur 266 CPNPC en 2011 et *Takeuchi K.* 1 cas sur 130 en 2009) et 1 cas avec le gène *KLC1* (*Togashi* a identifié 1 cas positif en RT-PCR, en FISH et en IHC).

Nous avons donc supposé que notre cas pouvait avoir pour gène partenaire *TGF, KIF5B* ou *KLC1*. Selon la littérature l'anticorps " LK clone 5A4 serait en mesure de détecter les protéines de fusion *KIF5B-ALK* et *KLC1-ALK* , quant au cas remanié avec le gène *TGF* la détection avait été faite par FISH et RT-PCR mais pas par IHC.

" u final nous pouvons supposer que notre cas est le siège d'un remaniement *ALK* avec :

- le gène *TGF*, étant donné que nous ne savons pas si l'IHC avec le clone 5" 4 est positive ou négative
- un nouveau variant de *EML4*, *KIF5B* ou *KLC1* qui ne synthétise pas de protéine de fusion ou dont la protéine ne possède pas d'épitope pour le clone 5A4
- un nouveau gène partenaire non identifié à ce jour

Malheureusement, ce patient est décédé 10 jours après l'introduction du crizotinib.

- **Cas SH11.73**

Pour ce cas, les hypothèses évoquées précédemment sont valables mais contrairement au cas SH12.14, le pourcentage de spots séparés est légèrement au-dessus du seuil de positivité (entre 15 et 20% sur les deux tests effectués).

Nous n'avons pas adressé ce cas à un autre service pour une relecture, nous devons donc évoquer une hypothèse supplémentaire importante qui est celle d'un faux positif en FISH. Se pose alors la question du seuil, est-il trop bas ? A partir de quelle distance pouvons-nous considérer deux spots séparés ? Faut-il adresser systématiquement les cas positifs à un autre service pour un contrôle ?

En ce qui concerne le seuil de positivité, pour tous nos autres cas positifs nous avons au moins 40% de cellules tumorales siège d'un remaniement *ALK*. Est-ce que par exemple un seuil de 30% serait suffisant ?

Dans l'étude de *McLeer* sur les 19 cas présentant un remaniement *ALK*, 18 cas avaient un pourcentage de spots splités de 75% en moyenne et un cas avait un seuil à 12% puis à 22% après réalisation d'un second test (71). Dans la série de *Camidge* qui regroupait 90 cas *ALK+*, le taux de cellules remaniées variaient entre 18% et 100% avec une moyenne 56% (60). Au vu de ces données, ce seuil de 20% semble justifié.

Pour ce qui est de la distance minimale entre un spot rouge et un vert suffisante pour les considérer comme séparés, il est difficile de donner une réponse. La majorité des études prennent comme seuil une distance de 2 spots mais très récemment (février 2012) l'équipe de *Brambilla*, au décours d'une conférence sur la lecture de la FISH de split *ALK*, a rapporté qu'une distance d'un spot était suffisante.

Dans notre expérience, une vision de l'ensemble de la lame est d'une grande aide, en effet la présence d'un pourcentage important de spots séparés par une faible distance (un diamètre de spot) est un argument fort pour diagnostiquer un remaniement du gène *ALK*, tandis que cette même distance avec un pourcentage situé entre 15 et 20% ne nous suffira pas pour en faire un cas positif. Fort heureusement, ces cas ne sont pas fréquents et la combinaison avec l'IHC peut nous aider à trancher.

L'envoi systématique des cas positifs à un autre centre de référence n'est pas indispensable surtout si le taux de cellules mutées est élevé et nous disposons désormais de 2 techniques permettant de détecter les remaniements de *ALK*. Si la spécificité et la sensibilité de la FISH et de l'IHC ne sont pas de 100%, la combinaison des deux permet de s'en rapprocher. Néanmoins, il paraît important de proposer une relecture par une autre équipe pour les cas discordants en FISH et en IHC.

4. La p63 est-elle une aide au diagnostic de remaniement ALK ?

Selon certains auteurs, les CPNPC remaniés pour le gène *ALK* (CPNPC/*ALK*+) seraient plus fréquemment positif pour l'anticorps anti-p63 (72% versus 28%) qui est classiquement utilisé pour diagnostiquer les carcinomes épidermoïdes et non les adénocarcinomes (69, 81, 82). Cette particularité immunohistochimique pourrait donc être un facteur discriminant supplémentaire dans le diagnostic des remaniements de *ALK*. Dans cette étude, sur nos 9 cas remaniés pour *ALK*, nous avons 3 cas positifs pour cet anticorps (2 cas avec un marquage discret à modéré et 1 cas fortement positif), parallèlement nous avons testé la p63 sur 9 adénocarcinomes non remaniés et 5 se sont révélés positifs (2 cas avec un marquage discret à modéré et 3 cas fortement positifs).

Pour nos 3 cas p63+/" LK+, l'anticorps anti-TTF1 est positif (cf figure 17).

En 2012, deux équipes (une anglaise et une américaine) ont testé la p63 sur respectivement 27 et 197 adénocarcinomes pulmonaires, elles ont chacune observé une positivité dans environ 15% des cas (82, 83).

Dans notre étude, non seulement nous ne trouvons pas les chiffres rapportés dans la littérature mais en plus nos résultats sont contraires aux hypothèses émises pour le

profil immunohistochimique des CPNPC/ALK+. Néanmoins, nos résultats ne sont pas représentatifs compte-tenu de notre faible échantillon de patients mutés. Récemment une étude nationale a débutée pour caractériser les CPNC/ALK+ avec notamment la réalisation de l'anticorps anti-p63.

cas	Sh11.73	Sh11.95	Sh11.137	Sh12.14	Sh12.17	Sh12.19	Sh12.60	Sh12 .86	Sh12.110
P63	-	+	+	-	-	-	+	-	-
TTF1	-	+	+	+	+	+	+	+	+

Figure 17 : Profil immunohistochimique des cas ALK+ pour la P63 et le TTF1.

5. Quel test pour détecter les CPNPC/ALK+, FISH ou IHC ?

5.1. Avantage de la FISH sur l'IHC

- **Meilleures sensibilité et spécificité**

La FISH est le gold standard dans la détection des remaniements du gène *ALK*, sa sensibilité et sa spécificité (considérée proche de 100% pour chacune) sont ses principaux points forts. Mais si les sensibilité et spécificité du clone 5A4 sont plus faibles, elles rivalisent néanmoins avec la FISH (respectivement 100% et 95% selon la littérature et 78-88% et 100% selon notre étude).

La FISH cible directement l'ADN contrairement à l'IHC, elle peut donc mettre en évidence un très grand nombre de remaniement *ALK* (d'autant plus que le point de cassure ne varie pas) et ce, quel que soit le gène partenaire.

5.2. " avantages de l'IHC sur la FISH

- **Taux d'échec plus faible**

La sensibilité et la spécificité du clone 5A4 sont moins élevées que pour la FISH mais le taux d'échec de l'IHC est moins important, dans notre étude nous avons eu peu d'échecs (2 biopsies osseuses décalcifiées soit 1,5% des cas) contrairement à la FISH (6% des cas) qui nécessite un respect plus strict des conditions de fixation.

- **Facilité de lecture**

La lecture par FISH nécessite un microscope à lampe à UV placé dans une pièce sombre et équipé d'un filtre adapté (double filtre rouge/vert), ce matériel est coûteux ce qui limite la mise en place de la FISH en ville ou dans de petit service hospitalier. Pour une bonne interprétation, une identification au préalable de la zone tumorale sur la lame HES est indispensable. Cette pré-lecture est une aide précieuse pour se repérer sur le prélèvement (en particulier sur les biopsies), en effet, en immunofluorescence, il est difficile de distinguer les cellules normales des cellules tumorales.

Le temps de lecture est très aléatoire, il peut prendre entre 5 minutes et 20 minutes par cas, il varie en fonction de l'intensité des spots, du bruit de fond ou de la surface de la lame à lire, en moyenne pour une dizaine de cas, ce temps est estimé à 1h30.

Une lame d'IHC est moins contraignante à lire, elle peut se lire avec un microscope à fond clair (classique) simultanément à l'HES ce qui permet de repérer la zone tumorale.

Le temps de lecture est plus court (une minute en moyenne), il faut cependant préciser que notre lecture a été biaisée par les résultats de la FISH lue au préalable. De plus, nous n'avons pas eu de marquage peu intense (1+) qui aurait pu, par erreur, être interprété comme un faux négatif.

- **Un coût plus faible**

- Coût en IHC :

- 1ml d'anticorps anti " LK clone 5" 4, dilué à 1/30, permet de réaliser 250 tests et coûte 400 euros TTC

- le kit de détection coûte 1250 euros TTC et permet d'effectuer 250 tests
- une lame coûte 0,2 euros TTC
- le temps technicien est difficile à apprécier mais le temps de coupe qui est le même en IHC et en FISH ne sera pas pris en compte

En moyenne (hors coût technicien), une lame d'IHC marquée par le clone 5A4 de ALK coûte environ 7 euros

➤ Coût en FISH

- le kit de sonde permettant de faire 18 cas coûte 1230 euros TTC
- le kit de prétraitement permettant de faire 45 cas coûte 432 euros TTC
- 5 témoins négatifs et 5 témoins positifs coûteraient 840 euros TTC (mais nous utilisons nos propres témoins)
- une lame coûte 5 euros TTC
- le temps technicien pour 10 cas est d'environ 4 heures

En moyenne (hors coût technicien), une lame de FISH réalisée avec la sonde break apart Abbott® ALK coûte environ 70 euros

Au final :

- l'IHC rassemble un grand nombre d'avantages tant au niveau du temps de lecture, du taux d'échec ou encore du coût. L'interprétation semble plus simple mais la proposition d'un score d'intensité, à l'instar d'HER2 pourrait la rendre plus délicate.
- la sensibilité dans notre étude est de 78% ou 88% (selon la véritable positivité du cas sh11.73) et la spécificité de 100%. Notre sensibilité est plus faible que celle rapportée dans la littérature mais il faut prendre en considération la petite taille de notre effectif et surtout la présence d'un cas très rare, avéré positif en FISH et négatif en IHC.

CONCLUSION

En 2012, *ALK* est devenu un biomarqueur prédictif incontournable dans la prise en charge des patients atteints d'un cancer bronchopulmonaire. En effet, la présence d'un réarrangement EML4-*ALK* est un facteur prédictif de réponse au crizotinib. La détection d'un réarrangement du gène *ALK* est donc une étape clé qui doit être sensible, reproductible, rapide et peu coûteuse.

Depuis 2011, la recherche d'un remaniement de *ALK* est réalisée systématiquement dans de nombreuses plateformes hospitalières pour tous les adénocarcinomes pulmonaires de phénotype EGFR et KRAS sauvages.

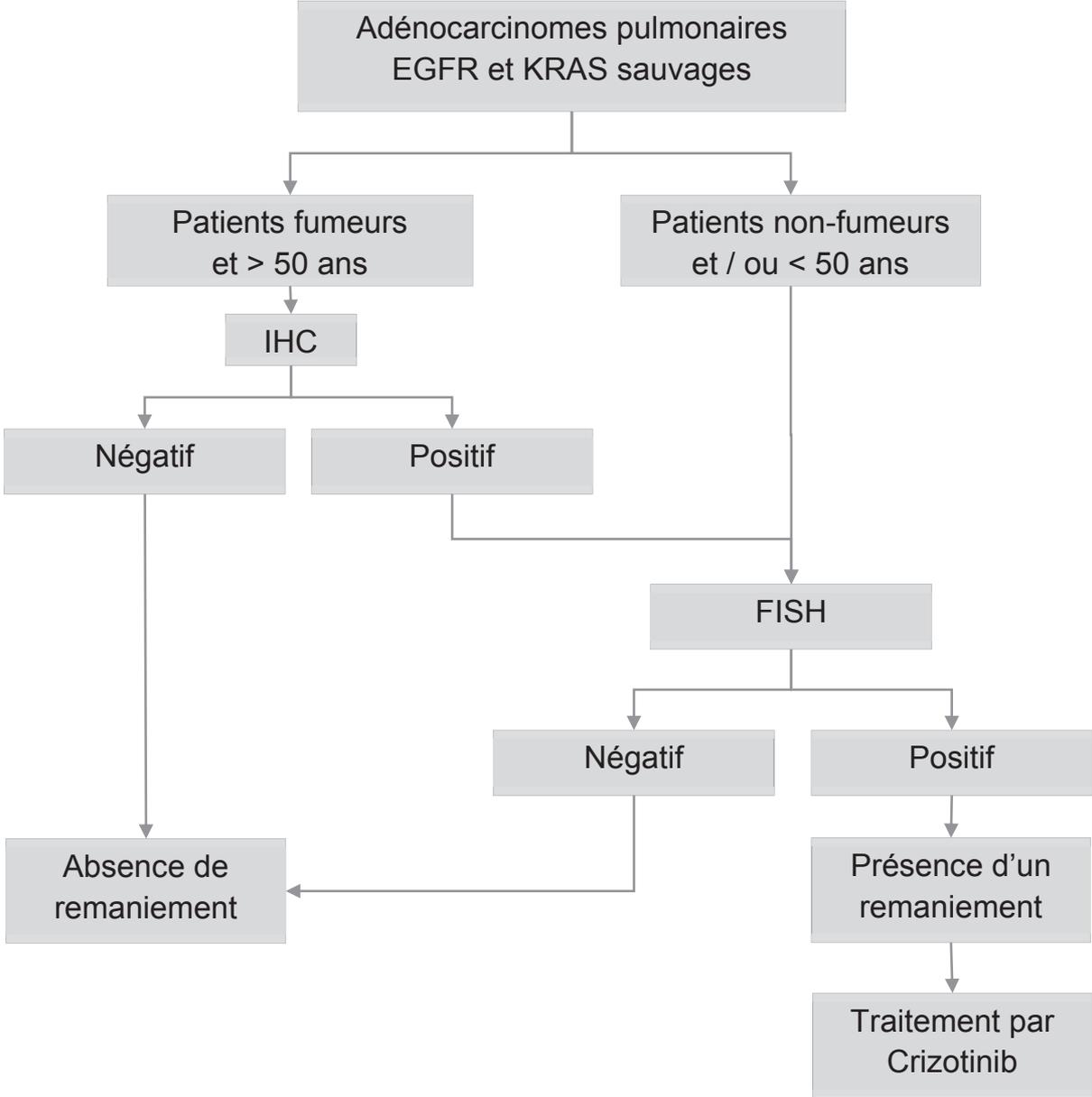
Actuellement la détection par FISH reste la technique de référence, si elle est sensible, spécifique et reproductible, elle est néanmoins coûteuse et chronophage.

L'immunohistochimie est une alternative très séduisante, sa sensibilité et sa spécificité sont très bonnes. Cette technique est beaucoup moins coûteuse, elle ne nécessite pas d'investissement financier conséquent et le temps de lecture est rapide.

Dans notre série la sensibilité de l'immunohistochimie est biaisée notamment par un faux négatif, il ne faut pas perdre de vue que ces cas sont rarissimes et qu'en prenant en compte tous les résultats collectés dans la littérature, la sensibilité de l'immunohistochimie reste excellente. De plus, un nouvel anticorps très prometteur est actuellement sur le marché (clones D5F3 et D9E4 ; Cell Signaling Technology).

Comme dans de nombreuses plateformes, il serait envisageable de réaliser un premier screening en utilisant l'immunohistochimie puis de tester en FISH tous les cas positifs ou douteux. Pour augmenter la sensibilité de la détection et éviter de rendre des résultats de faux négatifs, l'aide des cliniciens est précieuse, en effet nous pouvons tester directement par FISH tous les patients non-fumeurs et/ou âgés de moins de 50 ans (EGFR et KRAS sauvages). Suite à l'expérience de nombreux

service dont le nôtre voici un algorithme de détection qui pourrait être proposé et discuté avec notamment les pneumologues et les oncologues.



Reference List

- (1) Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer* 2010;127:2893-917.
- (2) Ferlay J, Parkin DM, Steliarova-Foucher E. Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 2008. *Eur J Cancer* 2010;46:765-81.
- (3) Belot A, Grosclaude P, Bossard N, Jouglu E, Benhamou E, Delafosse P, et al. Cancer incidence and mortality in France over the period 1980-2005. *Rev Epidemiol Sante Publique* 2008;56:159-75.
- (4) Davidoff AJ, Tang M, Seal B, Edelman MJ. Chemotherapy and survival benefit in elderly patients with advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2010;28:2191-7.
- (5) Blanchon F, Grivaux M, Collon T, Zureik M, Barbieux H, Benichou-Flurin M, et al. [Epidemiologic of primary bronchial carcinoma management in the general French hospital centers]. *Rev Mal Respir* 2002;19:727-34.
- (6) Thun MJ, Lally CA, Flannery JT, Calle EE, Flanders WD, Heath CW, Jr. Cigarette smoking and changes in the histopathology of lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 1997;89:1580-6.
- (7) Hill C. [Tobacco epidemiology]. *Rev Prat* 2012;62:325, 327-5, 329.
- (8) Wirth N, Bohadana A, Spinosa A, Martinet Y. [Respiratory diseases related to passive smoking]. *Rev Mal Respir* 2009;26:667-78.
- (9) Hackshaw AK. Lung cancer and passive smoking. *Stat Methods Med Res* 1998;7:119-36.
- (10) Boffetta P, Autier P, Boniol M, Boyle P, Hill C, Aurenco A, et al. An estimate of cancers attributable to occupational exposures in France. *J Occup Environ Med* 2010;52:399-406.
- (11) Lemen RA, Dement JM, Wagoner JK. Epidemiology of asbestos-related diseases. *Environ Health Perspect* 1980;34:1-11.
- (12) Quoix E, Lemarie E. [Epidemiological novelties in lung cancer]. *Rev Mal Respir* 2011;28:1048-58.
- (13) Berthiller J, Straif K, Boniol M, Voirin N, Benhaim-Luzon V, Ayoub WB, et al. Cannabis smoking and risk of lung cancer in men: a pooled analysis of three studies in Maghreb. *J Thorac Oncol* 2008;3:1398-403.
- (14) Aldington S, Harwood M, Cox B, Weatherall M, Beckert L, Hansell A, et al. Cannabis use and cancer of the head and neck: case-control study. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2008;138:374-80.
- (15) Travis WD, Brambilla E, Noguchi M, Nicholson AG, Geisinger K, Yatabe Y, et al. International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society: international multidisciplinary classification of lung adenocarcinoma: executive summary. *Proc Am Thorac Soc* 2011;8:381-5.

- (16) Nagano T, Ishii G, Nagai K, Ito T, Kawase A, Takahashi K, et al. Structural and biological properties of a papillary component generating a micropapillary component in lung adenocarcinoma. *Lung Cancer* 2010;67:282-9.
- (17) Silver SA, Askin FB. True papillary carcinoma of the lung: a distinct clinicopathologic entity. *Am J Surg Pathol* 1997;21:43-51.
- (18) Travis WD, Brambilla E, Noguchi M, Nicholson AG, Geisinger KR, Yatabe Y, et al. International association for the study of lung cancer/american thoracic society/european respiratory society international multidisciplinary classification of lung adenocarcinoma. *J Thorac Oncol* 2011;6:244-85.
- (19) Finberg KE, Sequist LV, Joshi VA, Muzikansky A, Miller JM, Han M, et al. Mucinous differentiation correlates with absence of EGFR mutation and presence of KRAS mutation in lung adenocarcinomas with bronchioloalveolar features. *J Mol Diagn* 2007;9:320-6.
- (20) Sakuma Y, Matsukuma S, Yoshihara M, Nakamura Y, Noda K, Nakayama H, et al. Distinctive evaluation of nonmucinous and mucinous subtypes of bronchioloalveolar carcinomas in EGFR and K-ras gene-mutation analyses for Japanese lung adenocarcinomas: confirmation of the correlations with histologic subtypes and gene mutations. *Am J Clin Pathol* 2007;128:100-8.
- (21) Beasley MB. Immunohistochemistry of pulmonary and pleural neoplasia. *Arch Pathol Lab Med* 2008;132:1062-72.
- (22) Lazzaro D, Price M, de FM, Di LR. The transcription factor TTF-1 is expressed at the onset of thyroid and lung morphogenesis and in restricted regions of the foetal brain. *Development* 1991;113:1093-104.
- (23) Bohinski RJ, Di LR, Whitsett JA. The lung-specific surfactant protein B gene promoter is a target for thyroid transcription factor 1 and hepatocyte nuclear factor 3, indicating common factors for organ-specific gene expression along the foregut axis. *Mol Cell Biol* 1994;14:5671-81.
- (24) Khor A, Whitsett JA, Stahlman MT, Olson SJ, Cagle PT. Utility of surfactant protein B precursor and thyroid transcription factor 1 in differentiating adenocarcinoma of the lung from malignant mesothelioma. *Hum Pathol* 1999;30:695-700.
- (25) Pao W, Girard N. New driver mutations in non-small-cell lung cancer. *Lancet Oncol* 2011;12:175-80.
- (26) Thiberville L, Bourguignon J, Metayer J, Bost F, Diarra-Mehrpour M, Bignon J, et al. Frequency and prognostic evaluation of 3p21-22 allelic losses in non-small-cell lung cancer. *Int J Cancer* 1995;64:371-7.
- (27) Lantuejoul S, Salameire D, Salon C, Brambilla E. Pulmonary preneoplasia--sequential molecular carcinogenetic events. *Histopathology* 2009;54:43-54.
- (28) Brambilla E, Gazdar A. Pathogenesis of lung cancer signalling pathways: roadmap for therapies. *Eur Respir J* 2009;33:1485-97.
- (29) Aviel-Ronen S, Blackhall FH, Shepherd FA, Tsao MS. K-ras mutations in non-small-cell lung carcinoma: a review. *Clin Lung Cancer* 2006;8:30-8.

- (30) Choong NW, Salgia R, Vokes EE. Key signaling pathways and targets in lung cancer therapy. *Clin Lung Cancer* 2007;8 Suppl 2:S52-S60.
- (31) West H, Lilenbaum R, Harpole D, Wozniak A, Sequist L. Molecular analysis-based treatment strategies for the management of non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol* 2009;4:S1029-S1039.
- (32) Solomon B, Pearson RB. Class IA phosphatidylinositol 3-kinase signaling in non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol* 2009;4:787-91.
- (33) Reungwetwattana T, Weroha SJ, Molina JR. Oncogenic Pathways, Molecularly Targeted Therapies, and Highlighted Clinical Trials in Non-Small-Cell Lung Cancer (NSCLC). *Clin Lung Cancer* 2011.
- (34) Engelman JA, Zejnullahu K, Mitsudomi T, Song Y, Hyland C, Park JO, et al. MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling. *Science* 2007;316:1039-43.
- (35) 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.
- (36) Somasundaram K. Tumor suppressor p53: regulation and function. *Front Biosci* 2000;5:D424-D437.
- (37) Mogi A, Kuwano H. TP53 mutations in nonsmall cell lung cancer. *J Biomed Biotechnol* 2011;2011:583929.
- (38) Andujar P, Wang J, Descatha A, Galateau-Salle F, Abd-Alsamad I, Billon-Galland MA, et al. p16INK4A inactivation mechanisms in non-small-cell lung cancer patients occupationally exposed to asbestos. *Lung Cancer* 2010;67:23-30.
- (39) Rudin CM, Avila-Tang E, Harris CC, Herman JG, Hirsch FR, Pao W, et al. Lung cancer in never smokers: molecular profiles and therapeutic implications. *Clin Cancer Res* 2009;15:5646-61.
- (40) Subramanian J, Govindan R. Molecular genetics of lung cancer in people who have never smoked. *Lancet Oncol* 2008;9:676-82.
- (41) Pulford K, Morris SW, Turturro F. Anaplastic lymphoma kinase proteins in growth control and cancer. *J Cell Physiol* 2004;199:330-58.
- (42) Chiarle R, Voena C, Ambrogio C, Piva R, Inghirami G. The anaplastic lymphoma kinase in the pathogenesis of cancer. *Nat Rev Cancer* 2008;8:11-23.
- (43) Kelleher FC, McDermott R. The emerging pathogenic and therapeutic importance of the anaplastic lymphoma kinase gene. *Eur J Cancer* 2010;46:2357-68.
- (44) Barreca A, Lasorsa E, Riera L, Machiorlatti R, Piva R, Ponzoni M, et al. Anaplastic lymphoma kinase in human cancer. *J Mol Endocrinol* 2011;47:R11-R23.
- (45) Grande E, Bolos MV, Arriola E. Targeting oncogenic ALK: a promising strategy for cancer treatment. *Mol Cancer Ther* 2011;10:569-79.

- (46) Mosse YP, Wood A, Maris JM. Inhibition of ALK signaling for cancer therapy. *Clin Cancer Res* 2009;15:5609-14.
- (47) 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.
- (48) Shinmura K, Kageyama S, Tao H, Bunai T, Suzuki M, Kamo T, et al. EML4-ALK fusion transcripts, but no NPM-, TPM3-, CLTC-, ATIC-, or TFG-ALK fusion transcripts, in non-small cell lung carcinomas. *Lung Cancer* 2008;61:163-9.
- (49) Wong DW, Leung EL, Wong SK, Tin VP, Sihoe AD, Cheng LC, et al. A novel KIF5B-ALK variant in nonsmall cell lung cancer. *Cancer* 2011;117:2709-18.
- (50) Rikova K, Guo A, Zeng Q, Possemato A, Yu J, Haack H, et al. Global survey of phosphotyrosine signaling identifies oncogenic kinases in lung cancer. *Cell* 2007;131:1190-203.
- (51) Takeuchi K, Choi YL, Togashi Y, Soda M, Hatano S, Inamura K, et al. KIF5B-ALK, a novel fusion oncokinase identified by an immunohistochemistry-based diagnostic system for ALK-positive lung cancer. *Clin Cancer Res* 2009;15:3143-9.
- (52) Shaw AT, Solomon B. Targeting anaplastic lymphoma kinase in lung cancer. *Clin Cancer Res* 2011;17:2081-6.
- (53) Li Y, Ye X, Liu J, Zha J, Pei L. Evaluation of EML4-ALK fusion proteins in non-small cell lung cancer using small molecule inhibitors. *Neoplasia* 2011;13:1-11.
- (54) Kwak EL, Bang YJ, Camidge DR, Shaw AT, Solomon B, Maki RG, et al. Anaplastic lymphoma kinase inhibition in non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2010;363:1693-703.
- (55) Yang P, Kulig K, Boland JM, Erickson-Johnson MR, Oliveira AM, Wampfler J, et al. Worse disease-free survival in never-smokers with ALK+ lung adenocarcinoma. *J Thorac Oncol* 2012;7:90-7.
- (56) Wu SG, Kuo YW, Chang YL, Shih JY, Chen YH, Tsai MF, et al. EML4-ALK translocation predicts better outcome in lung adenocarcinoma patients with wild-type EGFR. *J Thorac Oncol* 2012;7:98-104.
- (57) Shaw AT, Solomon B. Targeting anaplastic lymphoma kinase in lung cancer. *Clin Cancer Res* 2011;17:2081-6.
- (58) Gerber DE, Minna JD. ALK inhibition for non-small cell lung cancer: from discovery to therapy in record time. *Cancer Cell* 2010;18:548-51.
- (59) Shaw AT, Yeap BY, Solomon BJ, Riely GJ, Gainor J, Engelman JA, et al. Effect of crizotinib on overall survival in patients with advanced non-small-cell lung cancer harbouring ALK gene rearrangement: a retrospective analysis. *Lancet Oncol* 2011;12:1004-12.
- (60) Camidge DR, Theodoro M, Maxson DA, Skokan M, O'Brien T, Lu X, et al. Correlations between the percentage of tumor cells showing an ALK (anaplastic lymphoma kinase) gene rearrangement, ALK signal copy number, and response to crizotinib therapy in ALK fluorescence in situ hybridization-positive nonsmall cell lung cancer. *Cancer* 2012.

- (61) Paik JH, Choi CM, Kim H, Jang SJ, Choe G, Kim DK, et al. Clinicopathologic implication of ALK rearrangement in surgically resected lung cancer A proposal of diagnostic algorithm for ALK-rearranged adenocarcinoma. *Lung Cancer* 2011.
- (62) Wong DW, Leung EL, So KK, Tam IY, Sihoe AD, Cheng LC, et al. The EML4-ALK fusion gene is involved in various histologic types of lung cancers from nonsmokers with wild-type EGFR and KRAS. *Cancer* 2009;115:1723-33.
- (63) Martelli MP, Sozzi G, Hernandez L, Pettirossi V, Navarro A, Conte D, et al. EML4-ALK rearrangement in non-small cell lung cancer and non-tumor lung tissues. *Am J Pathol* 2009;174:661-70.
- (64) Paik JH, Choi CM, Kim H, Jang SJ, Choe G, Kim DK, et al. Clinicopathologic implication of ALK rearrangement in surgically resected lung cancer A proposal of diagnostic algorithm for ALK-rearranged adenocarcinoma. *Lung Cancer* 2011.
- (65) Ou SH. Crizotinib: a novel and first-in-class multitargeted tyrosine kinase inhibitor for the treatment of anaplastic lymphoma kinase rearranged non-small cell lung cancer and beyond. *Drug Des Devel Ther* 2011;5:471-85.
- (66) Yoshida A, Tsuta K, Nakamura H, Kohno T, Takahashi F, Asamura H, et al. Comprehensive histologic analysis of ALK-rearranged lung carcinomas. *Am J Surg Pathol* 2011;35:1226-34.
- (67) Ohba T, Sugio K, Kometani T, Yamaguchi M, Hamatake M, Nosaki K, et al. Signet ring cell adenocarcinoma of the lung with an EML4-ALK fusion gene mimicking mucinous (colloid) adenocarcinoma: a case report. *Lung Cancer* 2011;73:375-8.
- (68) Inamura K, Takeuchi K, Togashi Y, Hatano S, Ninomiya H, Motoi N, et al. EML4-ALK lung cancers are characterized by rare other mutations, a TTF-1 cell lineage, an acinar histology, and young onset. *Mod Pathol* 2009;22:508-15.
- (69) Yoshida A, Tsuta K, Watanabe S, Sekine I, Fukayama M, Tsuda H, et al. Frequent ALK rearrangement and TTF-1/p63 co-expression in lung adenocarcinoma with signet-ring cell component. *Lung Cancer* 2011;72:309-15.
- (70) Sasaki T, Rodig SJ, Chirieac LR, Janne PA. The biology and treatment of EML4-ALK non-small cell lung cancer. *Eur J Cancer* 2010;46:1773-80.
- (71) McLeer-Florin A, Moro-Sibilot D, Melis A, Salameire D, Lefebvre C, Ceccaldi F, et al. Dual IHC and FISH testing for ALK gene rearrangement in lung adenocarcinomas in a routine practice: a French study. *J Thorac Oncol* 2012;7:348-54.
- (72) Paik JH, Choi CM, Kim H, Jang SJ, Choe G, Kim DK, et al. Clinicopathologic implication of ALK rearrangement in surgically resected lung cancer A proposal of diagnostic algorithm for ALK-rearranged adenocarcinoma. *Lung Cancer* 2011.
- (73) Paik JH, Choe G, Kim H, Choe JY, Lee HJ, Lee CT, et al. Screening of anaplastic lymphoma kinase rearrangement by immunohistochemistry in non-small cell lung cancer: correlation with fluorescence in situ hybridization. *J Thorac Oncol* 2011;6:466-72.
- (74) Mino-Kenudson M, Chirieac LR, Law K, Hornick JL, Lindeman N, Mark EJ, et al. A novel, highly sensitive antibody allows for the routine detection of ALK-rearranged lung adenocarcinomas by standard immunohistochemistry. *Clin Cancer Res* 2010;16:1561-71.

- (75) Ou SH. Crizotinib: a novel and first-in-class multitargeted tyrosine kinase inhibitor for the treatment of anaplastic lymphoma kinase rearranged non-small cell lung cancer and beyond. *Drug Des Devel Ther* 2011;5:471-85.
- (76) Just PA, Cazes A, Audebourg A, Cessot A, Pallier K, Danel C, et al. Histologic subtypes, immunohistochemistry, FISH or molecular screening for the accurate diagnosis of ALK-rearrangement in lung cancer: A comprehensive study of Caucasian non-smokers. *Lung Cancer* 2011.
- (77) Camidge DR, Theodoro M, Maxson DA, Skokan M, O'Brien T, Lu X, et al. Correlations between the percentage of tumor cells showing an ALK (anaplastic lymphoma kinase) gene rearrangement, ALK signal copy number, and response to crizotinib therapy in ALK fluorescence in situ hybridization-positive nonsmall cell lung cancer. *Cancer* 2012.
- (78) Paik JH, Choe G, Kim H, Choe JY, Lee HJ, Lee CT, et al. Screening of anaplastic lymphoma kinase rearrangement by immunohistochemistry in non-small cell lung cancer: correlation with fluorescence in situ hybridization. *J Thorac Oncol* 2011;6:466-72.
- (79) Yi ES, Boland JM, Maleszewski JJ, Roden AC, Oliveira AM, Aubry MC, et al. Correlation of IHC and FISH for ALK gene rearrangement in non-small cell lung carcinoma: IHC score algorithm for FISH. *J Thorac Oncol* 2011;6:459-65.
- (80) Paik JH, Choe G, Kim H, Choe JY, Lee HJ, Lee CT, et al. Screening of anaplastic lymphoma kinase rearrangement by immunohistochemistry in non-small cell lung cancer: correlation with fluorescence in situ hybridization. *J Thorac Oncol* 2011;6:466-72.
- (81) Bishop JA, Teruya-Feldstein J, Westra WH, Pelosi G, Travis WD, Rekhtman N. p40 (DeltaNp63) is superior to p63 for the diagnosis of pulmonary squamous cell carcinoma. *Mod Pathol* 2012;25:405-15.
- (82) Whithaus K, Fukuoka J, Prihoda TJ, Jagirdar J. Evaluation of napsin A, cytokeratin 5/6, p63, and thyroid transcription factor 1 in adenocarcinoma versus squamous cell carcinoma of the lung. *Arch Pathol Lab Med* 2012;136:155-62.
- (83) Nonaka D. A Study of DeltaNp63 Expression in Lung Non-Small Cell Carcinomas. *Am J Surg Pathol* 2012.

RESUME

INTRODUCTION : La découverte de driver mutations a modifié la prise en charge thérapeutique des adénocarcinomes pulmonaires avec notamment depuis 2005 la prescription d'inhibiteurs de tyrosine kinase ciblant les mutations activatrices d'*EGFR*. En 2007, l'équipe de Soda a identifié une inversion impliquant le gène *ALK* présente dans environ 5% des carcinomes pulmonaires non à petites cellules. Elle induit une surexpression de la protéine *ALK*, puissante molécule oncogénique (driver mutation). Ces adénocarcinomes présentent alors une sensibilité à un inhibiteur de la tyrosine kinase (le crizotinib), la mise en évidence de cette inversion est une étape essentielle dans la prise en charge de ces tumeurs. L'INCa a financé en 2012 la technique d'hybridation comme test de détection. La détection immunohistochimique de réarrangement de *ALK* semble être une technique alternative beaucoup plus abordable et efficace, d'autant plus que c'est bien la protéine " LK qui est la cible du crizotinib. Les données récentes ont confirmé l'intérêt de cette méthode de détection

OBJECTIFS : Caractériser le profil morphologique et immunohistochimique des carcinomes pulmonaires non à petites cellules (CPNPC) remaniés pour le gène *ALK* (*ALK+*) et comparer la technique de FISH à celle d'IHC pour le screening de ces patients.

MATERIELS ET METHODES : 254 CPNPC de phénotype *EGFR* et *KRAS* sauvages ont été testés par FISH (sonde Vysis® break apart de chez Abbott®) en prospectif dont 130 cas par IHC (anticorps anti-*ALK* clone 5A4 de chez Abcam®). Le seuil de positivité a été fixé à 15% de cellules remaniées.

RESULTATS : Sur les 254 cas, reçus à la plateforme régionale de Haute Normandie, 216 prélèvements ont pu être testés par FISH. Un remaniement du gène *ALK* a été identifié dans 9 de ces cas (soit 4,3%). En parallèle, 130 de ces prélèvements ont été testés par l'IHC incluant les 9 cas positifs identifiés en FISH. Nous n'avons observé aucun faux positif, cependant parmi les 9 cas détectés en FISH, 2 cas se sont révélés négatifs. L'un de ces 2 cas a été relu par une autre équipe qui a également observé un remaniement en FISH et l'analyse par RT-PCR n'a pas mis en évidence d'inversion *EML4-ALK*. Nous pouvons dès lors supposer que le gène partenaire de *ALK* n'est vraisemblablement pas *EML4* et que, par conséquent, soit la protéine de fusion ne présente pas d'épitope pour le clone 5A4 soit qu'aucune protéine n'a été synthétisée. Le second cas négatif présentait un taux de cellules remaniées en FISH inférieur à 20%. Nous avons donc émis deux hypothèses supplémentaires, à savoir un seuil de positivité trop bas ou une surestimation du nombre de cellules remaniées. " noter que 38 cas (soit 15%) n'ont pu être analysés, le matériel étant insuffisant pour 9% des cas et la technique ayant échoué dans 6% des cas.

CONCLUSION : Si la sensibilité et la spécificité de la FISH sont excellentes, celles de l'IHC sont également élevées (respectivement de 88% et 100%). De plus, l'IHC est une technique reproductible, moins coûteuse et plus rapide à interpréter que la FISH. Elle a donc toute sa place dans le screening des remaniements *ALK* des CPNPC. Cependant, la possibilité de faux positifs en IHC incite à conserver la FISH en première intention dans certains cas particuliers : patients non-fumeurs et/ou âgés de moins de 50 ans.