



**HAL**  
open science

# Évaluation d'une nouvelle technique de biologie moléculaire, la LD-RTPCR, pour la recherche de réarrangement des gènes ALK, ROS et RET dans l'adénocarcinome pulmonaire

Claire Gravet

► **To cite this version:**

Claire Gravet. Évaluation d'une nouvelle technique de biologie moléculaire, la LD-RTPCR, pour la recherche de réarrangement des gènes ALK, ROS et RET dans l'adénocarcinome pulmonaire. Médecine humaine et pathologie. 2016. dumas-01372480

**HAL Id: dumas-01372480**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01372480>**

Submitted on 27 Sep 2016

**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.

# THÈSE POUR LE DOCTORAT EN MÉDECINE

(Diplôme d'Etat)

Présentée et soutenue publiquement le 12 septembre 2016 à Rouen

Par

**Claire GRAVET**

Née le 9 juillet 1987 à Rouen

## **Évaluation d'une nouvelle technique de biologie moléculaire, la LD-RTPCR, pour la recherche de réarrangement des gènes *ALK*, *ROS* et *RET* dans l'adénocarcinome pulmonaire**

### **PRÉSIDENT DU JURY**

Monsieur le Professeur Jean-Christophe SABOURIN

### **DIRECTEUR DE THÈSE**

Monsieur le Professeur Jean-Christophe SABOURIN

### **MEMBRES DU JURY**

Monsieur le Professeur Frédéric BIBEAU

Monsieur le Professeur Fabrice JARDIN

Monsieur le Professeur Bertrand MACE

Monsieur le Docteur Nicolas PITON

Madame le Docteur Liana VERESEZAN

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.

-----

DOYEN : **Professeur Pierre FREGER**

ASSESSEURS : **Professeur Michel GUERBET**  
**Professeur Benoit VEBER**  
**Professeur Pascal JOLY**  
**Professeur Stéphane MARRET**

I - MEDECINE

**PROFESSEURS DES UNIVERSITES – PRATICIENS HOSPITALIERS**

Mr Frédéric <b>ANSELME</b>	HCN	Cardiologie
Mme Isabelle <b>AUQUIT AUCKBUR</b>	HCN	Chirurgie plastique
Mr Bruno <b>BACHY</b> ( <i>sumombre jusque 01/11/15</i> )	HCN	Chirurgie pédiatrique
Mr Fabrice <b>BAUER</b>	HCN	Cardiologie
Mme Soumeya <b>BEKRI</b>	HCN	Biochimie et biologie moléculaire
Mr Jacques <b>BENICHOU</b>	HCN	Bio statistiques et informatique médicale
Mr Jean-Paul <b>BESSOU</b>	HCN	Chirurgie thoracique et cardio-vasculaire
Mme Françoise <b>BEURET-BLANQUART</b> ( <i>sumombre</i> )	HCN	Commission E.P.P. D.P.C. Pôle Qualité
Mr Guy <b>BONMARCHAND</b> ( <i>sumombre</i> )	HCN	Réanimation médicale
Mr Olivier <b>BOYER</b>	UFR	Immunologie
Mr François <b>CARON</b>	HCN	Maladies infectieuses et tropicales
Mr Philippe <b>CHASSAGNE</b>	HCN	Médecine interne (gériatrie)
Mr Vincent <b>COMPERE</b>	HCN	Anesthésiologie et réanimation chirurgicale
Mr Antoine <b>CUVELIER</b>	HB	Pneumologie
Mr Pierre <b>CZERNICHOW</b>	HCH	Epidémiologie, économie de la santé
Mr Jean-Nicolas <b>DACHER</b>	HCN	Radiologie et imagerie médicale

Mr Stéfan <b>DARMONI</b>	HCN	Informatique médicale et techniques de communication
Mr Pierre <b>DECHELOTTE</b>	HCN	Nutrition
Mme Danièle <b>DEHESDIN</b> ( <i>sumombre</i> )	HCN	Oto-rhino-laryngologie
Mr Frédéric <b>DI FIORE</b>	CB	Cancérologie
Mr Fabien <b>DOGUET</b>	HCN	Chirurgie Cardio Vasculaire
Mr Jean <b>DOUCET</b>	SJ	Thérapeutique - Médecine interne et gériatrie
Mr Bernard <b>DUBRAY</b>	CB	Radiothérapie
Mr Philippe <b>DUCROTTE</b>	HCN	Hépto-gastro-entérologie
Mr Frank <b>DUJARDIN</b>	HCN	Chirurgie orthopédique - Traumatologique
Mr Fabrice <b>DUPARC</b>	HCN	Anatomie - Chirurgie orthopédique et traumatologique
Mr Eric <b>DURAND</b>	HCN	Cardiologie
Mr Bertrand <b>DUREUIL</b>	HCN	Anesthésiologie et réanimation chirurgicale
Mme Hélène <b>ELTCHANINOFF</b>	HCN	Cardiologie
Mr Thierry <b>FREBOURG</b>	UFR	Génétique
Mr Pierre <b>FREGER</b>	HCN	Anatomie - Neurochirurgie
Mr Jean François <b>GEHANNO</b>	HCN	Médecine et santé au travail
Mr Emmanuel <b>GERARDIN</b>	HCN	Imagerie médicale
Mme Priscille <b>GERARDIN</b>	HCN	Pédopsychiatrie
Mr Michel <b>GODIN</b> ( <i>sumombre</i> )	HB	Néphrologie
M. Guillaume <b>GOURCEROL</b>	HCN	Physiologie
Mr Philippe <b>GRISE</b> ( <i>sumombre</i> )	HCN	Urologie
Mr Dominique <b>GUERROT</b>	HCN	Néphrologie
Mr Olivier <b>GUILLIN</b>	HCN	Psychiatrie Adultes
Mr Didier <b>HANNEQUIN</b>	HCN	Neurologie
Mr Fabrice <b>JARDIN</b>	CB	Hématologie
Mr Luc-Marie <b>JOLY</b>	HCN	Médecine d'urgence
Mr Pascal <b>JOLY</b>	HCN	Dermato - Vénérologie
Mme Annie <b>LAQUERRIERE</b>	HCN	Anatomie et cytologie pathologiques
Mr Vincent <b>LAUDENBACH</b>	HCN	Anesthésie et réanimation chirurgicale
Mr Joël <b>LECHEVALLIER</b>	HCN	Chirurgie infantile
Mr Hervé <b>LEFEBVRE</b>	HB	Endocrinologie et maladies métaboliques
Mr Thierry <b>LEQUERRE</b>	HB	Rhumatologie
Mr Eric <b>LEREBOURS</b>	HCN	Nutrition
Mme Anne-Marie <b>LEROI</b>	HCN	Physiologie
Mr Hervé <b>LEVESQUE</b>	HB	Médecine interne

Mme Agnès <b>LIARD-ZMUDA</b>	HCN	Chirurgie Infantile
Mr Pierre Yves <b>LITZLER</b>	HCN	Chirurgie cardiaque
Mr Bertrand <b>MACE</b>	HCN	Histologie, embryologie, cytogénétique
M. David <b>MALTETE</b>	HCN	Neurologie
Mr Christophe <b>MARGUET</b>	HCN	Pédiatrie
Mme Isabelle <b>MARIE</b>	HB	Médecine interne
Mr Jean-Paul <b>MARIE</b>	HCN	Oto-rhino-laryngologie
Mr Loïc <b>MARPEAU</b>	HCN	Gynécologie - Obstétrique
Mr Stéphane <b>MARRET</b>	HCN	Pédiatrie
Mme Véronique <b>MERLE</b>	HCN	Epidémiologie
Mr Pierre <b>MICHEL</b>	HCN	Hépto-gastro-entérologie
Mr Jean-François <b>MUIR</b>	HB	Pneumologie
Mr Marc <b>MURAINÉ</b>	HCN	Ophthalmologie
Mr Philippe <b>MUSETTE</b>	HCN	Dermatologie - Vénérologie
Mr Christophe <b>PEILLON</b>	HCN	Chirurgie générale
Mr Christian <b>PFISTER</b>	HCN	Urologie
Mr Jean-Christophe <b>PLANTIER</b>	HCN	Bactériologie - Virologie
Mr Didier <b>PLISSONNIER</b>	HCN	Chirurgie vasculaire
Mr Gaëtan <b>PREVOST</b>	HCN	Endocrinologie
Mr Bernard <b>PROUST</b>	HCN	Médecine légale
Mme Nathalie <b>RIVES</b>	HCN	Biologie du développement et de la reproduction
Mr Jean-Christophe <b>RICHARD</b> ( <i>détachement</i> )	HCN	Réanimation médicale - Médecine d'urgence
Mr Vincent <b>RICHARD</b>	UFR	Pharmacologie
Mr Horace <b>ROMAN</b>	HCN	Gynécologie - Obstétrique
Mr Jean-Christophe <b>SABOURIN</b>	HCN	Anatomie - Pathologie
Mr Guillaume <b>SAVOYE</b>	HCN	Hépto-gastrologie
Mme Céline <b>SAVOYE-COLLET</b>	HCN	Imagerie médicale
Mme Pascale <b>SCHNEIDER</b>	HCN	Pédiatrie
Mr Michel <b>SCOTTE</b>	HCN	Chirurgie digestive
Mme Fabienne <b>TAMION</b>	HCN	Réanimation médicale
Mr Luc <b>THIBERVILLE</b>	HCN	Pneumologie
Mr Christian <b>THUILLEZ</b>	HB	Pharmacologie
Mr Hervé <b>TILLY</b>	CB	Hématologie et transfusion
Mr Olivier <b>TROST</b>	HCN	Chirurgie Maxillo Faciale
Mr Jean-Jacques <b>TUECH</b>	HCN	Chirurgie digestive

Mr Jean-Pierre <b>VANNIER</b>	HCN	Pédiatrie génétique
Mr Benoît <b>VEBER</b>	HCN	Anesthésiologie - Réanimation chirurgicale
Mr Pierre <b>VERA</b>	CB	Biophysique et traitement de l'image
Mr Eric <b>VERIN</b>	CRMPR	Médecine physique et de réadaptation
Mr Eric <b>VERSPYCK</b>	HCN	Gynécologie obstétrique
Mr Olivier <b>VITTECOQ</b>	HB	Rhumatologie
Mr Jacques <b>WEBER</b>	HCN	Physiologie

### **MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES – PRATICIENS HOSPITALIERS**

Mme Noëlle <b>BARBIER-FREBOURG</b>	HCN	Bactériologie – Virologie
Mr Jeremy <b>BELLIEN</b>	HCN	Pharmacologie
Mme Carole <b>BRASSE LAGNEL</b>	HCN	Biochimie
Mme Valérie <b>BRIDOUX HUYBRECHTS</b>	HCN	Chirurgie Digestive
Mr Gérard <b>BUCHONNET</b>	HCN	Hématologie
Mme Mireille <b>CASTANET</b>	HCN	Pédiatrie
Mme Nathalie <b>CHASTAN</b>	HCN	Physiologie
Mme Sophie <b>CLAEYSSENS</b>	HCN	Biochimie et biologie moléculaire
Mr Moïse <b>COEFFIER</b>	HCN	Nutrition
Mr Stéphane <b>DERREY</b>	HCN	Neurochirurgie
Mr Manuel <b>ETIENNE</b>	HCN	Maladies infectieuses et tropicales
Mr Serge <b>JACQUOT</b>	UFR	Immunologie
Mr Joël <b>LADNER</b>	HCN	Epidémiologie, économie de la santé
Mr Jean-Baptiste <b>LATOUCHE</b>	UFR	Biologie cellulaire
Mr Thomas <b>MOUREZ</b>	HCN	Bactériologie
Mme Muriel <b>QUILLARD</b>	HCN	Biochimie et biologie moléculaire
Mr Mathieu <b>SALAUN</b>	HCN	Pneumologie
Mme Pascale <b>SAUGIER-VEBER</b>	HCN	Génétique
Mme Anne-Claire <b>TOBENAS-DUJARDIN</b>	HCN	Anatomie

### **PROFESSEUR AGREGÉ OU CERTIFIÉ**

Mme Dominique <b>LANIEZ</b>	UFR	Anglais
Mr Thierry <b>WABLE</b>	UFR	Communication

## II - PHARMACIE

### PROFESSEURS

Mr Thierry <b>BESSON</b>	Chimie Thérapeutique
Mr Jean-Jacques <b>BONNET</b>	Pharmacologie
Mr Roland <b>CAPRON</b> (PU-PH)	Biophysique
Mr Jean <b>COSTENTIN</b> (Professeur émérite)	Pharmacologie
Mme Isabelle <b>DUBUS</b>	Biochimie
Mr Loïc <b>FAVENNEC</b> (PU-PH)	Parasitologie
Mr Jean Pierre <b>GOULLE</b>	Toxicologie
Mr Michel <b>GUERBET</b>	Toxicologie
Mme Isabelle <b>LEROUX - NICOLLET</b>	Physiologie
Mme Christelle <b>MONTEIL</b>	Toxicologie
Mme Martine <b>PESTEL-CARON</b> (PU-PH)	Microbiologie
Mme Elisabeth <b>SEGUIN</b>	Pharmacognosie
Mr Rémi <b>VARIN</b> (PU-PH)	Pharmacie clinique
Mr Jean-Marie <b>VAUGEOIS</b>	Pharmacologie
Mr Philippe <b>VERITE</b>	Chimie analytique

### MAITRES DE CONFERENCES

Mme Cécile <b>BARBOT</b>	Chimie Générale et Minérale
Mme Dominique <b>BOUCHER</b>	Pharmacologie
Mr Frédéric <b>BOUNOURE</b>	Pharmacie Galénique
Mr Abdeslam <b>CHAGRAOUI</b>	Physiologie
Mme Marie Catherine <b>CONCE-CHEMTOB</b>	Législation pharmaceutique et économie de la santé
Mme Elizabeth <b>CHOSSON</b>	Botanique
Mme Cécile <b>CORBIERE</b>	Biochimie
Mr Eric <b>DITTMAR</b>	Biophysique
Mme Nathalie <b>DOURMAP</b>	Pharmacologie
Mme Isabelle <b>DUBUC</b>	Pharmacologie
Mr Abdelhakim <b>ELOMRI</b>	Pharmacognosie

Mr François <b>ESTOUR</b>	Chimie Organique
Mr Gilles <b>GARGALA</b> (MCU-PH)	Parasitologie
Mme Najla <b>GHARBI</b>	Chimie analytique
Mme Marie-Laure <b>GROULT</b>	Botanique
Mr Hervé <b>HUE</b>	Biophysique et mathématiques
Mme Laetitia <b>LE GOFF</b>	Parasitologie - Immunologie
Mme Hong <b>LU</b>	Biologie
Mme Sabine <b>MENAGER</b>	Chimie organique
Mr Mohamed <b>SKIBA</b>	Pharmacie galénique
Mme Malika <b>SKIBA</b>	Pharmacie galénique
Mme Christine <b>THARASSE</b>	Chimie thérapeutique
Mr Frédéric <b>ZIEGLER</b>	Biochimie

#### **PROFESSEURS ASSOCIES**

Mme Cécile <b>GUERARD-DETUNCQ</b>	Pharmacie officinale
Mr Jean-François <b>HOUIVET</b>	Pharmacie officinale

#### **PROFESSEUR CERTIFIE**

Mme Mathilde <b>GUERIN</b>	Anglais
----------------------------	---------

#### **ASSISTANT HOSPITALO-UNIVERSITAIRE**

Mr Jérémie <b>MARTINET</b>	Immunologie
----------------------------	-------------

#### **ATTACHES TEMPORAIRES D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE**

Mr Romy <b>RAZAKANDRAINIBE</b>	Parasitologie
Mr François <b>HALLOUARD</b>	Galénique
Mme Caroline <b>LAUGEL</b>	Chimie organique
Mr Souleymane <b>ABDOUL-AZIZ</b>	Biochimie
Mme Maïté <b>NIEPCERON</b>	Microbiologie

## LISTE DES RESPONSABLES DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES

Mme Cécile <b>BARBOT</b>	Chimie Générale et minérale
Mr Thierry <b>BESSON</b>	Chimie thérapeutique
Mr Roland <b>CAPRON</b>	Biophysique
Mr Jean <b>CHASTANG</b>	Mathématiques
Mme Marie-Catherine <b>CONCE-CHEMTOB</b>	Législation et économie de la santé
Mme Elisabeth <b>CHOSSON</b>	Botanique
Mr Jean-Jacques <b>BONNET</b>	Pharmacodynamie
Mme Isabelle <b>DUBUS</b>	Biochimie
Mr Loïc <b>FAVENNEC</b>	Parasitologie
Mr Michel <b>GUERBET</b>	Toxicologie
Mr François <b>ESTOUR</b>	Chimie organique
Mme Isabelle <b>LEROUX-NICOLLET</b>	Physiologie
Mme Martine <b>PESTEL-CARON</b>	Microbiologie
Mme Elisabeth <b>SEGUIN</b>	Pharmacognosie
Mr Mohamed <b>SKIBA</b>	Pharmacie galénique
Mr Philippe <b>VERITE</b>	Chimie analytique

## III – MEDECINE GENERALE

### PROFESSEUR DES UNIVERSITÉS-MÉDECIN GÉNÉRALISTE

Mr Jean-Loup **HERMIL** UFR Médecine générale

### PROFESSEURS ASSOCIES A MI-TEMPS

Mr Emmanuel **LEFEBVRE** UFR Médecine générale

Mr Philippe **NGUYEN THANH** UFR Médecine générale

### **MAITRE DE CONFERENCES ASSOCIE A MI-TEMPS**

Mr Pascal **BOULET** UFR Médecine générale

Mme Elisabeth **MAUVIARD** UFR Médecine générale

Mme Lucille **PELLERIN** UFR Médecine générale

Mme Yveline **SEVRIN** UFR Médecine générale

Mme Marie Thérèse **THUEUX** UFR Médecine générale

### **ENSEIGNANTS MONO-APPARTENANTS**

### **PROFESSEURS**

Mr Serguei **FETISSOV** (med) Physiologie (ADEN)

Mr Paul **MULDER** (phar) Sciences du Médicament

Mme Su **RUAN** (med) Génie Informatique

### **MAITRES DE CONFERENCES**

Mr Sahil **ADRIOUCH** (med) Biochimie et biologie moléculaire (Unité Inserm 905)

Mme Gaëlle **BOUGEARD-DENOYELLE** (med) Biochimie et biologie moléculaire (UMR 1079)

Mme Carine **CLEREN** (phar) Neurosciences (Néovasc)

Mme Pascaline **GAILDRAT** (phar) Génétique moléculaire humaine (UMR 1079)

Mr Nicolas **GUEROUT** (phar) Chirurgie Expérimentale

Mr Antoine **OUVRARD-PASCAUD** (med) Physiologie (Unité Inserm 1076)

Mr Frédéric **PASQUET** Sciences du langage, orthophonie

Mme Isabelle **TOURNIER** (phar) Biochimie (UMR 1079)

### **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* *SJ – Saint Julien Rouen*

## Remerciements

### Monsieur le Professeur Jean-Christophe SABOURIN

Vous me faites l'honneur de diriger ce travail et de présider ce jury. Je vous remercie pour votre enseignement, votre disponibilité et votre bienveillance durant ces 5 années d'internat. Veuillez trouver ici l'expression de ma profonde gratitude.

### Monsieur le Professeur Frédéric BIBEAU

Vous me faites l'honneur de juger ce travail. Pour l'intérêt que vous portez à ma thèse, veuillez trouver ici l'expression de ma sincère reconnaissance.

### Monsieur le Professeur Fabrice JARDIN

Vous m'avez fait l'honneur de me permettre de travailler au sein de votre équipe sur ce sujet très intéressant. Veuillez trouver ici l'expression de mes sincères remerciements.

### Monsieur le Professeur Bertrand MACE

Vous m'avez fait l'honneur d'accepter de faire partie du jury de cette thèse. Veuillez trouver ici l'expression de mon profond respect.

### Nicolas

Un immense merci pour ton implication et ton aide dans la réalisation de ce travail. C'est un plaisir d'effectuer ce dernier semestre d'internat avec toi, nos tempéraments quelque peu semblables facilitent la cohabitation !

### Liana

Je te remercie chaleureusement d'avoir accepté d'être dans mon jury de thèse. Je me souviens avec amusement de nos péripéties du DIU et suis heureuse d'avoir pu travailler avec toi à plusieurs reprises.

A Philippe Ruminy et toute l'unité INSERM U918, un grand merci de m'avoir permis de réaliser ce travail avec vous.

A tous les chefs qui m'ont patiemment formée pendant ces 5 années : Mme Lemoine, Florence Le Pessot, Sophie Patrier, Emmanuel Touré, Mr Picquenot, Anca Berghian, Liana Veresezan, Philippe Courville, Christel Boivin, Laurence Roquet, Mutaz Aziz, Arnaud François, Catalin Craciunescu.

A mes anciens co-internes maintenant chefs aguerris : Nico bien sûr, Emilie (un plaisir d'avoir travaillé avec toi grâce à ta rigueur et ta bonne humeur ; un secteur unique, le seul où l'on serre la main de nos patients !), Maxime.

Aux co-internes qui sont maintenant bien plus :

Fanny et Marie, mes chères amies pintades, quelles soirées de gloussements mémorables, nous avons fait siffler les oreilles de toute la gent masculine !

Fanny, j'apprécie tant ta spontanéité, ton dynamisme, ton oreille toujours attentive, nos heures passées chez Dame Cake. Tu sais à quel point je te souhaite tout le bonheur que tu mérites amplement !

Marie, que de chemin parcouru depuis notre rencontre ! Fini le gardiennage de bouquet, maintenant tes rêves sont exaucés et tu suis une autre voie. Prix de Diane, natation, courses en duo, robes de mariée, confidences... une liste éclectique, incomplète, pour retranscrire tous ces bons moments !

Floflo, un véritable ami et soutien dans le service, une complicité qui va énormément me manquer. Et que dire de notre rituel ciné/Pringles ! Cet internat aura été insuffisant pour terminer ma « mission », mais ce n'est pas une raison pour arrêter de chercher !

A mes co-internes qui ont contribué à l'excellente ambiance de travail de cet internat :

Agnès (pour la « découpe » et nos dégustations de mets italien), Hélène (alliée dans les galères du mémoire et de la thèse), Michaël (le plus grand gentleman corse et de si bons souvenirs de notre semestre ensemble, les préparatifs de ton mariage étaient passionnants !) Laetitia (les expertes des relations longue-distance), Lucie (fan elle aussi de Jack Johnson), Gwendoline (chapeau pour ta capacité à tout mener de front), Pierre (je croise les doigts pour ta thèse), Elsa (LA wedding planner, mon ancienne externe préférée, Galilée en force) Mohammed (un calme olympien), Mathilde (et nos heures en IF), Marie (vivement le prochain Eurovision), Lucille (contente que tu aies trouvé ta voie), Laura (bon déménagement), Emeline (bon courage pour la suite), Dalia (et ses célèbres hugs).

A l'équipe du LGST, un semestre que j'ai tout particulièrement apprécié, un grand merci à vous toutes !

Merci Aude : tu m'as fait découvrir de manière rigoureuse une spécialité passionnante. Travailler avec toi était très convivial et restera un excellent souvenir !

Aux équipes des techniciens du 1<sup>e</sup>, du 3<sup>e</sup> et du 4<sup>e</sup> et à l'équipe du secrétariat : un travail très agréable au quotidien avec vous. Une pensée particulière pour Annie.

Au service de médecine du travail du Pr Gehanno, pour leur accueil et cette expérience très enrichissante.

A mes amis si précieux :

Pierre, présent depuis toujours

La Team Galilée : Charlotte, Max, Max et Mélanie, Bastien, Myriam et Cédric. L'année de Terminale a été un véritable « déclin » pour moi

Les P2 : Marie (un merci tout particulier), Audrey, Manu, Caroline

Aux « nouveaux venus » : Jul', Greg, Pierre et Béatrice, Pierre-Louis et Amélie, Charles et Marion, Augustin et Mathilde

A ma famille :

Mes parents, Sylvie et Philippe, pour les valeurs que vous m'avez transmises, pour être toujours présents à votre façon, pour notre famille heureuse et unie, pour nous voir appris qu'« on ne voit bien qu'avec le cœur »

Mes sœur et frères, quelle fierté d'être votre grande sœur : Laura (notre périple à New-York a resserré encore d'avantage nos liens), Arthur (c'est aussi ta journée, nous finissons nos études pile en même temps, félicitations !), Félix (notre roudoudou, contente que tu perpétues la tradition scout de la famille)

Mes grand-mères Yvette et Suzanne

Ma tante Maryvonne et mon oncle Yves

A Marie, Gilles, Pauline et Antoine et Lucie : pour votre accueil si chaleureux et ces déjà nombreux beaux moments passés avec vous et toute votre grande famille

A mon merveilleux Clément,  
Etre à tes côtés est le plus doux des bonheurs  
Je suis comblée

*« Here come the train upon the track ....  
.... again, again »*

*« si tu m'apprivoises, nous aurons besoin l'un de l'autre.  
Tu seras pour moi unique au monde.  
Je serai pour toi unique au monde... »*

A mon grand-père Pierre  
Tu nous manques beaucoup  
J'espère que tu es fier de moi  
Je te dédie toutes ces années d'étude et ce travail

*« Il faut bien que je supporte deux ou trois chenilles si je  
veux connaître les papillons. Il paraît que c'est tellement beau. »*

Le petit Prince, A. De Saint-Exupéry

## Table des matières

I.	Liste des abréviations .....	20
II.	Introduction.....	21
A.	Cancer du poumon .....	22
1.	Épidémiologie.....	22
2.	Classification histologique des tumeurs malignes primitives pulmonaires .....	23
a)	Carcinomes non à petites cellules pulmonaires (CNPCP).....	24
b)	Carcinome à petites cellules (CPCP).....	25
c)	Autres (tumeurs non carcinomateuses).....	26
B.	L'adénocarcinome pulmonaire .....	26
1.	Classification histologique.....	26
a)	Hyperplasie adénomateuse atypique, adénocarcinome in situ et adénocarcinome à invasion minimale .....	27
b)	Adénocarcinome à prédominance lépidique .....	28
c)	Adénocarcinome à prédominance acineuse .....	28
d)	Adénocarcinome à prédominance papillaire .....	28
e)	Adénocarcinome à prédominance micro-papillaire.....	29
f)	Adénocarcinome à prédominance solide.....	29
g)	Variants.....	30
2.	Stratégie diagnostique de l'adénocarcinome pulmonaire .....	31
a)	Clinique.....	31
b)	Imagerie.....	31
c)	Biopsie et cytologie .....	31
d)	Anatomopathologie.....	32
3.	Prise en charge thérapeutique de l'adénocarcinome pulmonaire.....	36
C.	L'adénocarcinome pulmonaire : une maladie génétique .....	38
1.	Cancérogénèse .....	38
2.	Biomarqueurs et thérapies ciblées.....	41
a)	EGFR .....	41
b)	Réarrangements géniques.....	42
c)	Autres biomarqueurs.....	43
d)	Plateformes de génétique moléculaire des cancers : un atout français .....	45
D.	Réarrangements géniques dans l'adénocarcinome pulmonaire .....	46
1.	ALK.....	46
a)	Oncogénèse.....	46
b)	Caractéristiques cliniques.....	48

c)	Traitement.....	49
2.	ROS.....	51
a)	Oncogénèse.....	51
b)	Caractéristiques cliniques.....	52
c)	Traitement.....	53
3.	RET.....	54
a)	Oncogénèse.....	54
b)	Caractéristiques cliniques.....	54
c)	Traitement.....	55
4.	Détection des translocations.....	55
a)	Caryotype.....	55
b)	IHC couplée à la FISH : le "gold standard" actuel au CHU de Rouen.....	56
c)	RT-PCR en temps réel.....	62
d)	NGS (Next Generation Sequencing).....	63
III.	Objectif.....	65
IV.	Matériel et méthode.....	66
A.	La LD-RTPCR.....	66
B.	Kit de LD-RTPCR pour la détection de réarrangements dans l'adénocarcinome pulmonaire..	68
C.	Cohorte.....	69
D.	Analyses de biologie moléculaire.....	70
1.	Extraction de l'ARN.....	70
2.	Reverse transcription.....	70
3.	Hybridation des amorces de LD-RTPCR.....	70
4.	Ligation.....	71
5.	Séquençage.....	71
E.	Analyses statistiques.....	71
V.	Résultats.....	72
A.	Données anatomopathologiques et cliniques.....	72
1.	ALK.....	72
2.	ROS.....	74
3.	RET.....	76
4.	Témoins négatifs.....	77
B.	Résultats de LD-RTPCR.....	77
1.	Témoins positifs.....	77
a)	ALK.....	77
b)	ROS.....	79
c)	RET.....	81

d)	Relecture des cas discordants .....	81
2.	Témoins négatifs .....	82
VI.	Discussion .....	83
A.	Eléments pouvant entraîner des discordances .....	83
1.	Quantité et qualité du matériel tumoral.....	83
a)	Nombre de cellules tumorales .....	83
b)	Proportion de cellules tumorales et surface du prélèvement .....	83
c)	Qualité de l'ARN .....	83
d)	Exclusion des cas non contributifs .....	83
2.	IHC .....	84
3.	FISH.....	84
4.	Mutation d'un autre biomarqueur.....	85
5.	Exhaustivité du kit de détection.....	85
6.	Séquençage .....	85
B.	Limites de la technique de référence.....	85
C.	Reproductibilité chez un même patient.....	86
D.	Réponse à la thérapie ciblée .....	86
E.	Place de la LD-RTPCR .....	86
VII.	Conclusion .....	89
VIII.	Annexes .....	90
A.	Témoins ALK+ .....	90
1.	Données anatomo-cliniques.....	90
2.	Données de biologie moléculaire.....	91
3.	Exemples .....	92
B.	Témoins ROS.....	96
1.	Données anatomo-cliniques.....	96
2.	Données de biologie moléculaire.....	96
3.	Exemples .....	97
C.	Témoin RET.....	102
1.	Données anatomo-cliniques.....	102
2.	Données de biologie moléculaire.....	102
3.	Résultats.....	102
IX.	Bibliographie.....	103

# I. Liste des abréviations

ADKP : Adénocarcinome pulmonaire

ADN : Acide Désoxyribonucléique

ADNc : ADN complémentaire

ALK + : Présence d'un réarrangement de *ALK*

ALK - : Absence de réarrangement de *ALK*

AMM : Autorisation de Mise sur le Marché

ARNm : Acide Ribonucléique messenger

CEP : Carcinome Epidermoïde Pulmonaire

CNPCP NOS : Carcinome Non à Petites Cellules Pulmonaire sans autre spécification (*Not Otherwise Specified*)

CNPCP : Carcinome Non à Petites Cellules Pulmonaire

CPCP : Carcinome à Petites Cellules Pulmonaire

FISH : Hybridation *in situ* fluorescente (*Fluorescence In Situ Hybridization*)

FISH + : Présence d'un réarrangement génique détecté par FISH

FISH - : Absence de réarrangement génique détecté par FISH

HES : Hématéine Eosine Safran

IHC : Immunohistochimie

INCa : Institut National du Cancer

LD-RT-PCR : Ligation Dependant-Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction

LGST : Laboratoire de Génétique Somatique des Tumeurs

NGS : Séquençage de Nouvelle Génération (*Next generation sequencing*)

PCR : *Polymerase Chain Reaction*

RCP : Réunion de Concertation Pluridisciplinaire

ROS + : Présence d'un réarrangement de *ROS*

ROS - : Absence de réarrangement de *ROS*

RT-PCR : *Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction*

TK + : Présence d'un réarrangement d'une tyrosine kinase

TK - : Absence de réarrangement d'une tyrosine kinase

TKI-ALK : Inhibiteur de tyrosine kinase de *ALK*

## II. Introduction

Le cancer est une maladie génétique : les "mutations conductrices", ou *driver mutations*, permettent aux cellules tumorales de proliférer, de résister à l'apoptose, d'être mobiles et de devenir immortelles (1). Ces dernières années, plusieurs *driver mutations* ont été décrites dans les adénocarcinomes du poumon (ADKP) : les principales intéressent les gènes *EGFR*, *KRAS*, *HER2*, *BRAF*, *ALK*, *ROS* et *RET* (2–9).

Suite à ces découvertes, des thérapies ciblant ces altérations moléculaires ont été développées, permettant l'essor d'une médecine dite "personnalisée" offrant aux patients de nouvelles options thérapeutiques adaptées au profil moléculaire de leur tumeur.

Il s'avère donc primordial d'identifier correctement ces mutations somatiques à l'aide de techniques performantes et faciles à mettre en œuvre.

## A. Cancer du poumon

### 1. Épidémiologie

Le cancer du poumon est le plus fréquent au monde (13 % des nouveaux cas de cancer par an), avec une prédominance masculine (sex ratio = 2,7), et la première cause mondiale de décès par cancer (19,4% des décès par cancer dans le monde) (10,11). On retrouve une disparité entre les régions du monde avec notamment une incidence plus importante dans les pays développés (11).

En France, le cancer du poumon représente, tous sexes confondus, la 4e cause de cancer (39 485 nouveaux cas en 2012, soit 11,1 % de l'ensemble des cancers) et la première cause de mortalité par cancer (29 949 décès en 2012, soit 20,1 % des cancers)(12). On retrouve une nette prédominance masculine (71% des nouveaux cas et 72% des décès (figures 1 et 2) (12)).



Figure 1 : Incidence et mortalité des cancers les plus fréquents chez l'homme en France en 2014 (13)



Figure 2 : Incidence et mortalité des cancers les plus fréquents chez la femme en France en 2014 (13)

L'âge médian au diagnostic en France est de 66 ans pour les hommes et 65 ans pour les femmes (12). Le cancer du poumon entraîne chaque année environ 12000 *décès prématurés* (avant 65 ans) (12). On constate chez les hommes une stabilité de l'incidence depuis 1980 avec une diminution de la mortalité, tandis que chez les femmes, l'incidence ainsi que la mortalité sont en augmentation depuis 1980 (figure 3) : il existe un parallèle certain avec l'intoxication tabagique qui est en baisse chez l'homme et en hausse chez la femme (12). Une étude française de 2015 montre toutefois une augmentation de la proportion de cancers pulmonaires survenant chez les non-fumeurs : ils sont passés de 7,2% à 10,9% entre 2000 et 2010, un tabagisme passif étant retrouvé chez 21% des patients (14).

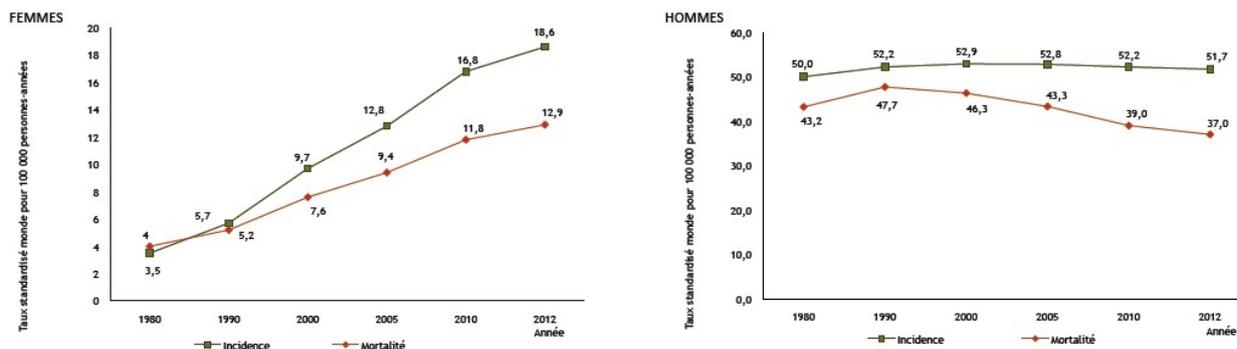


Figure 3 : Évolution de l'incidence du cancer pulmonaire et de sa mortalité (taux standardisé monde estimé) selon le sexe de 1980 à 2010 en France (12).

Le principal facteur de risque, connu depuis les années 1950, est le tabagisme : il serait à lui seul responsable de plus de 80% des cancers pulmonaires dans le monde (15,16). Le risque relatif de développer un cancer du poumon chez les fumeurs est de 8,96 par rapport aux non-fumeurs (15,16). Ce risque est d'avantage lié à la durée de l'intoxication tabagique qu'au nombre de cigarettes fumées. Le tabagisme augmente le risque de l'ensemble des différents types histologiques de cancer du poumon, et plus particulièrement celui des carcinomes épidermoïdes (CEP) (15,16). Cependant, la proportion d'adénocarcinomes pulmonaires (ADKP) liés au tabac est en augmentation du fait d'une modification de la composition des cigarettes (diminution de la teneur en nicotine entraînant une inhalation plus profonde, augmentation de la teneur en nitrosamines) (15,16). Le tabagisme passif est quant à lui responsable d'un sur-risque de cancer du poumon d'environ 20% (15,16).

Les expositions professionnelles à des toxiques, comme l'amiante, la silice ou les rayonnements ionisants, sont à l'origine de 5 à 10% des cancers du poumon dans les pays industrialisés (16) .

La pollution de l'air en milieu urbain entraîne un sur-risque d'environ 20% de développer un cancer du poumon par rapport au milieu rural. La pollution de l'air domestique (radon, fumées de combustion de charbon ou de bois, ...) est également un facteur de risque avéré (16). Le risque de développer un cancer du poumon lors d'une supplémentation en bêta-carotènes, associée au tabagisme, est discuté (16). Enfin, il existerait des prédispositions génétiques de développer un cancer du poumon, liées à des mutations somatiques de gènes tels que *CHRNA3/5* et *TERT* (17).

## 2. Classification histologique des tumeurs malignes primitives pulmonaires

La quasi-totalité des cancers du poumon sont des carcinomes, et 85% sont des carcinomes non à petites cellules (18). La fréquence des différents types histologiques a évolué : alors que le

carcinome épidermoïde a longtemps été le type histologique prédominant, il est depuis les années 2005 supplanté par l'adénocarcinome (18).

a) *Carcinomes non à petites cellules pulmonaires (CNPCP)*

Le groupe des CNPCP regroupe de nombreuses entités, dont nous ne présenterons que les plus fréquentes.

- Adénocarcinome

L'ADKP représente 40% des cancers pulmonaires dans le monde, son incidence étant en augmentation depuis les années 1990 (15). Cette entité fera l'objet d'un paragraphe spécifique (chapitre B : l'adénocarcinome pulmonaire).

- Carcinome épidermoïde (CEP)

Vingt pourcent des cancers du poumon sont des carcinomes épidermoïdes. Il s'agit d'une tumeur épithéliale qui, lorsqu'elle est bien différenciée, est classiquement kératinisante (figure 4) et comporte des ponts intercellulaires (figure 4). Elle est de localisation le plus souvent proximale. Les cellules tumorales ont classiquement un profil immunohistochimique p40+ et TTF1- (15).

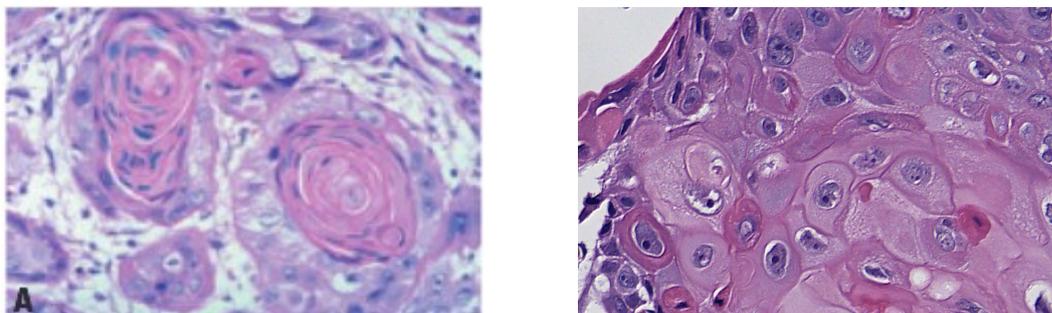


Figure 4 : Carcinome épidermoïde bien différencié kératinisant (à gauche) (11), détail des ponts inter-cellulaires (à droite)

- Carcinome neuroendocrine à grandes cellules

Il s'agit d'une tumeur neuroendocrine périphérique, souvent développée dans les lobes supérieurs, liée au tabac (15). Elle est constituée de cellules de grande taille, nucléolées, au cytoplasme abondant, se disposant sous forme de travées, de nids avec une bordure palissadique ou de rosettes (figure 5). Ces cellules expriment les marqueurs neuroendocrine (CD56, chromogranine et synaptophysine) et dans la moitié des cas le TTF1 (15).

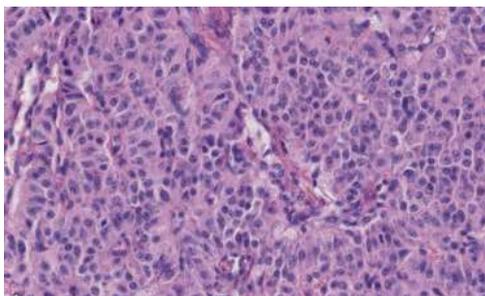


Figure 5 : Carcinome neuroendocrine à grandes cellules (19)

- Carcinome adénosquameux

Cette tumeur comporte 2 contingents : l'un adénocarcinomateux et l'autre épidermoïde, chacun devant représenter au moins 10% de la tumeur (figure 6). Elle représente 0,4 à 4% des cancers du poumon (15).

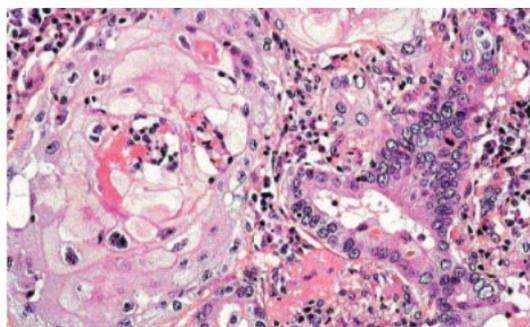


Figure 6 : Carcinome adénosquameux (11)

- Carcinome à grandes cellules

C'est une tumeur indifférenciée ayant une morphologie et un profil immunohistochimique ne pouvant être rattaché à aucun autre sous-type histologique de CNPC. Il s'agit d'un diagnostic d'exclusion porté dans 2% des cas de cancer du poumon, uniquement sur pièce opératoire (15).

- Autres types

Parmi les autres types de CNPCP, on peut citer les tumeurs carcinoïdes (typiques et atypiques), le carcinome pléomorphe, le carcinosarcome ou les tumeurs de type glande salivaire.

#### b) *Carcinome à petites cellules (CPCP)*

C'est une tumeur neuro-endocrine représentant 13% des cancers du poumon, associée au tabagisme (15). Elle se présente le plus souvent sous la forme d'une masse péri-hilaire et est composée de petites cellules épithéliales au noyau basophile, avec un nucléole absent ou discret et de fréquentes images de *moulage nucléaire*, au cytoplasme peu abondant, disposées en plages compactes (figure 7) (15). On retrouve fréquemment des artéfacts d'écrasement. Elles expriment classiquement les

marqueurs neuro-endocrines (CD56, chromogranine et synaptophysine) ainsi que le TTF1 et présentent un index de prolifération très élevé (en moyenne  $\geq 80\%$ ) (15).

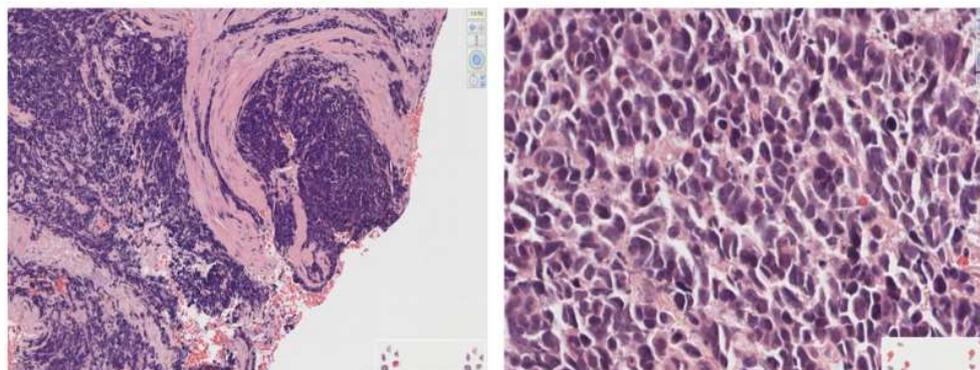


Figure 7 : Carcinome à petites cellules (19)

*c) Autres (tumeurs non carcinomateuses)*

Les autres types tumoraux sont exceptionnels et se composent des tumeurs mésoenchymateuses (hémangioendothéliome épithélioïde, synoviosarcome,...), des tumeurs lymphohistiocytaires (lymphome de MALT, lymphome B diffus à grandes cellules, granulomatose lymphomatoïde, ...) et des tumeurs d'origine ectopique ( tumeurs germinales, mélanome, thymome intra-pulmonaire et méningiome).

## B. L'adénocarcinome pulmonaire

### 1. Classification histologique

La classification de l'ADKP a été revue en 2011 par l'IASLC/ATS/ERS afin d'homogénéiser les critères diagnostiques et les terminologies des différents sous-types, d'obtenir une meilleure corrélation pronostique et d'optimiser le choix du traitement (figure 8) (18). Celle-ci a été intégrée à la nouvelle classification des tumeurs pulmonaires de l'OMS en 2015 (15).

- Preinvasive lesions
  - Atypical adenomatous hyperplasia
  - Adenocarcinoma in situ ( $\leq 3$  cm formerly BAC)
    - Nonmucinous
    - Mucinous
    - Mixed mucinous/nonmucinous
- Minimally invasive adenocarcinoma ( $\leq 3$  cm lepidic predominant tumor with  $\leq 5$  mm invasion)
  - Nonmucinous
  - Mucinous
  - Mixed mucinous/nonmucinous
- Invasive adenocarcinoma
  - Lepidic predominant (formerly nonmucinous BAC pattern, with  $>5$  mm invasion)
    - Acinar predominant
    - Papillary predominant
    - Micropapillary predominant
    - Solid predominant with mucin production
- Variants of invasive adenocarcinoma
  - Invasive mucinous adenocarcinoma (formerly mucinous BAC)
    - Colloid
    - Fetal (low and high grade)
    - Enteric

---

BAC, bronchioloalveolar carcinoma; IASLC, International Association for the Study of Lung Cancer; ATS, American Thoracic Society; ERS, European Respiratory Society.

Figure 8 : Nouvelle classification de l'adénocarcinome pulmonaire selon l'IASLC/ATS/ERS (18)

C'est une tumeur épithéliale présentant, lorsqu'elle est bien différenciée, une architecture glandulaire et une production de mucines (mises en évidence par les colorations par le PAS (Periodic Acid Schiff) et le bleu alcian) ou exprimant les marqueurs pneumocytaires (TTF1 et NapsinA) (15). Cette tumeur est classée en fonction de son sous-type architectural prédominant, en précisant le pourcentage de chaque sous-type présent. Par ailleurs, il existe des variants histologiques.

a) *Hyperplasie adénomateuse atypique, adénocarcinome in situ et adénocarcinome à invasion minimale*

L'hyperplasie adénomateuse atypique est une lésion pré-invasive localisée de petite taille ( $< 5$  mm). Elle correspond à la prolifération de pneumocytes de type II ou de cellules de Clara, avec atypies légères à modérées, le long des cloisons alvéolaires. Celles-ci restent fines et sont dépourvues d'inflammation (15).

Le stade plus avancé de lésion pré-invasive correspond à l'adénocarcinome in situ. Il peut atteindre jusqu'à 3 cm de grand axe (15).

L'adénocarcinome à invasion minimale est une tumeur localisée, de moins de 3 cm, d'architecture lépidique prédominante (prolifération le long des cloisons alvéolaires), et comportant un foyer d'invasion de 5 mm maximum. Il n'y a pas d'embol tumoral endovasculaire, ni d'invasion pleurale ni de nécrose (15).

Il s'agit de lésions ayant un excellent pronostic (15).

b) *Adénocarcinome à prédominance lépidique*

Il s'agit d'une prolifération tumorale suivant les cloisons alvéolaires qui comporte un foyer invasif de plus de 5 mm de grand axe (figure 9). L'invasion se caractérise par la présence d'un sous-type autre que lépidique, d'une stroma-réaction, d'une invasion pleurale ou d'embols vasculaires ou intra-alvéolaires. On peut retrouver des plages de nécrose. C'est une tumeur de bon pronostic (survie à 5 ans de 90%) (15).

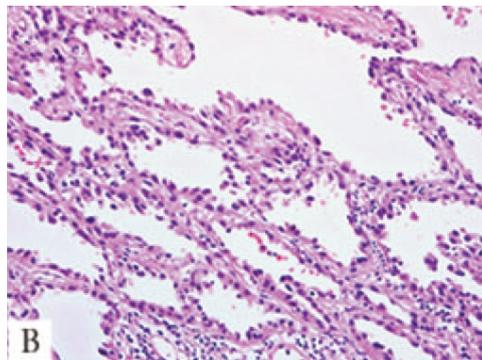


Figure 9 : Adénocarcinome à prédominance lépidique (18)

c) *Adénocarcinome à prédominance acineuse*

Cette tumeur est composée de glandes rondes à ovalaires, à lumière le plus souvent bien visible, disposées au sein d'un stroma myofibroblastique (figure 10) (15). Les cellules tumorales ou les lumières glandulaires peuvent contenir des mucines (15). On peut également observer une architecture cribriforme, de moins bon pronostic. C'est une tumeur de pronostic intermédiaire (15,18).

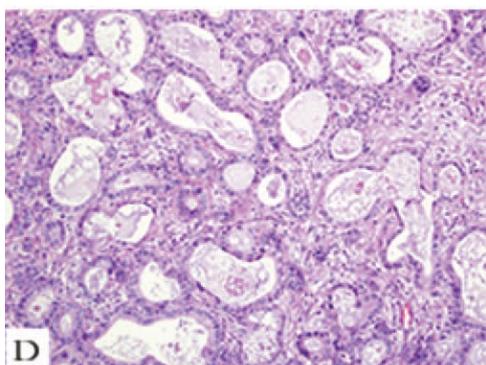


Figure 10 : Adénocarcinome à prédominance acineuse (18)

d) *Adénocarcinome à prédominance papillaire*

Les cellules tumorales prolifèrent le long d'axes fibro-vasculaires pour former des papilles (figure 11) (15). On peut également observer des papilles au sein des espaces alvéolaires (15). Il s'agit d'une tumeur de pronostic intermédiaire (15,18).

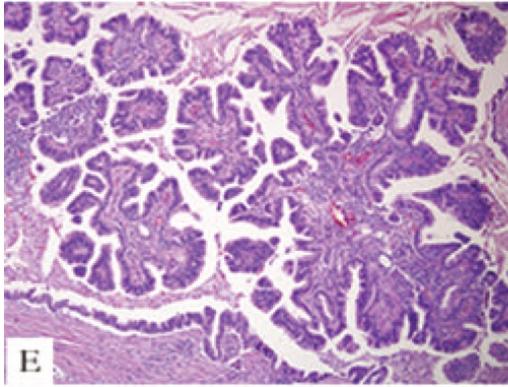


Figure 11 : Adénocarcinome à prédominance papillaire (18)

e) *Adénocarcinome à prédominance micro-papillaire*

Les cellules tumorales se disposent sous forme de petites touffes dépourvues d'axe fibro-vasculaire, attachées ou non aux parois alvéolaires (figure 12) (15). Les cellules tumorales sont petites et cubiques, avec des atypies cytonucléaires légères (15). Il s'y associe parfois des microcalcifications (15). C'est une tumeur de mauvais pronostic où l'on retrouve fréquemment des embolus tumoraux endo-vasculaires (15,18).

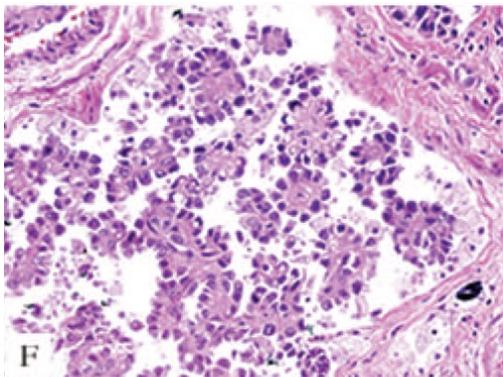


Figure 12 : Adénocarcinome à prédominance micro-papillaire (18)

f) *Adénocarcinome à prédominance solide*

Il s'agit d'une tumeur composée de massifs tumoraux compacts dépourvus d'architecture lépidique, acineuse, papillaire ou micro-papillaire (figure 13) (15). Lorsque la tumeur est composée exclusivement d'un contingent solide, il est nécessaire de confirmer sa nature adénocarcinomateuse en recherchant la présence d'au moins 5 cellules mucosécrétantes sur 2 grands champs ou à l'aide de l'anticorps anti-TTF1 qui doit être positif (15). C'est une tumeur de mauvais pronostic (15,18).

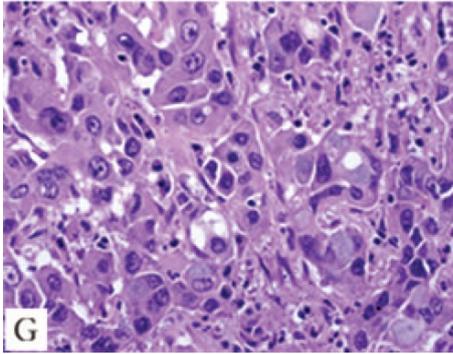


Figure 13 : Adénocarcinome à prédominance solide (18)

*g) Variants*

Il existe 4 variants d'adénocarcinome se distinguant par des caractéristiques autres que leur architecture.

- Adénocarcinome infiltrant mucineux

Les cellules tumorales sont caliciformes ou cylindriques et comportent une abondante quantité de mucine intra-cytoplasmique au niveau de leur pôle luminal (figure 14) (15). Les atypies cytonucléaires sont faibles voire absentes (15). Toutes les architectures peuvent être rencontrées, la plus fréquente étant le type lépidique (15). Cette tumeur est fréquemment multicentrique et bilatérale (15). Elle présente un profil immunohistochimique particulier avec une positivité de la CK7 et de la CK20 et une négativité du TTF1 (15).

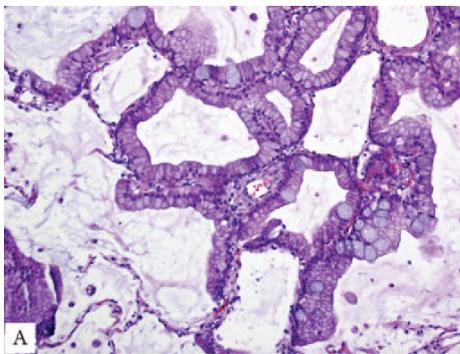


Figure 14 : Adénocarcinome infiltrant mucineux (18)

- Autre

L'adénocarcinome colloïde comporte de larges flaques de mucus distendant et rompant les alvéoles, donnant à cette tumeur un aspect macroscopique gélatineux caractéristique. Cette tumeur exprime les marqueurs digestifs (CK20 et CDX2) et exprime de manière faible et focale le TTF1 et la CK7.

L'adénocarcinome foetal ressemble à un parenchyme pulmonaire foetal.

L'adénocarcinome de type digestif possède une morphologie et un profil immunohistochimique similaires à ceux de l'adénocarcinome colorectal. Un bilan clinique et radiologique est indispensable afin de confirmer son caractère primitif et non métastatique.

## 2. Stratégie diagnostique de l'adénocarcinome pulmonaire

### a) *Clinique*

L'ADKP est dans 75% des cas diagnostiqué à un stade localement avancé ou métastatique en raison de l'apparition tardive des signes cliniques ou du caractère frustré et peu spécifique de ceux-ci (20). Il peut s'agir d'une altération de l'état général, d'une toux sèche rebelle, d'une douleur thoracique, d'une pneumopathie récidivante ou répondant mal à l'antibiothérapie ou plus rarement d'une hémoptysie (20). Lorsque la tumeur est étendue, une pleurésie, un syndrome cave supérieur ou un syndrome de Pancoast-Tobias peuvent être observés (20). Enfin, il peut exister des signes extra-thoraciques liés à la présence de métastase ou à un syndrome paranéoplasique (20).

### b) *Imagerie*

L'examen de première intention est la radiographie de thorax qui sera complétée par un scanner thoracique. Celui-ci permet de déterminer la taille, la localisation et les rapports de la tumeur avec les structures de voisinage.

Le bilan d'extension fera appel au scanner abdomino-pelvien et cérébral ainsi qu'au TEP-scan (Tomographie par Emission de Positons) et à la scintigraphie osseuse.

### c) *Biopsie et cytologie*

La confirmation de l'ADKP est histologique.

Le choix de la technique de prélèvement dépend de la localisation de la tumeur. De manière schématique, en cas de tumeur centrale, la biopsie est réalisée par fibroscopie bronchique. Si elle est périphérique, une biopsie trans-bronchique ou trans-thoracique sous scanner est réalisée. Lorsque ces techniques ne sont pas contributives, une thoracoscopie, une médiastinoscopie, une vidéo-thoracotomie exploratrice ou une écho-endoscopie oesophagienne peuvent être réalisées afin de biopsier la tumeur primitive ou des ganglions suspects. Les métastases peuvent également être biopsiées.

Les cytologies sont obtenues par lavage bronchiolo-alvéolaire, aspiration bronchique, brossage bronchique et rinçage de cathéter.

#### d) Anatomopathologie

- Biopsies

Les biopsies sont le plus souvent des prélèvements de petite taille (de l'ordre de quelques millimètres) à partir desquels plusieurs techniques doivent être réalisées afin de confirmer la présence d'un cancer, de préciser son type histologique et de rechercher une altération moléculaire somatique. Il s'agit de prélèvements "précieux" : ils sont obtenus par des techniques invasives difficilement renouvelables et constituent chez les patients inopérables le seul matériel tumoral disponible. Afin de préserver le prélèvement pour la biologie moléculaire, il convient de hiérarchiser la réalisation des techniques complémentaires à visée diagnostique et d'en limiter le nombre (21).

Ainsi, en 2011, un algorithme de prise en charge des biopsies a été publié et fait aujourd'hui référence (figure 15) (18). La détermination du type histologique tumoral se limite à différencier les CNPCP des CPCP, en précisant pour le CNPCP s'il s'agit plutôt d'un ADKP ou d'un CEP.

La première étape consiste à examiner une coupe colorée par l'HES (Hématéine-Eosine-Safran). Si la morphologie d'ADKP ou de CEP est évidente, aucune coloration ni étude immunohistochimique complémentaire n'est nécessaire.

En cas de suspicion morphologique de tumeur neuroendocrine, des marqueurs neuroendocrines (CD56, chromogranine et synaptophysine) sont réalisés ainsi qu'une cytokératine AE1/AE3.

Si l'aspect morphologique ne permet pas de distinguer un ADKP d'un CEP, une étude immunohistochimique à l'aide d'un marqueur malpighien (anticorps anti-p40) et d'un marqueur d'adénocarcinome (anticorps anti-TTF1), et/ou une coloration par PAS et bleu alcian à la recherche de mucines, sont réalisées. On conclura alors à un CNPCP "plutôt en faveur de", sans affirmer le type histologique.

Lorsque la morphologie, les colorations complémentaires et l'immunohistochimie (IHC) sont ambiguës, on conclura, après avoir éliminé une tumeur neuroendocrine, un autre type tumoral rare et une métastase, à un CNPCP "sans pouvoir orienter vers un type histologique" (CNPCP NOS).

Par ailleurs, les biopsies présentent l'inconvénient de ne pas être représentatives de l'ensemble de la tumeur et de ne pas permettre certains diagnostics, comme celui d'adénocarcinome *in situ*.

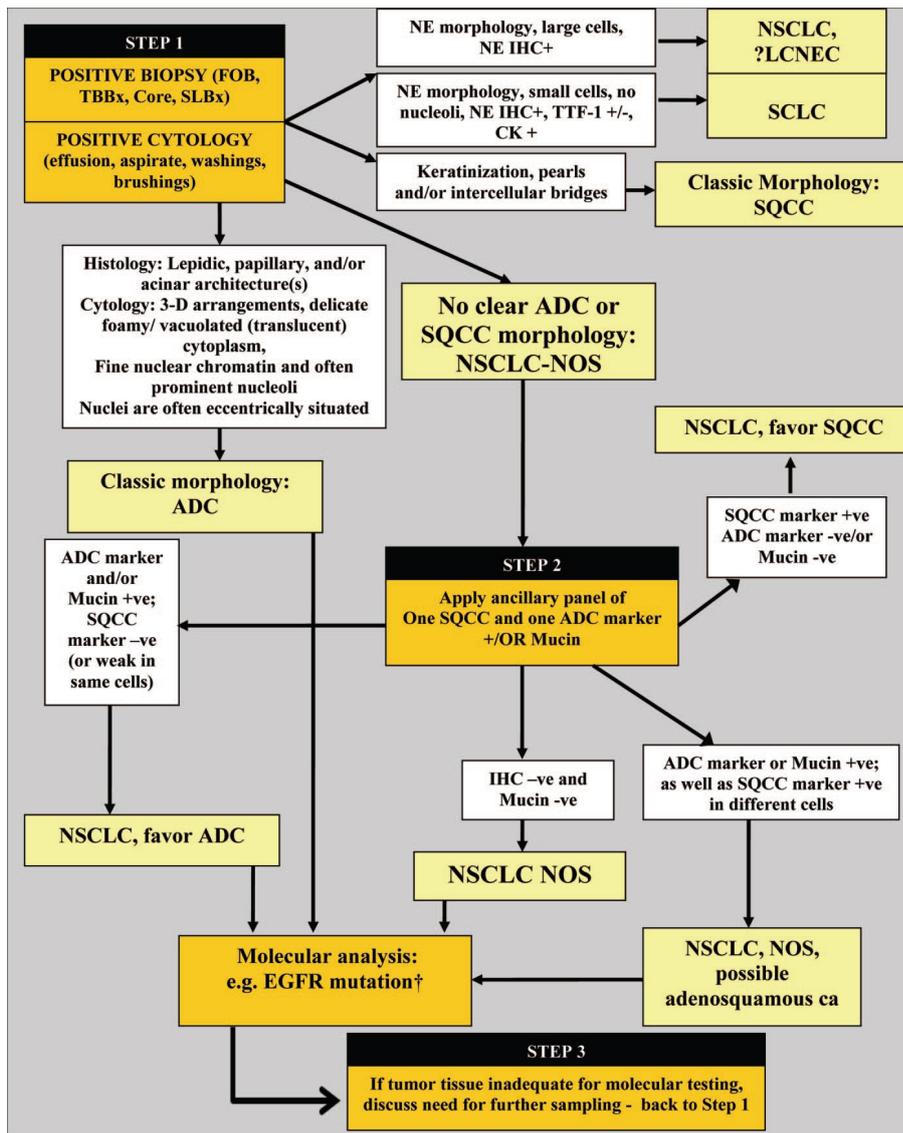


Figure 15 : Algorithme de prise en charges des biopsies broncho-pulmonaires (18)

- Cytologie

La démarche diagnostique est la même que pour les biopsies. La réalisation des techniques complémentaires est facilitée lorsque le liquide de cytologie est fixé au formol et inclus en paraffine en cytobloc.

- Pièces opératoires

Différents types de résections pulmonaires existent :

- le *wedge* ou résection pulmonaire dite "atypique" : il s'agit d'une exérèse non anatomique, c'est à dire ne suivant pas la segmentation pulmonaire
- la segmentectomie
- la lobectomie, bi-lobectomie ou pneumonectomie

Les pièces opératoires peuvent parvenir fraîches au laboratoire d'anatomopathologie afin que des prélèvements puissent être réalisés pour cryopréservation en tumorothèque (à visée sanitaire ou de recherche). Un examen extemporané peut être indiqué pour déterminer la nature de la lésion lorsque cela n'a pas pu être réalisé en pré-opératoire, ou pour étudier la qualité des marges d'exérèse.

L'examen macroscopique permet de préciser : la taille de la pièce ; le nombre, la taille et la localisation des tumeurs ; la couleur, la consistance et l'architecture de la tumeur ; la distance macroscopique entre la tumeur et les limites chirurgicales et la plèvre viscérale ; le rapport de la tumeur avec une bronche ; la présence de lésions non tumorales associées ; l'aspect du poumon non tumoral.

Après fixation au formol tamponné à 10%, des prélèvements ciblés sur la tumeur, les limites de résection chirurgicale, la plèvre, les ganglions lymphatiques et les lésions associées sont effectuées.

L'examen histologique permet ensuite de déterminer : le type histologique tumoral (à l'aide de colorations spéciales et d'immunomarquages si nécessaire); la taille du foyer invasif; la présence de marqueurs d'agressivité tumorale (embols tumoraux endovasculaires, engainements tumoraux périnerveux, nécrose); l'extension tumorale (envahissement de la plèvre viscérale, invasion des limites chirurgicales bronchique et vasculaires, diffusion tumorale aérogène); l'envahissement des ganglions; la nature des lésions associées.

A l'issue de cet examen, le stade pTNM peut être déterminé (figure 16) (22). Celui-ci permet une stratification par stades ayant une importante valeur pronostique (figure 17).

<b>TUMEUR PRIMITIVE (T)</b>	
<b>TX</b>	Tumeur qui ne peut être évaluée, ou tumeur démontrée par la présence de cellules malignes dans les expectorations ou un lavage bronchoalvéolaire sans visualisation de la tumeur par des examens endoscopiques ou d'imagerie
<b>T0</b>	Pas d'évidence de tumeur primitive
<b>Tis</b>	Carcinome <i>in situ</i>
<b>T1</b>	Tumeur ≤ 3 cm dans sa plus grande dimension, entourée par le poumon ou la plèvre viscérale, sans évidence bronchoscopique d'invasion de la bronche souche
<b>T1a</b>	Tumeur ≤ 2 cm dans sa plus grande dimension
<b>T1b</b>	Tumeur > 2 cm et ≤ 3 cm dans sa plus grande dimension
<b>T2</b>	Tumeur > 3 cm et ≤ 7 cm dans sa plus grande dimension ou présentant une des caractéristiques suivantes : - atteinte de la bronche souche à 2 cm ou plus de la carène - invasion de la plèvre viscérale - présence d'une atelectasie ou d'une pneumopathie obstructive s'étendant à la région hilare sans atteindre le poumon complet
<b>T2a</b>	Tumeur > 3 cm et ≤ 5 cm dans sa plus grande dimension
<b>T2b</b>	Tumeur > 5 cm et ≤ 7 cm dans sa plus grande dimension
<b>T3</b>	Tumeur > 7 cm ; ou envahissant directement une des structures suivantes : la paroi thoracique (y compris tumeur de Pancoast), le diaphragme, le nerf phrénique, la plèvre médiastinale ou le péricarde pariétal ; ou une tumeur dans la bronche souche à moins de 2 cm de la carène sans l'envahir ; ou associée à une atelectasie ou une pneumopathie obstructive du poumon entier ; ou présence d'un nodule tumoral distinct dans le même lobe
<b>T4</b>	Tumeur de toute taille envahissant directement une des structures suivantes : médiastin, cœur, gros vaisseaux, trachée, nerf laryngé récurrent, œsophage, corps vertébral, carène ; ou présence d'un nodule tumoral distinct dans un autre lobe du poumon atteint

<b>ADÉNOPATHIES RÉGIONALES (N)</b>	
<b>NX</b>	Les ganglions régionaux ne peuvent être évalués
<b>N0</b>	Pas de métastase ganglionnaire lymphatique régionale
<b>N1</b>	Métastase(s) dans les ganglions lymphatiques intrapulmonaires, péribronchiques et/ou hilaires homolatéraux, y compris par envahissement direct
<b>N2</b>	Métastase(s) dans les ganglions lymphatiques médiastinaux homolatéraux et/ou sous carénares
<b>N3</b>	Métastase(s) dans les ganglions lymphatiques médiastinaux controlatéraux, hilaires controlatéraux, scalènes ou sous-claviculaires homo- ou controlatéraux

<b>MÉTASTASES À DISTANCE (M)</b>	
<b>MX</b>	La présence de métastase(s) à distance ne peut être évaluée
<b>M0</b>	Absence de métastase à distance
<b>M1</b>	Présence de métastase(s) à distance
<b>M1a</b>	Nodule(s) tumoral(aux) distinct(s) dans un lobe controlatéral ; tumeur avec nodules pleuraux ou épanchement pleural (ou péricardique) malin
<b>M1b</b>	Métastase à distance

Figure 16 : Classification TNM 2010 (7<sup>e</sup> édition) (23)

Stade	T	N	M	Survie à 5 ans cTNM	Survie à 5 ans pTNM
IA	T1a, b	N0	M0	50 %	73 %
IB	T2a	N0	M0	43 %	58 %
IIA	T1a, b	N1	M0	36 %	46 %
	T2a	N1	M0		
	T2b	N0	M0		
IIB	T2b	N1	M0	25 %	36 %
	T3	N0	M0		
IIIA	T1, T2	N2	M0	19 %	24 %
	T3	N1, N2	M0		
	T4	N0, N1	M0		
IIIB	T4	N2	M	7 %	9 %
	Tout T	N3	M0	3 %	
IV	Tout T	Tout N	M1	2 %	

Figure 17 : Classification par stades (2010) et pronostic selon le stade (20)

- Biologie moléculaire

Actuellement, selon les recommandations de l'INCa, une recherche d'altération somatique des gènes *EGFR*, *ALK*, *KRAS*, *BRAF* et *HER2* est effectuée pour tous les ADKP, les CNPCP NOS, et pour certains

CEP chez le non-fumeur (23). En cas d'absence de mutation, une recherche de réarrangement du gène *ROS* et d'amplification du gène *MET* peut être effectuée selon les centres (figure 18).

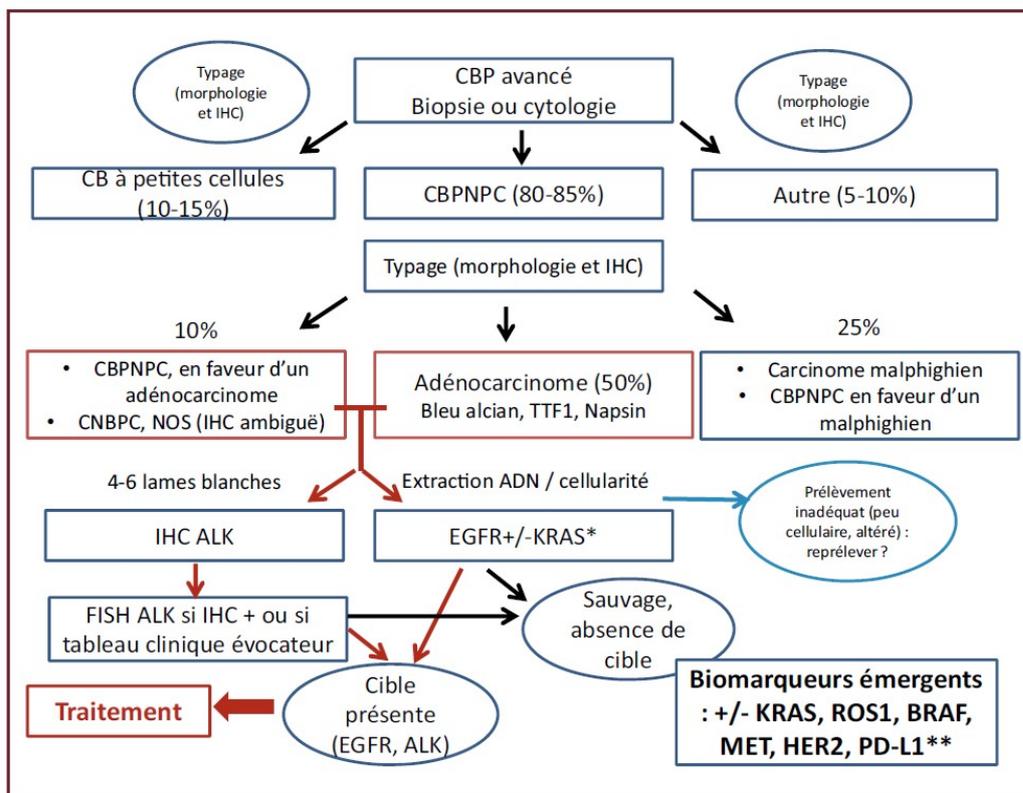


Figure 18 : Algorithme de prise en charge des cancers pulmonaires pour *testing* moléculaire (24)

Pour les gènes *EGFR*, *KRAS*, *BRAF* et *HER2*, ces analyses sont réalisées sur un extrait d'ADN obtenu à partir de tissu fixé au formol et incluí en paraffine. Les mutations peuvent être recherchées à l'aide de différentes techniques, notamment : séquençage de Sanger, pyroséquençage, SNaPshot®, analyse de fragment, PCR en temps réel, séquençage de nouvelle génération (NGS).

L'étude des gènes *ALK*, *ROS* et *MET* peut se faire indirectement par IHC (détection de la protéine de fusion) et directement par FISH (détection de la translocation) et sera détaillée ultérieurement (chapitre D-4 : Détection des translocations).

Le résultat est disponible dans un délai médian de 14 jours (24).

### 3. Prise en charge thérapeutique de l'adénocarcinome pulmonaire

Le choix thérapeutique est décidé en Réunion de Concertation Pluridisciplinaire (RCP) en fonction du type tumoral, du stade TNM, de l'âge, de l'état général, de la fonction respiratoire et des comorbidités du patient, en suivant les recommandations de l'INCa (23).

L'exérèse chirurgicale complète est le seul traitement curatif de l'ADKP. Il est préférable de réaliser au minimum une lobectomie. L'objectif est de réaliser une résection R0 (marges vasculaires, bronchiques et périphérie des structures réséquées en bloc histologiquement saines).

- Stades I à IIIB

Pour les tumeurs de stades I, II ou IIIA opérables, une exérèse chirurgicale complète est effectuée avec un curage ganglionnaire hilair et médiastinal. Une chimiothérapie néoadjuvante, une chimiothérapie et une radiothérapie adjuvantes seront discutées en fonction du stade TNM et de la qualité de la résection chirurgicale.

Les tumeurs de stade I ou II inopérables sont traitées par radiothérapie stéréotaxique ou, en cas de contre-indication, par radiothérapie externe associée ou non à une chimiothérapie, par chimiothérapie seule ou par ablation thermique.

En cas de tumeur de stade IIIA non opérable ou IIIB, le traitement repose sur la radiochimiothérapie concomitante.

- Stade IV

La prise en charge des tumeurs de stade IV étant déterminée par le statut mutationnel somatique, la recherche de mutation des biomarqueurs moléculaires est indispensable (figure 19).

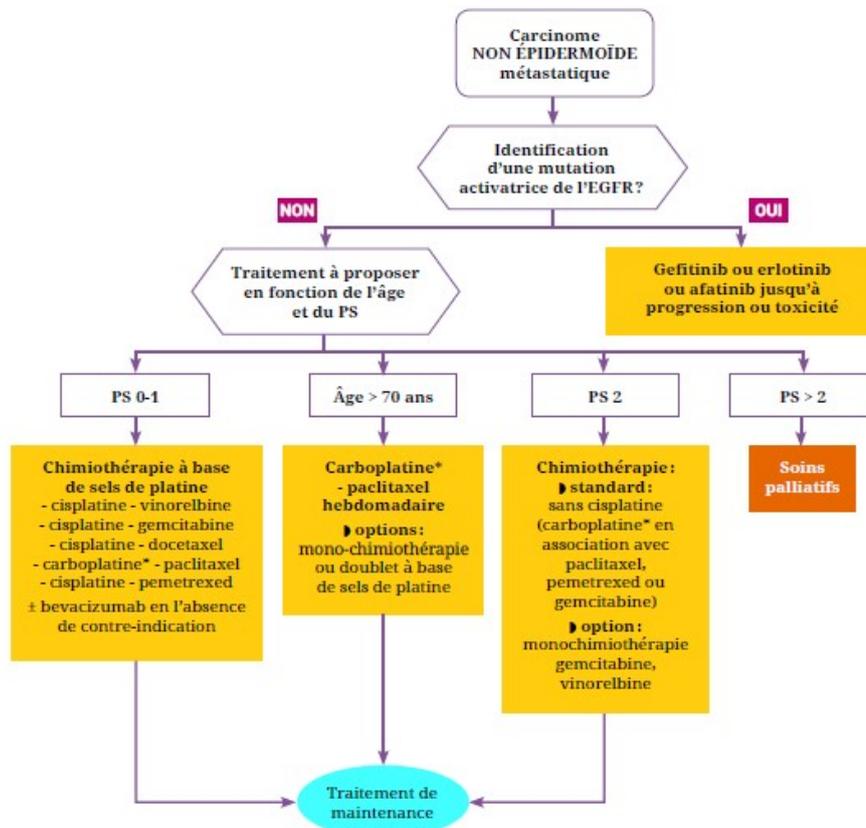


Figure 19 : Prise en charge thérapeutique des CNPCP non épidermoïdes métastatiques (23).

Si une mutation de sensibilité de l'*EGFR* est détectée, un inhibiteur de tyrosine kinase de l'*EGFR* (TKI-*EGFR*) (géfitinib, erlotinib ou afatinib) est prescrit en première ligne jusqu'à la survenue d'une toxicité ou d'une résistance. Lorsqu'une mutation de résistance est détectée secondairement, un traitement par TKI-*EGFR* de nouvelle génération (rocilétinib, AZD9291) peut être instauré dans le cadre d'essais cliniques (25).

En présence d'un réarrangement du gène *ALK*, un traitement ciblé par crizotinib est possible dès la première ligne de traitement. En cas de mutation d'un autre biomarqueur, le patient pourra être inclus dans un essai clinique. En l'absence de mutation somatique, les patients bénéficient d'une chimiothérapie d'induction (4 à 6 cycles) suivie d'un traitement de maintenance.

En cas de métastase unique, un traitement curatif bifocal par chirurgie ou radiothérapie pourra être discuté.

Les patients avec un score OMS (*performance status*) >2 relèvent d'un traitement palliatif.

## C. L'adénocarcinome pulmonaire : une maladie génétique

### 1. Cancérogénèse

Le développement tumoral est lié à l'acquisition par la cellule de capacités essentielles pour la croissance tumorale et la dissémination métastatique : dérégulation des signaux de prolifération, échappement aux signaux suppresseurs de prolifération, résistance à l'apoptose, immortalité, induction de l'angiogénèse, perte de l'adhésion cellulaire, échappement à la réponse immune et dérégulation du métabolisme énergétique (figure 20). Ces mécanismes agissent en synergie avec le microenvironnement tumoral (26).

Il s'agit d'un processus multi-étapes se développant grâce à 2 mécanismes principaux : l'instabilité génomique (survenue d'altération génomiques successives : mutations ponctuelles, réarrangements chromosomiques, modifications épigénétiques,...) et l'inflammation pro-tumorale (figure 20) (26).

Ces différentes altérations sont des cibles thérapeutiques potentielles (figure 20).

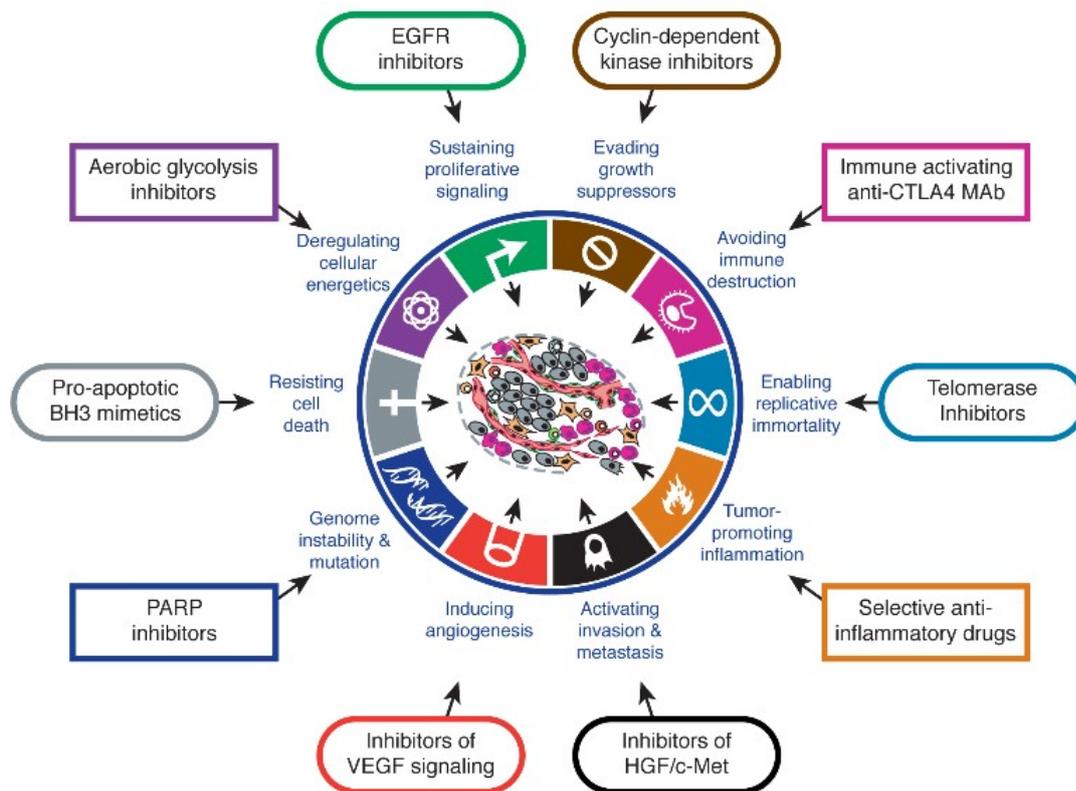


Figure 20 : Mécanismes de développement tumoral et thérapies ciblées (26)

Parmi les altérations dues à l'instabilité génomique, certaines ont une importance majeure : on les nomme *driver mutations*. Il s'agit de mutations cruciales, nécessaires à l'initiation et au maintien du processus tumoral. Les cellules développent une véritable *addiction oncogénique* à ces altérations (1). Les autres mutations présentes sont appelées mutations "passagères", ou *passenger mutations* : il s'agit de mutations accumulées au cours du temps, simples reflets de l'instabilité génétique des cellules et n'ayant pas d'effet sur le développement tumoral (27).

Le cancer du poumon résulte ainsi d'une importante instabilité génomique : il présente une grande hétérogénéité moléculaire du fait d'un taux de mutation somatique particulièrement élevé (8,87 par mégabase dans l'adénocarcinome pulmonaire versus 0,28 pour la leucémie aigue myéloblastique (28)). Ainsi, alors que la plupart des cancers comportent environ 30 à 70 mutations somatiques, on en retrouve jusqu'à près de 200 dans le CNPCP des fumeurs (figure 21) (27).

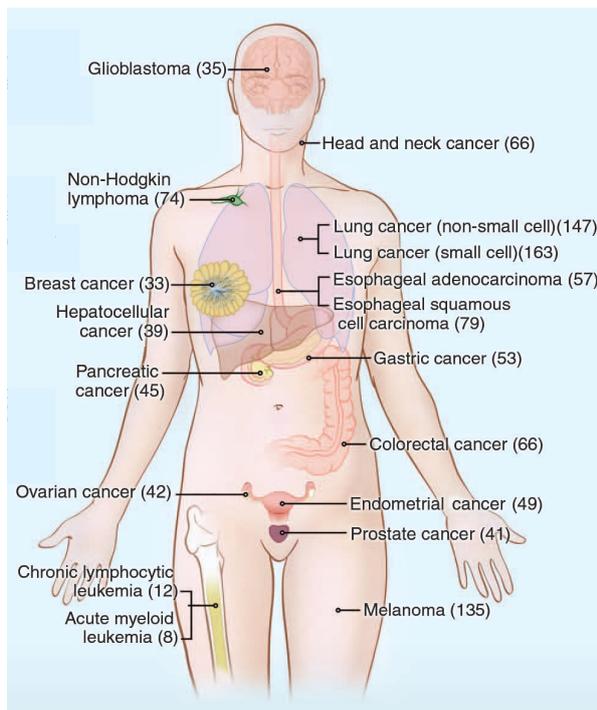


Figure 21 : Nombre de mutations somatiques dans les cancers de l'adulte (27)

Ceci s'explique par l'exposition du parenchyme pulmonaire à de nombreux carcinogènes ayant des effets mutagènes, tel que la fumée de cigarette. Ainsi, le profil mutationnel tumoral est différent selon le type histologique de la tumeur et selon l'exposition ou non à la fumée de cigarette : les non-fumeurs ont 10 fois moins de mutation somatique que les fumeurs (27), plusieurs travaux suggérant une corrélation entre la durée et l'importance du tabagisme avec le taux de mutation somatique (29,30). Les patients fumeurs présentent plus fréquemment des mutations somatiques de *KRAS* (47% vs 9% des non-fumeurs en France (31)), avec une répartition différente de chaque type d'altération (84% de mutation c.34G>T chez le fumeur vs 50% de mutation c.35G>A chez le non-fumeur (3)).

A ce jour, une vingtaine de gènes porteurs de *driver mutations* ont été identifiés dans le CNPCP (17). En France, un peu plus de 50% des ADKP comportent une des *driver mutations* actuellement recherchées grâce aux soutiens et programmes de recherche de l'INCa (figure 22), mais seuls environ 20% pourront être traités par thérapie ciblée (31). Cette répartition des différentes mutations varie selon le statut tabagique et le sexe (figure 23) (31)

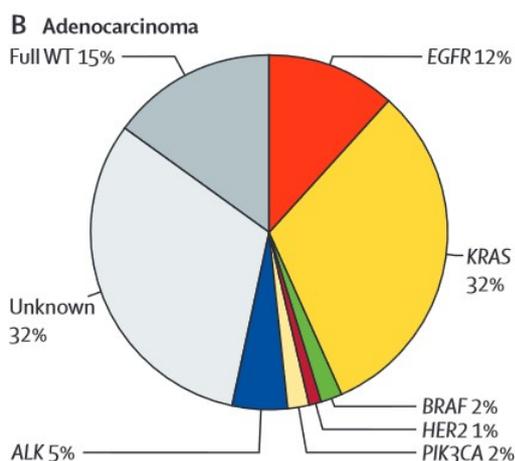


Figure 22 : Distribution des mutations somatiques dans l'adénocarcinome pulmonaire en France entre avril 2012 et avril 2013 (31)

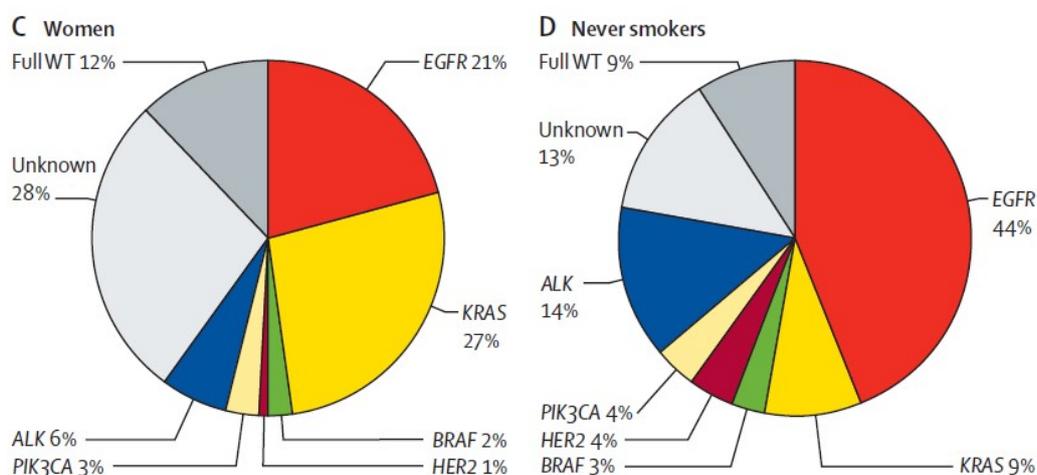


Figure 23 : Distribution des mutations somatiques dans le CNPCP en France entre avril 2012 et avril 2013 chez les patientes de sexe féminin et chez les non fumeurs (31)

## 2. Biomarqueurs et thérapies ciblées

### a) *EGFR*

La découverte de l'implication des mutations de l'*EGFR* dans l'oncogénèse pulmonaire et dans la réponse aux TKI-EGFR représente une avancée majeure dans la prise en charge des patients atteints de CNPCP.

Le récepteur à l'EGF (*EGFR*, aussi appelé *ERBB1*) est une protéine transmembranaire appartenant à la famille *ERBB* des récepteurs à tyrosine kinases qui contrôle plusieurs voies de signalisation intracellulaire (principalement les voies *RAS/RAF/MEK* et *PI3K/AKT/mTOR*). Celles-ci ont un rôle dans la croissance, la survie, la migration, la différenciation et l'adhésion cellulaire et dans l'angiogénèse (32).

L'activation constitutive de l'EGFR, indépendamment de son ligand, est due à une mutation activatrice du gène *EGFR* (32).

Le gène *EGFR* est localisé sur le chromosome 7. Les mutations somatiques retrouvées dans le CNPCP sont situées sur les exons 18 à 21 codant pour le domaine tyrosine kinase. Ces mutations sont présentes à l'état hétérozygote et entraînent soit une sensibilité, soit une résistance aux TKI-EGFR qui se fixent de manière compétitive au niveau de la poche ATP de l'EGFR. On les retrouve dans 10 à 20% des ADK pulmonaires au sein de la population caucasienne, quasi-exclusivement dans les ADKP (plus particulièrement dans les ADKP lépidoïde et papillaire avec une positivité de TTF1) (15). Les autres types histologiques ne comportent que très rarement des mutations de l'*EGFR*. Celles-ci sont par ailleurs plus fréquemment associées aux patients non-fumeurs, de sexe féminin et d'origine asiatique (15). Les patients EGFR+ ont un meilleur pronostic que les patients EGFR-, indépendamment de tout traitement par TKI (32).

Les principales mutations de sensibilité, qui représentent environ 80 à 85% de l'ensemble des mutations de l'*EGFR* dans le CNPCP, sont les délétions en phase au niveau de l'exon 19 et la mutation faux sens L858R au niveau de l'exon 21 (32,33). La mutation T790M, au niveau de l'exon 20, est une mutation de résistance le plus souvent secondaire, détectée chez environ 50% des patients traités par TKI-EGFR et échappant au traitement. Cette résistance survient généralement dans les 6 à 12 mois après l'introduction du traitement. Les insertions/duplications au niveau de l'exon 20, les amplifications de *MET* et d'*EGFR* sont également des mutations de résistance (32,33).

Les TKI-EGFR ont transformé le pronostic des ADKP. A titre d'exemple, les études de phase III d'évaluation du géfitinib ont montré un taux de réponse de 60% à 70% environ, contre 30% à 45% environ avec la chimiothérapie conventionnelle, avec une survie sans progression de 10 mois contre 5 à 6 mois (32). Depuis, plusieurs autres TKI-EGFR ont été développés (erlotinib, afatinib, ...) et les dernières avancées thérapeutiques portent sur les TKI-EGFR de 3<sup>ème</sup> génération, tels que le rocilétinib, efficaces en cas de mutation T790M (25).

#### b) Réarrangements géniques

Les réarrangements géniques surviennent suite à des cassures chromosomiques entraînant la formation d'un fragment de chromosome pouvant soit s'inverser (inversion), soit être échangé avec un fragment provenant d'un autre chromosome (translocation), soit être perdu (délétion) (figure 24). Ils mettent ainsi en relation 2 gènes normalement éloignés. Dans le CNPCP, ils peuvent impliquer les gènes *ALK*, *ROS* ou *RET* codant chacun pour des récepteurs transmembranaires à activité tyrosine kinase capables d'activer des voies de signalisation intra-cellulaires suite à la fixation d'un ligand sur leur domaine extra-cellulaire.

Les altérations de ces 3 gènes font l'objet d'un chapitre dédié (D : réarrangements géniques dans l'adénocarcinome pulmonaire).

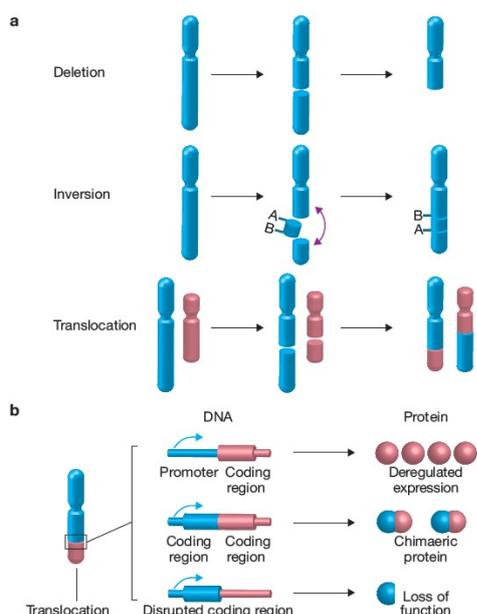


Figure 24 : a- réarrangements chromosomiques ; b-effet protéique des réarrangements géniques (34)

Les ADKP avec réarrangement d'une tyrosine kinase (TK+) semblent partager des caractéristiques communes : ils comportent fréquemment de la mucine extra-cellulaire, des contingents de type mucineux cribiforme, à cellules indépendantes ou à cellules hépatoides (7,35). Takeuchi et al suggèrent que l'absence de réarrangement serait un facteur indépendant de mauvais pronostic et la présence d'un réarrangement aurait la même valeur pronostique favorable que celle des mutations de l'*EGFR* (7) alors que Pan *et al* ne retrouvent pas de différence entre les TK+ et les TK- (35).

### c) Autres biomarqueurs

- KRAS

La protéine KRAS est située sur les voies de signalisation RAS/RAF/MEK/ERK et AKT/mTOR permettant de transmettre un signal d'activation depuis des récepteurs membranaires, comme l'*EGFR*, jusque vers le noyau cellulaire (3,36).

Les mutations somatiques de *KRAS* sont majoritairement présentes l'ADKP (77% vs 6% dans le CEP (31)), avec une prévalence de 32% au sein des ADKP diagnostiqués en France, et sont plus fréquemment retrouvées chez les fumeurs comme mentionné précédemment (31). Les hot-spots ("points chauds") mutationnels sont situés sur les codons 12 et 13 de l'exon 2. Il s'agit de mutations entraînant une activation constitutionnelle de la protéine KRAS (36,37).

La valeur pronostique des mutations somatiques de *KRAS* est encore débattue (38,39).

De nombreuses pistes thérapeutiques sont à l'étude (comme le blocage de KRAS ou de ses effecteurs, les thérapies spécifiques d'un type de mutation de KRAS, l'immunothérapie anti-PDL-1) : l'inhibition de *KRAS* reste toutefois un challenge du fait des nombreuses voies impliquées pouvant être source d'échappement thérapeutique (3).

- HER2

Le gène *HER2* (aussi appelé *ERBB2*) code également pour un récepteur à tyrosine kinase de la famille ERBB : *ERBB2*. Cette protéine est activée principalement suite à des insertions au niveau de l'exon 20 du gène *HER2* (4). Ces mutations sont retrouvées dans 2 à 4% (4) des CPNPC, exclusivement dans les ADKP et le plus souvent chez des femmes non-fumeuses (4,40). Des cas de mutation concomitante des gènes *EGFR*, *KRAS*, *ALK* ou *ROS* ont été décrits (4,40).

La valeur pronostique de cette mutation est encore débattue et il n'y a pour le moment aucune thérapie ciblée ayant l'AMM pour les patients présentant une altération de *HER2* (40). Une récente étude rétrospective multicentrique Européenne suggère qu'un traitement par trastuzumab ou trastuzumab+emtansine (T-DM1), associé à une chimiothérapie, pourrait apporter un bénéfice à ces patients (40). D'autres molécules, telles que le lapatinib, l'afatinib et le nératinib sont également à l'étude (40,41).

- BRAF

La protéine BRAF régule la voie de signalisation RAS-RAF-MAPK. Elle est codée par le gène *BRAF* dont les mutations somatiques sont majoritairement situées sur le codon 600 de l'exon 15 et sont retrouvées dans 2 à 7% des CPNPC (37,41). Dans 50% des cas, la mutation retrouvée est la V600E, mutation également le plus fréquemment retrouvée dans le mélanome (41).

La présence d'une mutation du gène *BRAF* n'aurait pas de valeur pronostique (41). Elle est par contre intéressante d'un point de vue thérapeutique. Des TKI-BRAF ont en effet été développés dans le cadre du mélanome (vémurafénib, dabrafénib) et sont actuellement évalués dans le traitement des CPNPC mutés *BRAF* (41). Des cas de réponse rapide au vémurafénib ont été décrits (42–44). Une étude internationale a montré un taux de réponse au vémurafénib de 42% dans le CPNPC (45). Par ailleurs, un essai de phase II avec du dabrafénib a montré un taux de réponse de 54% (46). Ces traitements sont toutefois limités par la survenue de résistances qui nécessiteront probablement d'utiliser des associations de molécules ciblant plusieurs voies oncogéniques simultanément (41).

- MET

Le gène *MET* code pour un récepteur membranaire à activité tyrosine kinase permettant d'activer les voies RAS/MAPK, PIK3/AKT/mTOR et JAK/STAT. Plusieurs altérations de *MET* sont décrites dans le CNPCP : surexpression de MET, mutations ponctuelles et amplification de *MET* (47). Cette dernière

est retrouvée dans moins de 5 % des cas et constitue également un des mécanisme de résistance aux TKI-EGFR (37,47). La sensibilité au traitement par crizotinib des tumeurs présentant une amplification de *MET* est en cours d'évaluation grâce au programme AcSE Crizotinib en France (48).

d) Plateformes de génétique moléculaire des cancers : un atout français  
Afin de garantir à chaque patient une équité des soins et une analyse rapide et fiable des biomarqueurs tumoraux, l'Institut National du Cancer (INCa) a créé en 2006 les Plateformes de génétique moléculaire des cancers. Elles sont financées par la Direction Générale de l'Offre de Soins (DGOS). Il en existe 28, rattachées à des établissements hospitaliers, réparties sur tout le territoire français (figure 25).



Figure 25 : Plateformes hospitalières de génétique somatiques des tumeurs (49)

Ainsi, la plateforme de Rouen, constituée du Laboratoire de Génétique Somatique des Tumeurs (LGST) et du laboratoire de cytogénétique et biologie moléculaire du Centre Henri Becquerel, a en charge tous les prélèvements relevant d'une analyse moléculaire provenant des services hospitaliers et cabinets privés d'anatomie et cytologie pathologiques d'une partie de la Normandie et de la Martinique.

Ces plateformes analysent les biomarqueurs pour lesquelles des thérapies ciblées ont l'AMM dans les cancers du sein, de l'estomac, colorectal et du poumon et dans les tumeurs stromales gastro-intestinales, les mélanomes et les leucémies (49). En France, en 2013, 89 254 tests à visée théranostique, prédictifs de la réponse à une thérapie ciblée, ont été réalisés chez 65 000 patients, dont 42 197 tests pour le cancer du poumon (49). Ces chiffres sont en augmentation constante du fait de l'apparition de nouvelles molécules (49).

Les plateformes analysent également des marqueurs diagnostiques (ex : recherche d'une instabilité microsatellitaire dans le cancer colorectal lors d'une suspicion de syndrome de Lynch), des marqueurs pronostics orientant le choix du traitement du patient (ex : recherche d'une amplification de *MYCN* dans le neuroblastome), des marqueurs de suivi (ex : quantification du réarrangement des gènes du TCR et des immunoglobulines dans le suivi de la maladie résiduelle dans la leucémie aigue lymphoblastique) et des marqueurs de pharmacogénétique constitutionnelle (49).

Par ailleurs, les plateformes anticipent l'arrivée de nouveaux traitements en analysant des biomarqueurs émergents pour lesquels des thérapies ciblées pourraient être disponibles à l'avenir. Dans le cancer du poumon, il s'agit des gènes *KRAS*, *HER2* et *BRAF*, dont les résultats ont fait l'objet du projet BIOMARQUEURS France (31).

Enfin, ces plateformes ont une place importante dans la recherche clinique grâce au programme AcSé (Accès Sécurisé à des thérapies ciblées innovantes) qui a débuté en juin 2013. Il s'agit d'un essai clinique de phase II visant à rechercher une altération moléculaire, indépendamment de la localisation et du type de cancer, chez des patients en échec thérapeutique afin de leur proposer une thérapie ciblée ayant déjà l'AMM pour un autre cancer présentant cette même altération (48,50). L'intérêt serait d'élargir les indications de ces traitements. Deux essais sont en cours :

- AcSé crizotinib : étude de l'efficacité du traitement par crizotinib chez les patients présentant des altérations des gènes *ALK*, *ROS* et *MET* (48)
- AcSé vémurafénib : étude de l'efficacité du traitement par vémurafénib chez les patients présentant une mutation V600 du gène *BRAF* (50)

## D. Réarrangements géniques dans l'adénocarcinome pulmonaire

### 1. ALK

#### a) *Oncogénèse*

Le gène *ALK* (*Anaplastic Lymphoma Kinase*) est situé sur le bras court du chromosome 2p23 et comporte 26 exons (51). Il est exprimé à l'état normal dans le système nerveux (51). Il code pour une protéine transmembranaire à activité tyrosine kinase appartenant à la superfamille des récepteurs à insuline (51). Celle-ci aurait un rôle dans le développement et le fonctionnement du système nerveux central et périphérique (51,52). Son ligand n'est pas connu (53).

Les translocations impliquant *ALK* sont des *driver mutations* ayant un pouvoir oncogénique en activant différentes voies de signalisation intra-cellulaire (*JAK/STAT*, *PIK3/AKT*, *MAPK*, ...) intervenant

dans la croissance cellulaire, la transformation cellulaire et l'inhibition de l'apoptose (figure 26) (52,54).

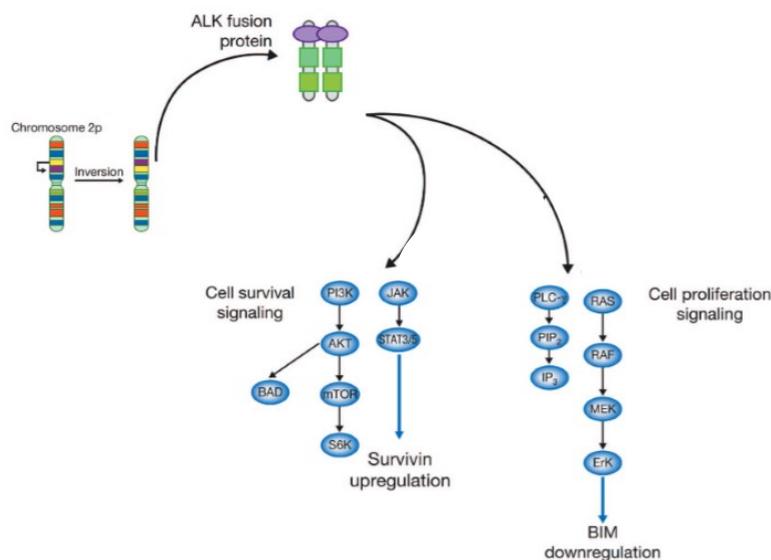


Figure 26 : Voies de signalisation contrôlées par ALK (55)

La fusion de *ALK* avec un gène partenaire a lieu suite à un réarrangement inter ou intra-chromosomique mettant en relation les régions codant pour le domaine tyrosine kinase de *ALK*, situées en 3' du gène, avec la région 5' d'un gène partenaire (56,57). La transcription de *ALK* est alors sous le contrôle du promoteur du gène partenaire (58). La protéine chimérique est intracytoplasmique et comporte à son extrémité C-terminale le domaine tyrosine kinase de *ALK* associée, à son extrémité N-terminale, au domaine *coil coil* ou *leucine zipper* du gène partenaire, conférant une activation constitutionnelle du domaine tyrosine kinase de *ALK* par dimérisation indépendante de la fixation de son ligant (51,56,57).

A ce jour, 10 gènes partenaires de *ALK* ont été identifiés : *EML4*, *TFG*, *KIF5B*, *KLC*, *STRN*, *HIP1*, *BIRC6*, *DCTN1*, *SEC31A* et *TPR* (5,53,55,59–72). Un réarrangement avec le gène *PTPN3*, ne comportant pas le domaine tyrosine kinase de *ALK*, a également été décrit, sans signification clinique connue (73). Pour un même gène partenaire, plusieurs variants existent selon la localisation du point de cassure (figure 27). Les 3 principaux variants de *EML4-ALK* (v1, v2 et v3a/b) représentent à eux seuls 70 % des réarrangements de *ALK* connus à ce jour dans l'ADKP (soit 85% des réarrangements *EML4-ALK*) (54,55).

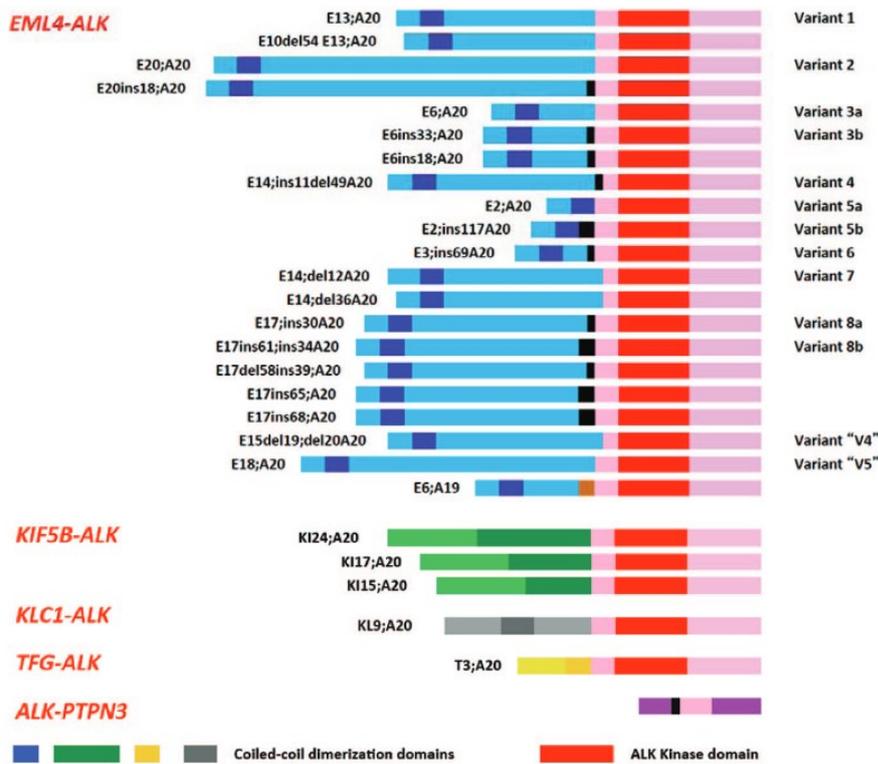


Figure 27 : Variants de *ALK* répertoriés en 2012 (55)

Pour illustrer ce phénomène, voici l'exemple du premier réarrangement décrit dans la littérature par Soda et al. en 2007 dans l'ADKP : la fusion de l'exon 13 de *EML4* et de l'exon 20 de *ALK* (5). *EML4* (*echinoderm microtubule-associated protein-like*) est également situé sur le chromosome 2, en position 2p21, séparé de *ALK* par 12 mégabases. Deux cassures surviennent sur le chromosome 2 : l'une dans l'intron situé entre les exons 19 et 20 de *ALK* et l'autre dans l'intron situé entre les exons 13 et 14 de *EML4*. Le fragment de chromosome ainsi formé se retourne et *ALK* et *EML4* se retrouvent accolés (figure 28).

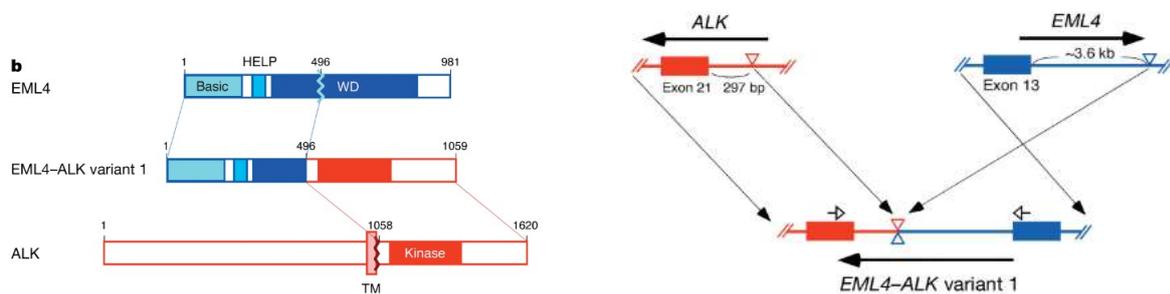


Figure 28 : Mécanisme de la translocation *ALK-EML4* (5)

### b) Caractéristiques cliniques

Environ 5% des CPNPC présentent un réarrangement de *ALK* (51). Des translocations de *ALK* sont décrites dans d'autres tumeurs comme le lymphome anaplasique à grandes cellules (tumeur dans laquelle une translocation de ce gène a été décrite pour la première fois, par Morris et al en 1994, d'où son nom (74)), le cancer papillaire de la thyroïde, le carcinome anaplasique de la thyroïde ou la

tumeur myofibroblastique inflammatoire (5,53,56). Des mutations ponctuelles ou des surexpressions de *ALK* sont présentes dans plusieurs cancers, comme le neuroblastome (53).

Les patients *ALK+* sont plus jeunes (entre 50 et 55 ans en moyenne) que les *ALK-* et sont peu ou non-fumeurs (75–80), sans distinction ethnique (53). Les tumeurs *ALK+* sont en très grande majorité des adénocarcinomes, avec comme caractéristiques la présence de contingents de type solide, mucineux cribriforme ou à cellules indépendantes, avec une abondante mucine extra-cellulaire (7,75,79,81). Il s'agit de tumeurs diagnostiquées à un stade plus avancé (75,79). Quelques cas d'adénocarcinome coexistant avec un contingent de carcinome épidermoïde ou sarcomatoïde ont été décrits (75,79,82), ainsi que la présence de psammomes (79). Ces caractéristiques cliniques et morphologiques ne sont toutefois pas suffisantes pour présumer de la présence ou non d'un réarrangement de *ALK*.

En 2013, Kim *et al.* ont montré que la fréquence des translocations de *ALK* était plus importante dans les métastases que dans les tumeurs primitives, ce résultat étant à confirmer à l'aide de cohortes de plus grande taille (83). Les métastases pleurales et péricardiques seraient plus fréquentes en cas de tumeurs *ALK+* (76).

Bien qu'il soit communément admis que les réarrangements de *ALK* sont mutuellement exclusifs des mutations des gènes *EGFR* et *KRAS* (84–87), 8% des tumeurs *ALK+* seraient également porteuses d'une mutation d'*EGFR* ou de *KRAS* (78).

La valeur pronostique des réarrangements de *ALK* reste débattue (7,80).

### c) *Traitement*

Le crizotinib est la première thérapie ciblée développée contre les tumeurs présentant un réarrangement de *ALK* ou *MET*. Il est approuvé aux États-Unis depuis août 2011 par la Food and Drug Administration et a obtenu l'AMM en France en octobre 2012 (avec la possibilité de le prescrire dès la première ligne de traitement depuis 2015). Il s'agit d'un inhibiteur de tyrosine kinase empêchant la phosphorylation du résidu tyrosine en entrant en compétition avec l'ATP.

Les essais cliniques de phase I à III ont montré un taux de réponse au traitement entre 53% et 65%, avec une survie sans progression entre 7,7 et 9,9 mois (77,78,88) (figure 29). La réponse est rapide (en moyenne 8 semaines après l'initiation du traitement, parfois quelques jours (78)). Il s'agit d'une avancée majeure dans le traitement de ces patients, le taux de réponse avec les traitements conventionnels n'étant que de 10% (77), bien que les patients *ALK+* aient une meilleure réponse au pemetrexed que les patients *ALK-* (89).

**Table 1** Efficacy results from phase I to phase III trials of crizotinib in patients ALK-positive tumors<sup>8,9</sup>

	A8081001 (phase I-II) <sup>9</sup>	Profile 1005 (phase II) <sup>8</sup>	Profile 1007 (phase III) <sup>8</sup>
	<i>n</i> = 143	<i>n</i> = 261	<i>n</i> = 173
Line of therapy	Any line	Second and beyond	Second line only
Overall response rate	64% (95% CI: 53%–70%)	53% (95% CI: 47%–60%)	65% (5% CI: 58%–72%)
Median duration of response (weeks)	49.1 (95% CI: 39.3–75.4)	42.9 (95% CI: 36.1–49.7)	32.1 (95% CI: 26.4–42.3)
Median progression-free survival, months	9.9 (95% CI: 7.7–13.4)	8.5 (95% CI: 6.5–9.9)	7.7 (95% CI: 6.0–8.8)
Overall survival probability at 12 months	75% (95% CI: 66%–82%)	61% (95% CI: 49%–71%)	Not reached

CI, confidence interval.

Figure 29 : Efficacité du crizotinib chez les patients ALK+ (88)

Ce traitement est cependant peu efficace sur les métastases cérébrales en raison de son faible passage à travers la barrière hémato-encéphalique (90).

Il s'agit d'un traitement administré par voie orale, bien toléré, les principaux effets secondaires étant des troubles digestifs, des troubles visuels et de l'œdème (77,78).

Toutefois, une résistance secondaire apparaît invariablement. Elle est due à une mutation ponctuelle de *ALK*, à une amplification de *ALK* ou à une activation d'une autre voie de prolifération cellulaire court-circuitant *ALK* (voies de l'EGFR, ...) (86,90–92) (figure 30). Des TKI-*ALK* de nouvelle génération existent pour traiter ces tumeurs résistantes. Le seul à voir l'AMM actuellement est le ceritinib. Plusieurs autres molécules sont en développement : l'alectinib (qui présente une bonne diffusion hémato-méningée), le ganetespil, l'AP26113 et le PF-06463922 (93,94).

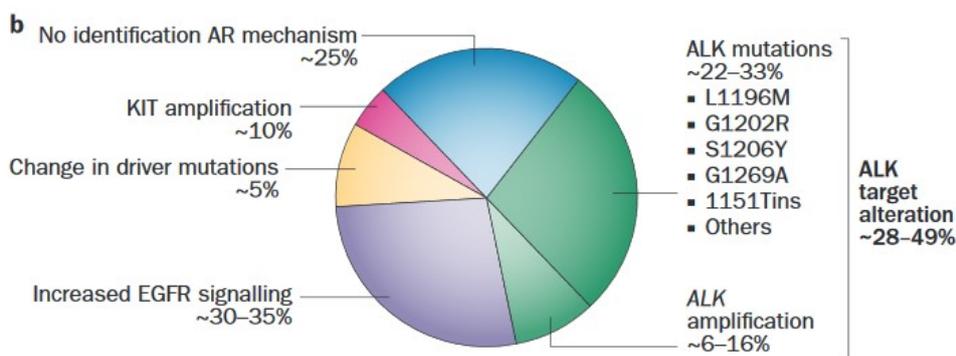


Figure 30 : Mécanismes de résistance secondaire au crizotinib (92)

La réponse au crizotinib est indépendante de la proportion de cellules tumorales réarrangées, cette variation de proportion reflétant d'avantage les aléas techniques (échantillon, interprétation) qu'une véritable hétérogénéité tumorale (95). La réponse au traitement serait également indépendante du type de positivité de la FISH (*split* ("cassure") ou *spot* ("point") rouge isolé) (95) et de la présence ou non d'une augmentation du nombre de copies de *ALK* avant le début du traitement (91,95).

En l'absence de réarrangement de *ALK*, la présence d'une amplification du gène *ALK* ou d'une polysomie du chromosome 2 n'a pas à l'heure actuelle de signification clinique (96).

*In vitro*, une variation de la réponse au crizotinib en fonction du gène partenaire et du variant a pu être mise en évidence. Ces résultats n'ont toutefois pas à ce jour été confirmés cliniquement (77,97).

## 2. ROS

### a) *Oncogénèse*

Le gène *ROS* est situé sur le bras long du chromosome 6 (6q22) et code également pour un récepteur transmembranaire à activité à tyrosine kinase de la superfamille des récepteurs à l'insuline (98). Il est normalement exprimé dans le poumon et l'épididyme (99). Il serait impliqué dans la transition mésenchymo-épithéliale durant le développement ; son ligand n'est pas connu (99).

A l'instar de *ALK*, les réarrangements impliquant *ROS* promeuvent le développement tumoral en activant différentes voies de signalisation intracellulaire (figure 31) (99).

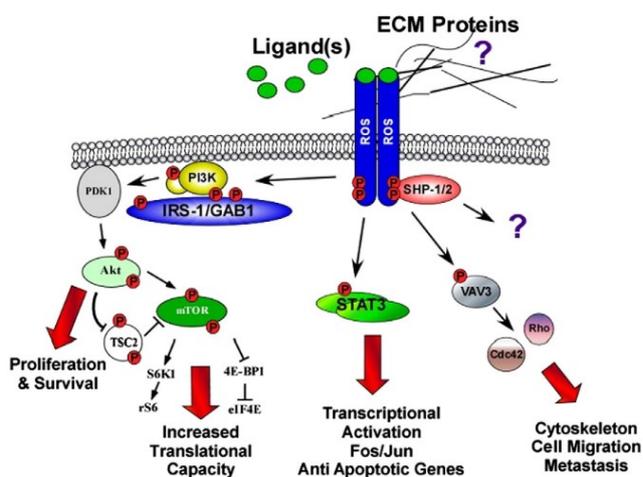


Figure 31 : Voies de signalisation intracellulaire contrôlées par ROS (99)

Le réarrangement chromosomique met en relation les régions codant pour le domaine tyrosine kinase de *ROS*, situés en 3' du gène, avec la région 5' du gène partenaire. Douze gènes partenaires de *ROS* dans le CNPCP sont actuellement connus : *CD74* (environ 40 % des cas (83,100,101)), *SLC34A2*, *SDC4*, *TPM3*, *EZR*, *LRIG3*, *KDELR2*, *TMEM106B*, *MSN*, *LIMA1*, *FIG* (aussi appelé *GOPC*) et *CCDC6* (7,29,30,83,100,102–105) (figure 32) . La protéine de fusion ainsi obtenue peut être transmembranaire, cytoplasmique ou périmembranaire (106). Il est à noter que l'oncogénicité du transcrit *SLC34A2-ROS* est discutée *in vitro* (107) bien que des cas de patients porteurs de ce transcrit répondant au crizotinib aient été décrits (100).

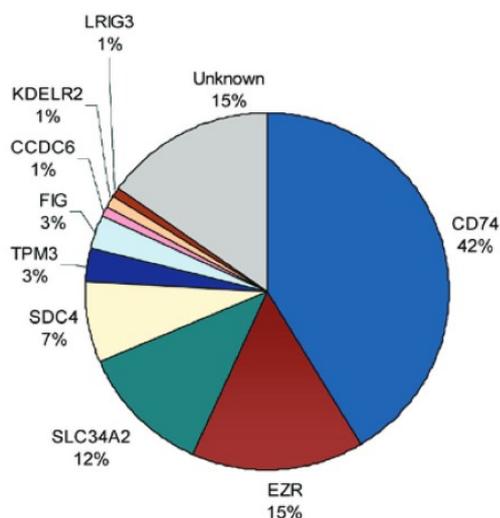


Figure 32 : Principaux gènes partenaires de ROS (101)

De rares cas de mutation concomitante des gènes *EGFR*, *KRAS* ou *BRAF* ou d'amplification de *MET* ont été décrits (104,108–112). Cai *et al* (113) ont par ailleurs publié un cas d'ADKP métastatique comportant 3 variants différents de ROS (sur les prélèvements de 2 métastases), témoignant d'une hétérogénéité tumorale.

Les CNPCP comporteraient également des surexpressions de *ROS*, en lien avec des modifications épigénétiques et non des réarrangements géniques. Ces altérations n'entraînent toutefois pas à ce jour d'application clinique (114).

#### b) Caractéristiques cliniques

Les réarrangements impliquant *ROS* ont été décrits pour la première fois en 1987 dans le glioblastome, où la fusion de *ROS* et *FIG* est due à une délétion intrachromosomique et non à une translocation (115,116). Ce n'est qu'en 2007 qu'ils ont été identifiés dans le cancer du poumon (6), où ils sont présents dans 1 à 2 % des CPNPC (7,98,104,112,117,118). Ils sont aussi retrouvés dans le cholangiocarcinome, les cancers gastrique, ovarien et colorectal, la tumeur myofibroblastique inflammatoire, l'angiosarcome et l'hémangioendothéliome épithélioïde (106,119–121).

On observe une plus grande prévalence des réarrangements de *ROS* chez les patients âgés en moyenne de 50 à 60 ans (98,118,122), de sexe féminin (112,117,118), non ou peu fumeurs et atteints quasi-exclusivement d'adénocarcinome (de rares cas de carcinome adénoquameux ou de contingent neuroendocrine ont été décrits (103,105,110)), sans sous-type histologique clairement prédominant bien que des aspects similaires aux tumeurs ALK+ soient souvent observés (98,104,117,118,123,124). Quelques cas de calcifications intra-tumorales ont été décrits (122,123). Ces caractéristiques cliniques et histologiques ne sont tout de fois de nouveau pas discriminantes du

fait de la très petite taille des cohortes ROS+ dans la littérature et de la prédominance d'études chez les asiatiques, chez qui la plus grande fréquence de ces réarrangements est débattue (98,112).

Une étude *in vitro* et sur modèle murin a montré une plus grande agressivité des tumeurs ayant un transcrite CD74-ROS comparé celles ayant un transcrite FIG-ROS, sans confirmation clinique à l'heure actuelle (107).

La valeur pronostique des réarrangements de *ROS* reste controversée (110,125), tout comme la présence d'une altération du nombre de copie de *ROS*, sans réarrangement associé (109,118).

### c) Traitement

Du fait de la grande homologie du domaine tyrosine kinase des protéines ALK et ROS (100,126), il était licite d'évaluer les inhibiteurs de tyrosine kinase ciblant les réarrangements de *ALK* chez les patients ROS+. Ainsi, le crizotinib a été approuvé aux Etats-Unis par la Food and Drug Administration en mars 2016 pour le traitement des cancers pulmonaires métastatiques ROS+. En France, ce traitement est délivré dans le cadre du protocole AcSé crizotinib (48).

L'étude de phase I conduite par Shaw *et al* a montré un taux de réponse global au crizotinib de 72% avec un temps moyen de réponse de 7,9 semaines (100). La durée moyenne de réponse (17,6 mois) et la survie sans progression (19,2 mois) sont plus importantes chez les patients ROS+ que chez les patients ALK+ (100). Une étude rétrospective européenne retrouvait un taux de réponse global de 80% et une survie sans progression de 9,1 mois (127). Des études prospectives de phase II sont en cours, telles que EUCROSS (128).

Il n'a pas été constaté à ce jour de différence significative de réponse au traitement entre les différents transcrits (100).

Les effets indésirables sont les mêmes que ceux observés chez les patients ALK+ (100).

Différents mécanismes à l'origine d'un échappement thérapeutique ont été identifiés : mutation secondaire de *ROS* (129–131), activation de la voie RAS (mutation de *KRAS* ou *NRAS* ou amplification de *KRAS*) (132) et activation de la voie de l'EGFR (131).

Pour contrer ces résistances, des TKI de 2<sup>e</sup> génération sont en développement : le ceritinib, l'alectinib et, le brigatinib (AP26113), le foretinib, le cabozantinib et l'AZD3463 (133).

A l'instar de ce qui est observé chez les patients ALK+, un traitement par pemetrexed serait plus efficace chez les patients ROS+ que chez les patients ROS- (111).

### 3. RET

#### a) *Oncogénèse*

*RET* (REarranged during Transfection) est un oncogène de 21 exons situé sur le chromosome 10 (10q11.2) codant pour un récepteur transmembranaire à tyrosine kinase, dont le ligand appartient à la famille des facteurs neurotrophiques dérivés des cellules gliales. Il contrôle la survie, la différenciation, la migration et la prolifération cellulaires via les voies RAS/ERK, PIK3/AKT, MAPK et JNK. Il interviendrait dans le développement du système nerveux entérique et du rein et dans la spermatogénèse (134) et est exprimé dans les neurones, les ganglions sympathiques et parasympathiques, les cellules C thyroïdiennes, la médullosurrénale et le tractus uro-génital (101).

Les réarrangements de *RET* entraînent, comme pour *ALK* et *ROS*, une activation constitutionnelle de *RET* par dimérisation indépendante de son ligand grâce à la région coiled-coil du partenaire. Plusieurs gènes partenaires de *RET* ont été identifiés à ce jour dans le CNPCP : *KIF5B* (dans plus de 80% des cas), *CCDC6*, *NCOA4*, *CUX1* et *TRIM33* (105,135–137). Dans le cas de *KIF5B*, le réarrangement est intra-chromosomique, dû à une inversion péricentrique (138) (figure 33).

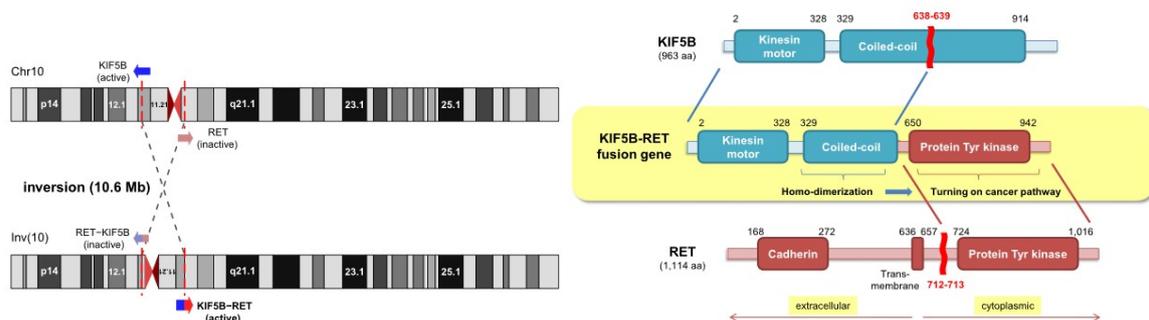


Figure 33 : Réarrangement de *RET* et protéine de fusion obtenue (138)

La présence d'un réarrangement de *RET* serait mutuellement exclusive de la présence d'une mutation d'*EGFR*, *ALK*, *BRAF*, *KRAS* et *HER2* (139). Un cas de mutation concomitante de l'*EGFR* a toutefois été décrit (140).

#### b) *Caractéristiques cliniques*

Les réarrangements de *RET* ont été décrits pour la première fois en 2012 dans le CNPCP (7–9,138,141) où ils sont diagnostiqués dans environ 1% des cas (7,135). Ils sont connus depuis 1987 dans le carcinome papillaire de la thyroïde (142). Par ailleurs, les mutations constitutionnelles de *RET* sont à l'origine des Néoplasies Endocrines Multiples de type 2 (NEM2) et des mutations somatiques ponctuelles sont retrouvées dans près de 50% des cancers médullaires de la thyroïde (134).

Les cohortes de patients *RET*<sup>+</sup> sont à ce jour de trop petite taille pour pouvoir dresser un portrait type fiable de ces patients et de leur tumeur. Dans une méta-analyse réalisée en 2015, Lin *et al*

montrent le profil suivant pour ces patients : patients de sexe féminin et non-fumeur (plus particulièrement chez les patients d'origine asiatique), atteints d'un adénocarcinome pulmonaire (135). Ces patients seraient également plus jeunes (< 60 ans). Dans une étude européenne, Michels *et al* retrouvent quant à eux une prédominance d'hommes, avec une moyenne d'âge de 62 ans et une très faible prédominance de non-fumeurs (140). En 2014, parmi les 951 prélèvements d'ADKP adressés à la plateforme de génétique somatique des tumeurs de Rennes, 7 cas RET+ ont été identifiés (3,7%) : la moyenne d'âge des patients était de 71 ans avec un ratio homme /femme à 0,33 (143). Un article rapporte, dans 4 cas d'ADKP RET+, un aspect de dissémination lymphatique en imagerie et la présence de psammomes en l'histologie (144). Un cas de tumeur carcinoïde et un cas de carcinome épidermoïde RET+ ont également été décrits (145).

Tsai *et al* suggèrent que les tumeurs métastatiques RET+ seraient de meilleur pronostic que les tumeurs ne présentant pas d'altération des gènes *RET, EGFR, KRAS* et *ALK* (146).

L'exposition aux rayonnements ionisants pourrait être un facteur favorisant cette altération (147).

L'apparition d'un réarrangement de *RET* pourrait également être un mécanisme de résistance secondaire aux TKI EGFR chez les patients EGFR+ (148).

#### c) *Traitement*

Plusieurs TKI ayant une activité anti-RET sont en cours d'évaluation dans le CNPCP RET+ ( tels que le vandetanib, le cabozantinib, le sunitinib ou lesorafenib) et quelques cas publiés de réponse thérapeutique témoignent du caractère prometteur de ces molécules (137,149) . Elles sont délivrées dans le cadre d'essais cliniques.

L'alectinib, un TKI ayant été développé pour traiter les patients ALK+ résistants au crizotinib, pourrait être également efficace chez les patients RET+ (150).

## 4. Détection des translocations

#### a) *Caryotype*

Le caryotype est une analyse pan-génomique de faible résolution. Il permet de visualiser l'ensemble des chromosomes à partir de cellules mises en culture puis bloquées en métaphase. Seuls des réarrangements chromosomiques de grande taille peuvent être diagnostiqués par ce moyen, ce qui n'est pas adapté à l'étude des translocations impliquant *ALK, ROS* ou *RET*. De plus, il s'agit d'une technique lourde ne convenant pas à une activité de routine en cancérologie pulmonaire.

b) IHC couplée à la FISH : le "gold standard" actuel au CHU de Rouen

- Principes de l'immunohistochimie (IHC)

L'IHC permet de détecter des antigènes protéiques à l'aide d'anticorps spécifiques. Cette technique est réalisée sur prélèvement fixé au formol et inclus en paraffine ou sur lame d'étalement cytologique et peut être entièrement automatisée.

Après démasquage antigénique thermique ou enzymatique, permettant de rompre les ponts protéiques induits par le formol, un anticorps primaire spécifique est fixé sur l'antigène d'intérêt. Un kit de révélation indirecte est ensuite utilisé, comportant des anticorps secondaire et tertiaire et un chromogène, entraînant la formation d'un précipité brun visible en microscopie optique (figure 34). Afin d'augmenter l'intensité du signal, une étape d'amplification peut être ajoutée.

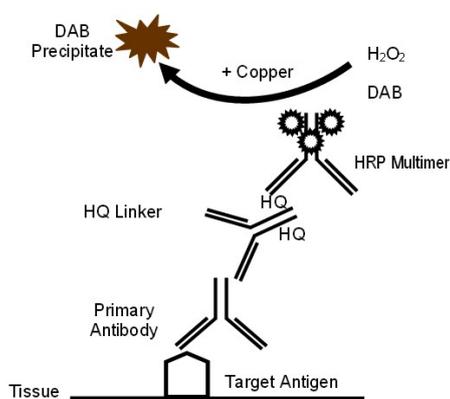


Figure 34 : Principes de la technique d'IHC (document Ventana Roche, kit OptiView)

Les différents paramètres pré-analytiques (délai d'acheminement du prélèvement, type et volume de fixateur, temps de fixation, conservation des blocs, délai d'utilisation des lames blanches, stockage des réactifs) doivent être parfaitement maîtrisés car ils peuvent affecter les performances de l'immunomarquage (151). La décalcification des prélèvements osseux ou calcifiés altère le résultat des immunomarquages (152).

Il est impératif de disposer pour chaque série d'immunomarquage de témoins (internes ou externes) positifs et négatifs permettant de contrôler la qualité de la technique.

L'immunohistochimie possède de nombreux avantages : contrôle morphologique, rapidité (délai de 24h), interprétation plus aisée par tout pathologiste, faible coût (environ 10 euros par lame), facilité de mise en place. La principale difficulté de cette technique réside dans la détermination du seuil entre positivité et négativité.

- Principes de la FISH (Fluorescence In Situ Hybridization)

Il s'agit d'une technique permettant de détecter une région chromosomique à l'aide d'une sonde d'ADN monobrin, marquée par un fluorochrome, s'hybridant de façon spécifique sur la région

d'intérêt. Elle est réalisable sur tissu fixé au formol et inclus en paraffine, sur les lames de cytologie et sur tissu frais ou congelé. Il est préférable d'éviter les prélèvements décalcifiés.

Dans l'ADKP, les sondes utilisées sont de type *break-apart* (ou sondes de "séparation"). Le kit comporte 2 sondes marquées par un fluorochrome de couleur différente (rouge et vert) se fixant de part et d'autre du point de cassure du gène d'intérêt (figure 35).

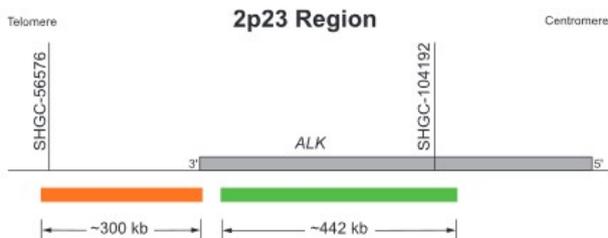


Figure 35 : Sondes de FISH de type « break-apart » : exemple des sondes Vysis ALK Abbott

Lorsque le gène est normal, les sondes sont accolées : le signal observé est soit un spot rouge et un spot vert accolés, soit un spot de fusion jaune (figure 36). En revanche, en cas de réarrangement, les deux sondes sont séparées : le signal observé est un spot rouge séparé du spot vert ou la perte du spot vert (figure 37). Cette altération est présente à l'état hétérozygote.

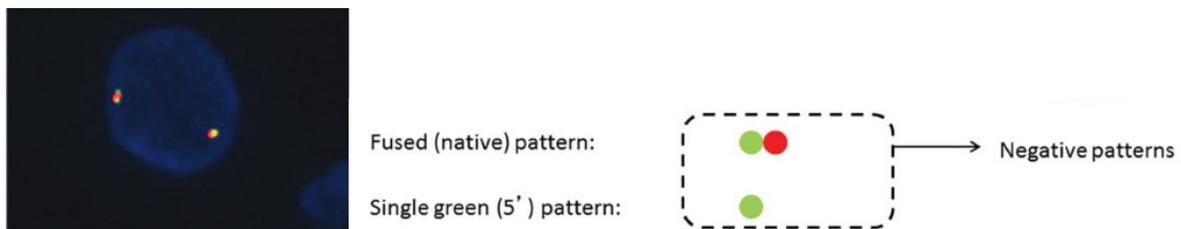


Figure 36 : Gène non réarrangé (84,91)

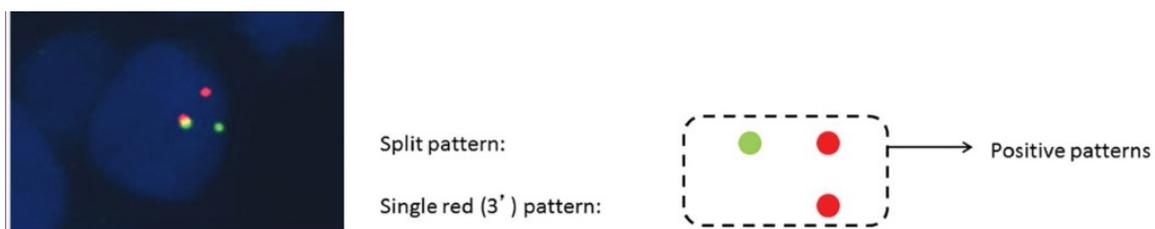


Figure 37 : Gène réarrangé (84,91)

Cette technique présente plusieurs limites : son coût (75 euros de réactifs par lame), la subjectivité et la difficulté de son interprétation, l'absence d'identification du gène partenaire et sa grande sensibilité aux conditions de fixation et de stockage du prélèvement. Son intérêt majeur est qu'elle permet d'identifier tous les variants, quel que soit le partenaire impliqué.

- Pré-criblage par IHC puis confirmation par FISH

Au CHU de Rouen, l'étude immunohistochimique est réalisée en première intention et est utilisée comme méthode de pré-criblage : en cas de positivité, elle est complétée par une technique de FISH afin de rechercher un réarrangement de *ALK* ou *ROS*. Si l'IHC est négative, aucune autre technique complémentaire n'est réalisée et l'on conclut à l'absence de réarrangement du gène étudié. Cette détection séquentielle permet de limiter le nombre de FISH réalisées (153).

- *ALK*

Deux clones sont validés pour la réalisation de l'étude immunohistochimique dans l'ADKP : le D5F3 (Ventana Roche®) et le 5A4 (Abcam®). Ils possèdent tous deux d'excellentes sensibilité (entre 95% et 100%) et spécificité (entre 95% et 100%) (85,153–157). Le clone utilisé dans les lymphomes anaplasiques, l'ALK1, n'est pas adapté aux CNPCP en raison d'un manque de sensibilité (75,158,159).

Il n'existe pas de consensus pour définir une IHC positive. Dans la littérature, l'IHC est considérée positive soit en cas de marquage cytoplasmique granuleux fort (3+) des cellules tumorales (154,155), soit en cas de marquage d'intensité faible à forte (1+ à 3+) (63,85,153,156,157,160) (figure 38). Des cas IHC 1+ et 2+ positifs en FISH ont été décrits (85,153,156,157,160). Ce marquage peut être hétérogène au sein de la tumeur. L'INCa, à travers le programme ACSé, recommande de considérer les marquages forts (3+), modérés (2+) et faibles (1+) positifs, à partir de 10% de cellules tumorales marquées tandis que Ventana®, fournisseur du clone D5F3, recommande de ne considérer positifs que les cas 3+.

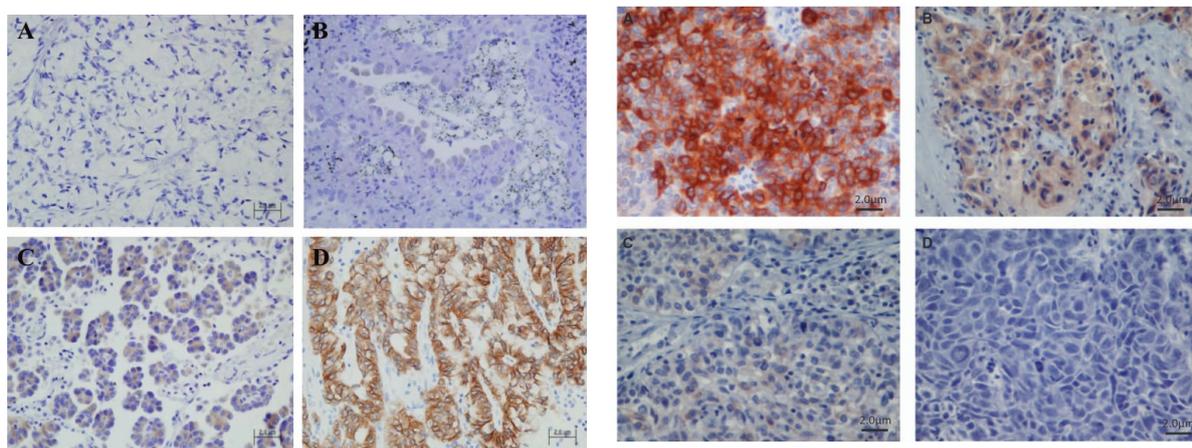


Figure 38 : Différentes intensités de marquage avec les anticorps 5A4 (à gauche : A : 0; B : 1+; C : 2+; D : 3+) et D5F3 (à droite : A : 3+ ; B : 2+ ; C : 1+ ; D : 0) (157,160)

Un méta-analyse publiée en 2016 suggère que les cas IHC 3+ seraient suffisamment spécifiques et pourraient s'affranchir d'une confirmation par FISH et que celle-ci pourrait être réservée aux cas 1+ et 2+ (marquages d'intensité faible à modérée) uniquement (158). Cette méta-analyse montre par

ailleurs que l'immunohistochimie est plus sensible lorsque toutes les intensités de marquages sont considérées positives (158).

L'expression protéique de ALK est très faible et nécessite une forte concentration d'anticorps et une importante amplification du signal.

Il existe des risques d'IHC faussement positive lors de la lecture de la lame en raison d'un bruit de fond au niveau des macrophages alvéolaires, des cellules nerveuses, de l'épithélium normal, des lymphocytes et des plages de nécrose (155). Notre expérience au CHU de Rouen a aussi montré l'existence d'un bruit de fond au niveau du mucus.

La lecture d'une FISH se fait sur au minimum 100 cellules. Une FISH de type *break-apart* est considérée positive lorsque l'on observe un écart d'au moins 2 fois le diamètre d'un *spot* entre les 2 sondes (161,162), dans au moins 15% des cellules tumorales (84,153,155,161). Il s'agit d'un examen d'interprétation difficile, la taille d'un *spot* étant comprise entre 0,3 et 0,8 microns (84). Entre 6% et 10% des FISH ont un résultat équivoque (c'est-à-dire entre 10% et 20% de cellules réarrangées), que certains auteurs suggèrent de classer en *borderline* (limite) (84,161).

Le *pattern* de positivité de la FISH serait le reflet du type de translocation (figure 39) : un "short split" (écart de 2 *spots*) ou un "long split" (écart de 2 à 3 *spots*) témoigneraient d'un réarrangement intrachromosomique, un "far-away split" (écart de plus de 3 *spots*) témoigneraient d'une translocation interchromosomique et un "deleted split" (perte du *spot* vert), une translocation intrachromosomique avec délétion (84). Plusieurs *patterns* peuvent co-exister au sein d'une même tumeur (84). Le "deleted split" est plus facile à diagnostiquer que les *split* (161).

Une polysomie (figure 39) peut être observée, correspondant, selon les auteurs, à la présence d'au moins 3 copies du gène *ALK* dans au moins 10 à 30% des cellules tumorales (84). Une amplification du gène *ALK* se caractérise par la présence d'un rapport « nombre de sonde *ALK*/nombre de sonde centromérique »  $\geq 6$  dans plus de 10% des cellules tumorales. En 2015, Martin *et al* ont réalisé une étude sur 244 ADKP et ont montré la présence d'une polysomie dans 77% des cas (61% des ALK+ et 79% des ALK-) tandis qu'une amplification de *ALK* était présente dans 5% des cas (84). En 2012, Salido *et al* retrouvaient 63% de polysomie et 10% d'amplification sur une cohorte de 107 patients (96). Ces altérations peuvent être associées ou non à des réarrangements de *ALK* et sont présentes dans une proportion variable de cellules tumorales (84,96).

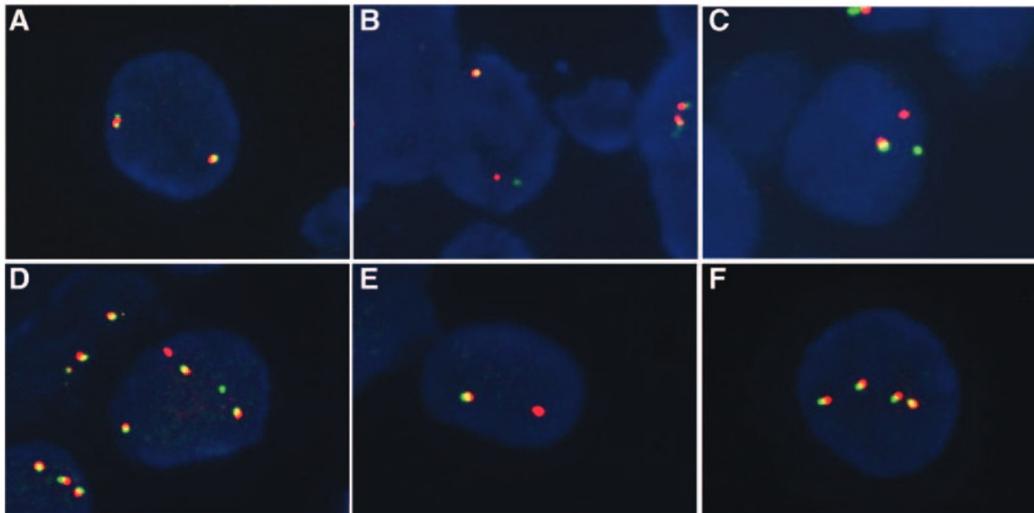


Figure 39 : Différents *pattern* de FISH *ALK* (A : absence de réarrangement; B : short split; C : long split; D : far-away split; E : deleted split; F : polysomie) (84)

Lors de la lecture d'une FISH, il est souvent difficile de repérer précisément les territoires tumoraux : une FISH peut être faussement conclue comme étant négative lorsqu'il n'y a aucune cellule tumorale dans le territoire analysé. Par ailleurs, la FISH peut être faussement considérée positive avec un *pattern* « spot rouge isolé » lorsque le site de fixation de la sonde verte se trouve sur un autre plan non visible sur la lame (163).

Des discordances sont possibles entre les résultats d'IHC et de FISH, indépendamment des erreurs d'interprétation et des étapes pré-analytiques.

Les cas d'immunomarquage positif et de FISH négative (IHC+/FISH-) correspondraient à un réarrangement complexe de *ALK* non détectable par FISH mais aboutissant tout de même à la surproduction d'une protéine *ALK* anormale. Dans ces cas, le traitement par crizotinib serait efficace (85,164,165).

Une discordance IHC-/FISH+ correspondrait à la présence d'un réarrangement au niveau de la séquence d'ADN de *ALK* n'entraînant pas de production d'une protéine anormale et, de ce fait, à une inefficacité du traitement par crizotinib (154,155,159,163). Le réarrangement visualisé en FISH peut également être un faux positif dû à un artefact technique entraînant des altérations de l'ADN ou biaisant l'interprétation de l'examen (notamment en cas de *pattern* « spot rouge isolé » comme mentionné ci-dessus) (84,163).

- ROS

L'étude immunohistochimique est réalisée avec le clone D4D6 (Cell Signaling Technology®); la positivité de l'IHC est définie par la présence d'un marquage cytoplasmique granuleux, d'intensité 1 à 3+ ou 2 à 3+ selon les études, quelle que soit la proportion de cellules tumorales marquées (104,108,122–124,166). Le fournisseur (Cell Signaling Technology®) nous a quant à lui indiqué que toutes les intensités de marquage sont à considérer positives, sous réserve des conditions pré-analytiques et analytiques au sein du laboratoire. Un marquage membranaire ou des agrégats (plus ou moins péri-nucléaires) peuvent également être observés (104,122,166) (figure 40). Un bruit de fond, parfois intense, peut être observé au niveau des macrophages, des cellules géantes, des pneumocytes II réactionnels et de la métaplasie bronchiolaire (108,122,123,167), ainsi qu'au niveau des tissus sains gastro-intestinal, rénal, parathyroïdien, oculaire, laryngé, surrénalien, musculaire strié et cérébelleux (104).

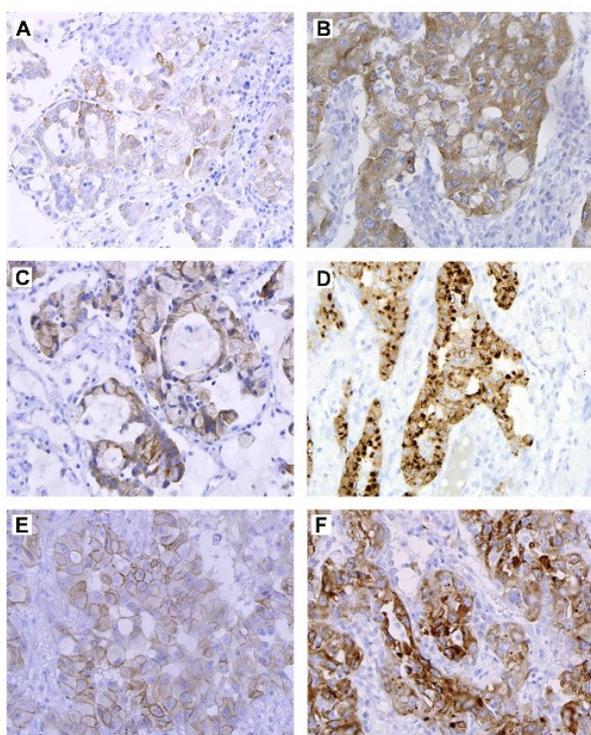


Figure 40 : Différents types de marquage avec l'anticorps anti-ROS (clone D4D6, Cell Signaling Technology, Danvers, MA) (A,B et F : cytoplasmique granuleux, C : cytoplasmique et agrégats focaux, D : agrégats, E : membranaire et cytoplasmique) (124)

Une étude française réalisée en 2014 a montré que l'immunomarquage était hétérogène, avec présence au sein d'une tumeur ROS+ de cellules tumorales non marquées (122), ce qui a été constaté dans plusieurs autres études (123,166). L'intensité de marquage prédominante était le 2+. Elle a également mis en évidence qu'un marquage aberrant des cellules tumorales pouvait être observé en cas de réarrangement de *ALK* (1 à 2+) ou de mutation de *HER2* (2+) ou de *EGFR* (marquage douteux 1+).

Comparée à la FISH, l'IHC présente une excellente sensibilité proche de 100 % et une spécificité de plus de 90% (122,123). L'utilisation d'un score (H-score) couplant intensité de marquage et proportion de cellules tumorales marquées permettrait d'obtenir une meilleure spécificité mais semble peu adapté à la pratique quotidienne (124,166,167) .

La FISH est considérée comme positive si 15% ou plus des cellules tumorales comportent à l'état hétérozygote un signal de *split* (écart d'un spot ou plus) ou d'un *spot 3'* (vert ou rouge selon le fournisseur) isolé (104,110,122).

La proportion de cellules réarrangées en FISH est très variable, de 23% à 100% (110,123).

Le réarrangement ROS-EZR est délicat à diagnostiquer en FISH du fait de la proximité des 2 gènes et ne doit pas faire conclure à tort à une FISH-. Le diagnostic sera redressé par l'IHC+ (124).

Un marquage péri-nucléaire en IHC associé, en FISH, à une perte du *spot* situé en 5' serait associé aux transcrits ROS-FIG (104) tandis qu'un marquage membranaire en IHC serait associé à un transcrit ROS-EZR (124,167) et la présence d'agrégats cytoplasmiques à un transcrit ROS-CD74 (167).

La présence d'une polysomie associée est possible (122).

- *RET*

La recherche de réarrangement de *RET* reste à ce jour rare dans la pratique quotidienne et n'est pas codifiée mais tend à se développer devant les avancées thérapeutiques prometteuses ciblant *RET*.

Seuls quelques centres français (tels que Caen et Rennes) effectuent cette recherche par FISH. Il n'existe pas d'immunomarquage validé permettant actuellement de réaliser un pré-criblage bien que plusieurs anticorps aient été testés (clones 3F8, EPR2871, ab134100) (139,168,169). La FISH, avec des sondes de type *break-apart*, est la technique de choix en routine à l'heure actuelle (169).

c) *RT-PCR en temps réel*

La PCR (Polymerase Chain Reaction) est une technique de biologie moléculaire permettant d'amplifier une région d'ADN d'intérêt à l'aide d'une ADN polymérase et de 2 amorces encadrant la région à amplifier.

La RT-PCR (Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction) en temps réel est effectuée à partir d'un extrait d'ARN : elle comporte une première étape de transcription inverse pour obtenir de l'ADN complémentaire, suivie d'une PCR avec un marqueur fluorescent.

La détection des réarrangements de *ALK*, *ROS* et *RET* se fait à l'aide de couples d'amorces spécifiques du gène de fusion recherché : l'une des amorces s'hybridant sur *ALK*, *ROS* ou *RET*, et l'autre sur le

gène partenaire. Si le transcrit recherché est présent, le couple d'amorce peut s'hybrider et la réaction de PCR avoir lieu. En l'absence du transcrit, aucun ADN ne sera synthétisé. Ce test peut être multiplexé : la même réaction contient un mélange d'amorces permettant de détecter un nombre limité de transcrits différents. Il n'est possible de détecter que les transcrits recherchés.

Une autre approche est l'utilisation de couples d'amorces spécifiques des régions 3' et 5' de *ALK*, *ROS* ou *RET* : un déséquilibre d'expression des extrémités 3' et 5' sera détecté lorsqu'un réarrangement génique est présent (71) (figure 41). L'avantage est de pouvoir détecter tous les transcrits quels que soient le point de cassure ou le gène partenaire.

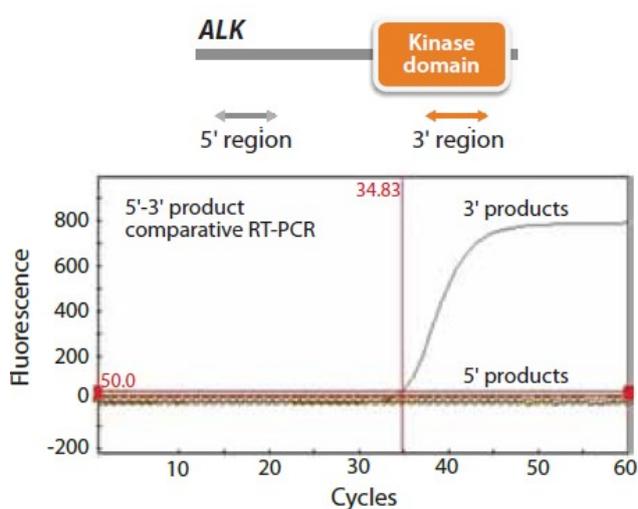


Figure 41 : RT-PCR quantitative de détection de déséquilibre d'expression des extrémités 3' et 5' (82)

L'inconvénient de cette technique est qu'elle nécessite un ARN de bonne qualité, suffisamment long.

#### d) NGS (Next Generation Sequencing)

Le NGS, ou séquençage à haut débit, permet de séquencer en parallèle des millions de molécules d'ADN, faisant jusqu'à 400 paires de bases (pb) (170).

Il existe 2 principales technologies : la technique développée par ThermoFisher® (l'Ion PGM®), que nous détaillerons ci-dessous, et la technique développée par Illumina® (le MiSeq®), basée sur le principe de la PCR en pont suivie d'un séquençage par incorporation de nucléotides terminateurs de chaîne réversibles marqués par un fluorochrome (170).

Le séquençage avec l'Ion PGM® se déroule en 4 étapes (170) :

- Création de la librairie : après amplification et fragmentation de la région d'ADN (ou d'ARN) d'intérêt, un index (aussi appelé *barcode* ou *tag*), correspondant à une séquence nucléotidique unique spécifique d'un patient, et des adaptateurs universels, complémentaires des amorces de séquençage et de fixation sur la bille, sont fixés sur celle-ci.

- Amplification clonale par PCR en émulsion : à l'aide de son adaptateur, un fragment d'ADN se fixe sur une microbille contenue dans une gouttelette d'eau émulsionnée dans de l'huile. À la fin de la PCR, chaque bille est recouverte de milliers de copies du fragment initial et est déposée dans un des millions de puits de la puce de séquençage.
- Séquençage : après fixation d'une amorce de séquençage, un séquençage par synthèse est réalisé. Des nucléotides sont injectés de façon séquentielle dans le puit : lors de l'incorporation d'un nucléotide, un proton H<sup>+</sup> est libéré et entraîne une variation de pH qui sera détectée par le séquenceur. Lorsqu'un nucléotide est injecté mais non incorporé, aucune variation de pH n'est enregistrée. La succession des nucléotides ayant entraîné une variation de pH correspond ainsi au brin complémentaire de la région étudiée.
- Analyse bio-informatique : il s'agit d'une étape cruciale générant d'importantes quantités de données à analyser et stocker, dont voici les principales étapes :
  - Dé-multiplexage : les fragments séquencés sont triés par patient grâce à leur index
  - *Base calling* : les données brutes de variation de pH sont traduites en séquences nucléotidiques
  - Alignement : tous les fragments d'ADN séquencés sont alignés (« mis en ordre ») selon une séquence de référence
  - *Variant calling* : un logiciel répertorie tous les variants présents dans l'ADN séquencé, en le comparant à des séquences de référence

Bien que cette technologie soit très performante pour détecter les mutations ponctuelles, elle n'est à ce jour pas adaptée aux diagnostics des réarrangements géniques du fait de la complexité de l'analyse bio-informatique à mettre en œuvre (notamment l'alignement).

### III. Objectif

L'objectif de ce travail est d'évaluer la faisabilité et la place d'une nouvelle technique de biologie moléculaire, la LD-RTPCR (*Ligation Dependant-Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction*), dans la recherche de réarrangement des gènes *ALK*, *ROS* et *RET* dans l'adénocarcinome pulmonaire, en comparaison avec les techniques de référence actuelles utilisées au CHU de Rouen (IHC couplée à la FISH).

## IV. Matériel et méthode

### A. La LD-RTPCR

La technique de LD-RTPCR permet de détecter des transcrits de fusion à partir d'un extrait d'ARN obtenu sur tissu fixé au formol et paraffiné. Elle s'inspire de la technique de RT-MLPA (Reverse Transcription - Multiplex Ligation-dependant Probe Amplification) développée par Eldering et al. (171) et a été mise au point par l'unité INSERM U918 du Centre de Lutte Contre le Cancer Henri Becquerel de Rouen. Elle est actuellement utilisée avec succès pour la détection de transcrits de fusions dans les sarcomes (172) et pour typer les lymphomes B diffus à grandes cellules (173) ainsi que les leucémies aiguës (174).

L'ARN étudié est converti en ADN complémentaire (ADNc). Deux sondes oligonucléotidiques sont hybridées côte à côte spécifiquement sur l'ADNc, de part et d'autre de la jonction des 2 gènes remaniés. Ces sondes sont liguées à l'aide d'une ligase puis amplifiées par PCR, grâce aux séquences complémentaires d'un couple d'amorce de PCR situées à leur extrémité libre. Seules les sondes liguées peuvent être amplifiées. Le produit de PCR obtenu est ensuite séquencé par pyroséquençage ou NGS afin d'identifier les 2 gènes impliqués dans le réarrangement et leur point de cassure (figure 42).

L'extrémité libre de toutes les sondes sont complémentaires d'un unique couple d'amorces de PCR : de nombreuses sondes différentes peuvent donc être mélangées, l'amplification de n'importe quel couple de sondes liguées se faisant avec le même couple d'amorce de PCR. On parle alors de multiplexage.

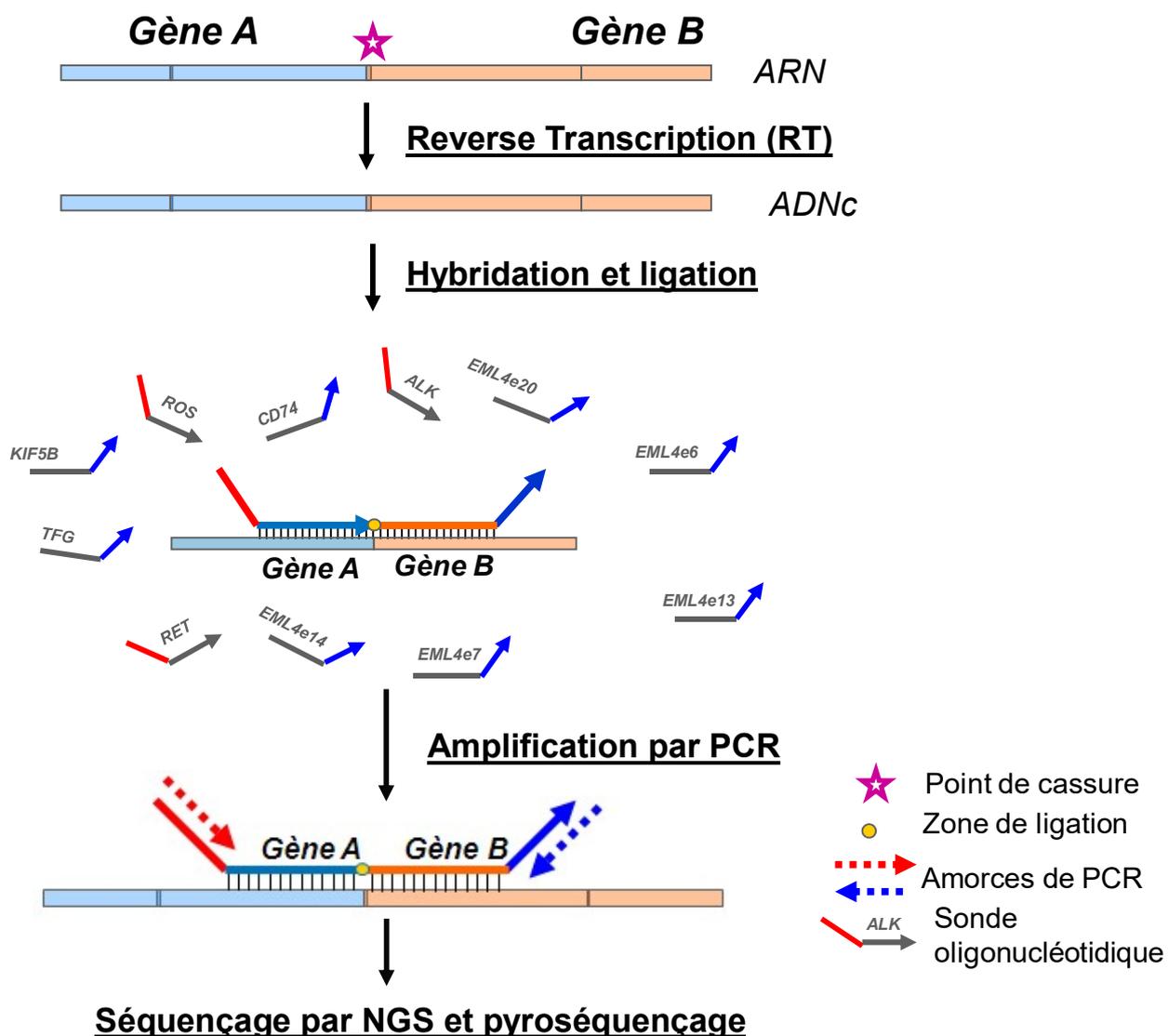


Figure 42 : Les étapes de la LD-RT-PCR (adapté d'après (174))

Le résultat final en NGS, après analyse bioinformatique, se présente sous la forme d'un graphique avec en abscisse le ou les transcrits détectés, et en ordonnée le nombre de *read* (nombre de fois que le transcrit a été lu en NGS) pour chaque transcrit (annexes A et B).

Le résultat de pyroséquençage se présente sous forme d'un graphique où la succession de pics représente les nucléotides incorporés, indiqués en abscisse. La hauteur du pic indique le nombre de nucléotides incorporés (annexes A, B et C).

Par rapport à la détection de transcrits de fusion par RT-PCR classique, cette technique à l'avantage de ne nécessiter qu'une courte séquence d'ARN bien conservée (une cinquantaine de bases), celle se trouvant de part et d'autre du point de cassure. Elle est donc moins affectée par une mauvaise qualité d'ARN et peut être plus aisément réalisée sur des tissus fixés au formol et inclus en paraffine.

De plus, elle permet de détecter un grand nombre de transcrit différents (150 sondes, voire plus, peuvent être incluses dans le kit (174)).

Le coût des réactifs de la LD-RTPCR est de moins de 15 euros par patient. Les manipulations s'effectuent en 2 jours, hors extraction

## B. Kit de LD-RTPCR pour la détection de réarrangements dans l'adénocarcinome pulmonaire

L'analyse exhaustive de la littérature lors de ce travail de thèse (base de données Pubmed) a permis de référencer tous les transcrits *ALK*, *ROS* et *RET* connus à ce jour (jusqu'à avril 2016) dans le CNPCP et de déterminer les sondes oligonucléotidiques à inclure dans le kit de détection (figure 43) (seuls les transcrits dont les point de cassure étaient précisément indiqués dans la littérature ont été inclus).

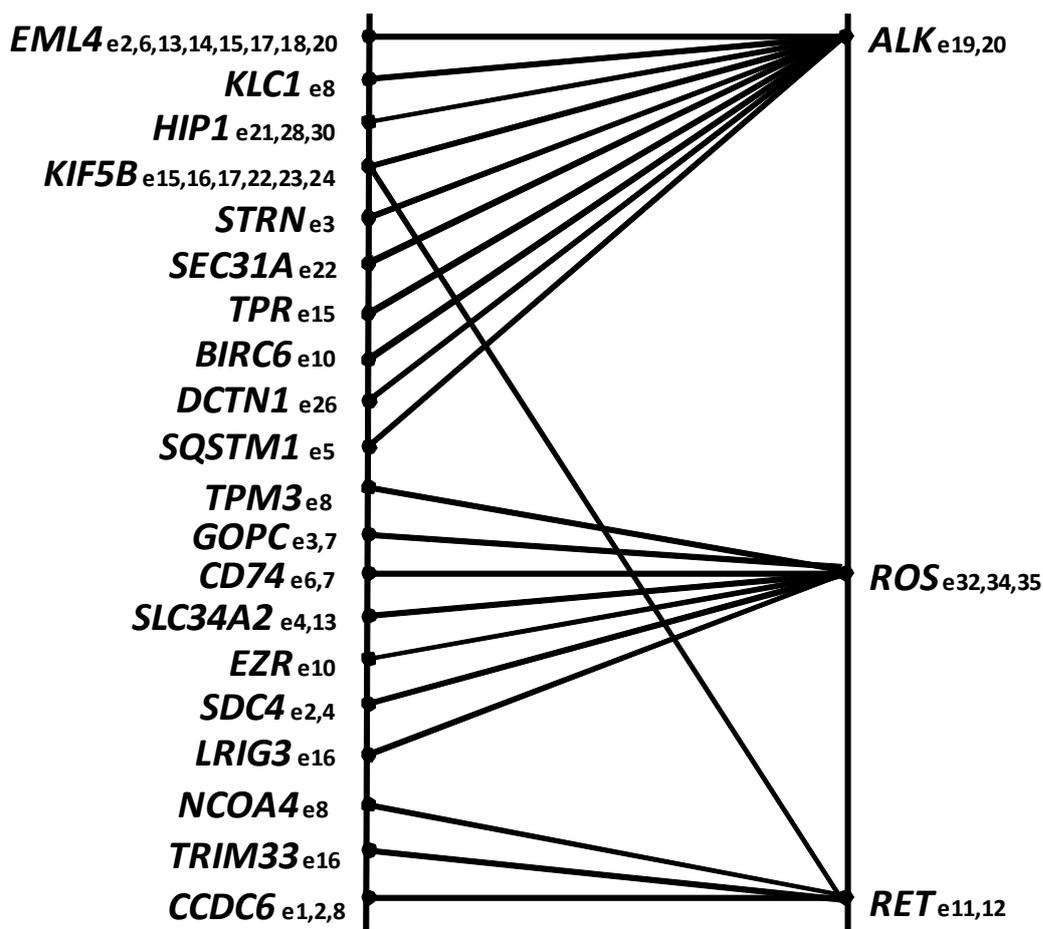


Figure 43 : Kit de LD-RTPCR composé de 47 sondes (e = exon)

Deux sondes ciblant un gène "ménager" (exprimé dans toutes les cellules), *GAPDH*, ont également été incorporées au kit afin de confirmer la présence d'ARN exploitable au sein de l'échantillon analysé.

### C. Cohorte

Cette étude prospective a inclus tous les échantillons (prélèvements fixés au formol et inclus en paraffine ou lame d'étalement cytologique) de CNPCP pour lesquels un réarrangement des gènes *ALK* ou *ROS* a été diagnostiqué entre le 01/01/2014 et le 31/12/2015 au LGST de Rouen. Le diagnostic a été réalisé par immunohistochimie (*ALK* : clone D5F3, pré-dilué, Ventana®, kit de détection OptiView DAB et kit d'amplification OptiView, Ventana® ; *ROS* : clone D4D6, dilué au 1/100<sup>e</sup>, Cell Signaling Technology®, kit de détection UltraView Universal DAB et kit d'amplification Ventana®) et FISH (*ALK* : sondes Vysis break apart, Abbott® ; *ROS* : sondes ZytoLight® SPEC ROS1 Dual Color Break Apart Probe, ZytoVision®).

Le diagnostic de l'unique prélèvement avec réarrangement de *RET* connu au CHU de Rouen a été réalisé le 9/03/2016 sur la plateforme GENECAN à Caen par le Dr C. Le Naoures Mear, par FISH (sondes ZytoLight® SPEC RET Dual Color Break Apart Probe).

Une lignée cellulaire présentant un réarrangement de *ALK* a également été incluse comme témoin positif : il s'agit de la lignée NCI-H2228 (ATCC®), fixée à l'AFA (acide acétique, formol, alcool) et incluse en paraffine.

Les immunomarquages *ALK* et *ROS* étaient considérés positifs pour tout marquage des cellules tumorales d'intensité faible à forte. Les FISH *ALK*, *ROS* et *RET* étaient considérées positives lorsque plus de 15% des cellules tumorales analysées présentaient à l'état hétérozygote soit un signal de *split*, soit un *spot* rouge isolé.

Pour chaque échantillon, une lame HES a été effectuée et relue par 2 pathologistes au microscope double tête (Pr JC Sabourin et C. Gravet) afin de sélectionner la zone tumorale à extraire et déterminer après discussion la proportion de cellules tumorales.

Les données suivantes ont été extraites des comptes-rendus de biologie moléculaire et d'anatomopathologie : identité du patient, date de naissance, sexe, âge au diagnostic initial, nature du prélèvement, organe prélevé, type histologique, intensité de l'IHC, proportion de cellules réarrangées en FISH, mutation d'un autre biomarqueur.

Lorsqu'elles étaient disponibles, les informations cliniques suivantes ont été répertoriées : tabagisme, prescription d'une thérapie ciblée, efficacité de la thérapie ciblée.

Des biopsies et pièces opératoires fixées au formol et incluses en paraffine, issues du laboratoire d'Anatomie et Cytologie Pathologiques du CHU de Rouen et analysées au LGST, dépourvues de réarrangement de *ALK*, *ROS* et de toute mutation de *EGFR* ou des autres biomarqueurs analysés, ont également été sélectionnées par tirage sur la même période afin de servir de témoins négatifs.

En cas de discordance entre le diagnostic réalisé au LGST et le résultat de LD-RTPCR, la lame d'IHC et les photos de la FISH ont été relues par 2 pathologistes (Dr N. Piton et C. Gravet) afin de vérifier l'exactitude des résultats d'IHC et de FISH.

## D. Analyses de biologie moléculaire

Les extractions d'ARN ont été réalisées par E. Colasse au LGST du CHU de Rouen.

Les techniques de LD-RTPCR ont été réalisées par P. Ruminy et V. Marchand dans l'unité Inserm U918 du Centre Henri Becquerel.

### 1. Extraction de l'ARN

Le territoire tumoral a été sélectionné sur une lame HES puis macro-disséqué à partir de lames blanches.

L'extraction d'ARN a été réalisée avec le kit Maxwell® 16 LEV RNA FFPE (Promega®), sur automate.

### 2. Reverse transcription

L'étape de *reverse transcription* a été effectuée avec le kit SuperScript® VILO® cDNA Synthesis de ThermoFischer Scientific®.

Elle consiste à synthétiser de l'ADN simple brin à partir de l'ARN extrait. Il n'y a pas d'amplification du matériel génétique.

Le mélange réactionnel comprenait, pour 1 patient, 2.5µL d'ARN, 1 µL de *mix* (didésoxyribonucléotides et tampon), 1µL d'eau distillée et 0.5µL de *reverse transcriptase*. Ce mélange a été placé dans un thermocycleur et incubé pendant 10 mn à 25°C (phase d'hybridation des amorces), 1h à 42°C (phase d'élongation) puis 5 mn à 85°C (phase de destruction de la *reverse transcriptase*).

### 3. Hybridation des amorces de LD-RTPCR

Cette étape permet de fixer les sondes oligonucléotidiques de LD-RTPCR sur l'ADN obtenu précédemment.

Pour un patient, le mélange réactionnel était constitué de 1,5 µL de tampon, de 1,5 µL du mélange de sondes oligonucléotidiques et de 5 µL de produit de RT. Il a été incubé en thermocycleur pendant 2 mn à 95°C (phase de dénaturation) puis 1h à 60°C (phase d'hybridation des sondes).

#### 4. Ligation

Lors de cette étape, les sondes fixées côte à côte sur un même brin d'ADN sont liguées.

Le kit utilisé était le Salsa® MLPA® de MRC-Holland®. Vingt-cinq µL d'eau distillée, 6µL de tampon et 1 µL de ligase ont été ajoutés au *mix* de ligation obtenu précédemment. Ce mélange a été incubé 15mn à 54°C (phase d'activation de la ligase) puis 5mn à 98° (phase de destruction de la ligase).

#### 5. Séquençage

Les produits de PCR ont ensuite été migrés sur gel d'acrylamide. Lorsqu'un produit de PCR était détecté, celui-ci était séquençé par pyroséquençage et NGS.

Les résultats ont été interprétés en aveugle par P. Ruminy et V. Marchand.

### E. **Analyses statistiques**

Les analyses statistiques ont été réalisées avec les logiciels Prism 7® de GraphPad® (sensibilité et spécificité avec le test de Fisher) et QuickCalcs® de GraphPad® (Kappa de Cohen).

Le Kappa de Cohen permet de comparer 2 techniques lorsqu'aucune technique de référence suffisamment fiable n'est disponible.

Les résultats ont été considérés significatifs lorsque la valeur p était < 0,05.

## V. Résultats

### A. Données anatomopathologiques et cliniques

#### 1. ALK

Quarante-cinq prélèvements de 44 patients répondaient aux critères d'inclusion de l'étude. Sept prélèvements n'ont pas été analysés en raison de l'épuisement du matériel tumoral.

Parmi les 38 cas analysables en LD-RTPCR (annexes A1 et A2), 21 (55%) étaient réalisés chez des hommes et 17 (45%) chez des femmes, avec une moyenne d'âge au diagnostic de 61,4 ans (intervalle de 36 à 88 ans; écart-type : 12 ans).

Les caractéristiques de ces prélèvements étaient les suivantes :

- Nature du prélèvement : 29 biopsies (76%), 9 pièces opératoires (24%)
- Site de prélèvement : 18 (47%) prélèvements de la tumeur primitive, 20 (53%) prélèvements de métastase (ganglionnaire, cérébrale, mammaire, cutanée, médiastinale, surrénalienne, pulmonaire et pleurale).
- Aucun prélèvement n'a été décalcifié
- Type histologique : 34 (89%) adénocarcinomes pulmonaires et 4 (11%) CNPCP sans autre précision
- Autres biomarqueurs : 6 (16%) patients présentaient également une altération d'un autre biomarqueur (1 mutation d'*EGFR* et 5 mutations de *KRAS*).
- Surface tumorale : comprise entre moins de 1 mm<sup>2</sup> et 250 mm<sup>2</sup>
- Proportion de cellules tumorales après recoupe (figure 44) : il existait un doute à l'examen microscopique sur la présence de cellules tumorales sur 2 (5,2%) prélèvements, 4 (10,4%) prélèvements contenaient de rares cellules tumorales (moins d'une trentaine de cellules tumorales), 2 (5,2%) contenaient moins de 5% de cellules tumorales, 1 (2,6%) contenait 5-15% de cellules tumorales, 1 (2,6%) contenait 15-25% de cellules tumorales, 12 (32%) contenaient 25-50% de cellules tumorales, 16 (42%) contenaient plus de 50% de cellules tumorales.

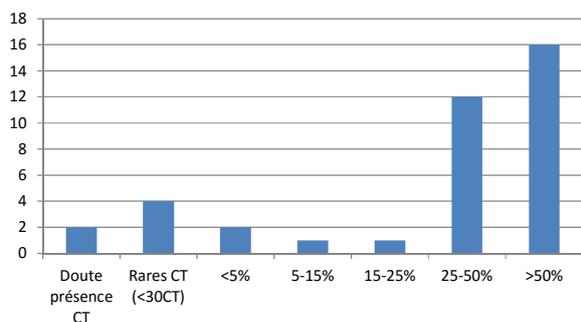


Figure 44 : Proportion de cellules tumorales des cas ALK (CT : cellule tumorale)

L'étude immunohistochimique relevée sur les comptes-rendus anatomopathologiques retrouvait 22 cas (58%) de marquage diffus fort (3+), 2 cas (5%) de marquage hétérogène faible à fort (1+ à 3+), 12 cas (32%) de marquage douteux à modéré (douteux à 2+) et 2 cas (5%) de marquage positif sans autre précision (figure 45).

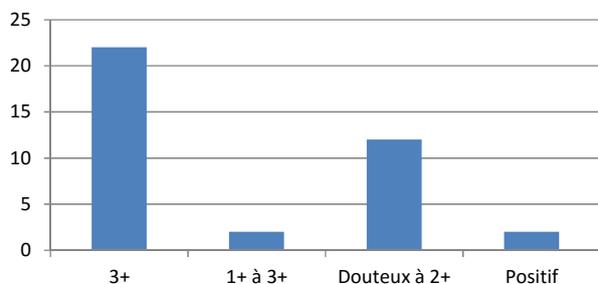


Figure 45 : Intensité de l'immunomarquage des cas ALK

La proportion de cellules tumorales réarrangées en FISH était comprise entre 15% et 88% lorsque cette valeur était disponible : 4 cas (10,5%) inférieurs ou égaux à 20%, 11 cas (29%) entre 21 et 49%, 19 cas (50%) supérieurs ou égaux à 50% et 4 cas (10,5%) supérieurs à 15% sans autre précision (figure 46).

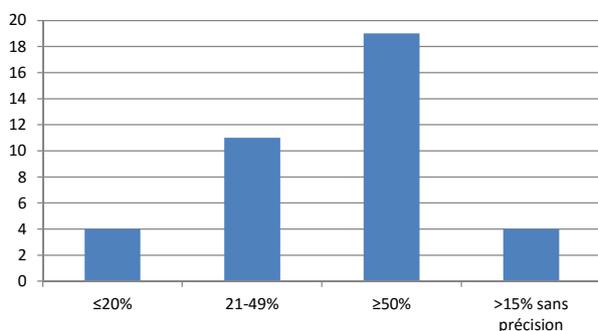


Figure 46 : Proportion de cellules tumorales réarrangées en FISH des cas ALK

La coexistence d'un réarrangement de *ALK* avec une polysomie du chromosome 2 était retrouvée chez 1 patient.

Les prélèvements 7 et 18 (annexe 1) ont été réalisés chez le même patient.

On disposait des informations cliniques suivantes, pour certains patients uniquement :

- Tabagisme : 2 patients fumeurs, 1 patient sevré depuis 35 ans et 2 patients non-fumeurs (sur 5 patients dont le statut tabagique était connu).
- Thérapie ciblée : 7 patients ont été traités par crizotinib (sur 11 patients dont la prise en charge thérapeutique était connue).
- Efficacité de la thérapie ciblée :
  - o réponse au crizotinib chez 4 patients (efficace chez 2 patients, réponse dissociée chez 2 patients), relais par ceritinib chez 3 patients et par loratinib chez 1 patient
  - o absence d'efficacité du crizotinib chez 1 patient, relais par ceritinib non évaluable (décès 3 semaines après introduction)
  - o efficacité non connue chez 1 patient
  - o 1 patient décédé 3 jours après l'introduction du traitement.

## 2. ROS

Dix-huit prélèvements de 17 patients présentant un réarrangement de *ROS* ont été inclus. Quatre prélèvements n'ont pas pu être analysés du fait de l'épuisement du matériel tumoral.

Parmi les 14 cas analysables en LD-RTPCR (annexes B1 et B2), 8 ont été réalisés chez des hommes (53%) et 6 chez des femmes (47%) avec une moyenne d'âge au diagnostic de 53,4 ans (intervalle de 31 à 77 ans; écart-type : 12,4 ans).

Les caractéristiques anatomopathologiques des prélèvements étaient les suivantes :

- Nature du prélèvement : 6 biopsies (23%), 7 pièces opératoires (50%) et 1 cytobloc (7%).
- Site de prélèvement : 4 prélèvements de la tumeur primitive (28%), 10 prélèvements de métastase (ganglionnaire, cérébrale, osseuse, péricardique, pulmonaire et pleurale) (72%)
- Aucun prélèvement n'a été décalcifié
- Type histologique : 10 adénocarcinomes pulmonaires (72%), 2 CNPCP sans autre précision (14%), 1 carcinome adénoquameux (7%) et 1 carcinome sarcomatoïde (7%)
- Autres biomarqueurs : aucun patient ne présentait d'altération d'un autre biomarqueur

- Surface tumorale : 119,6 mm<sup>2</sup> en moyenne (intervalle de 3 à 400 mm<sup>2</sup>; écart-type : 112,3 mm<sup>2</sup>)
- Proportion de cellules tumorales après recoupe : 1 prélèvement (7%) contenait de rares cellules tumorales (moins d'une trentaine de cellules tumorales), 3 (21%) contenaient 25-50% de cellules tumorales et 10 (72%) contenaient plus de 50% de cellules tumorales (figure 47).

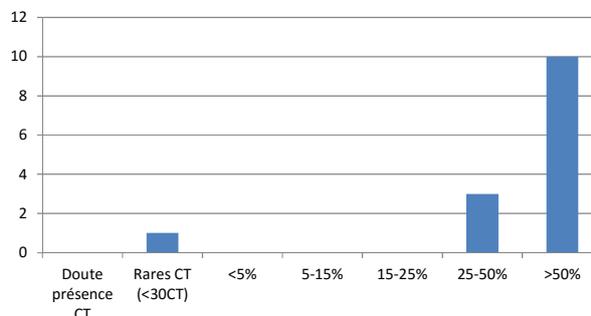


Figure 47 : Proportion de cellules tumorales des cas ROS (CT : cellule tumorale)

L'étude immunohistochimique relevée sur les comptes-rendus anatomopathologiques retrouvait 4 cas (29%) de marquage diffus fort (3+), 3 cas (21%) de marquage hétérogène modéré à fort (2+ à 3+), 7 cas (50%) de marquage douteux à modéré (douteux à 2+) (figure 48).

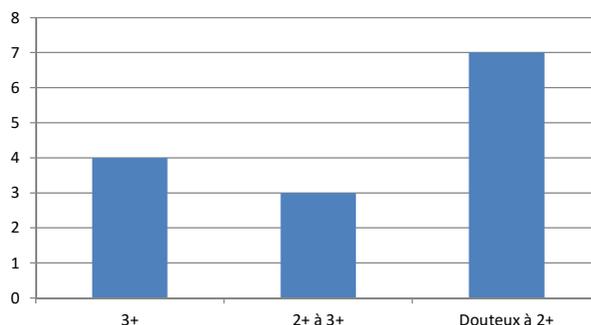


Figure 48 : Intensité de l'immunomarquage des cas ROS

La proportion de cellules tumorales réarrangées en FISH était comprise entre 18% et 98% : 2 cas (14%) inférieurs ou égaux à 20%, 4 cas (28%) entre 21 et 49%, 8 cas (58%) supérieurs ou égaux à 50% (figure 49).

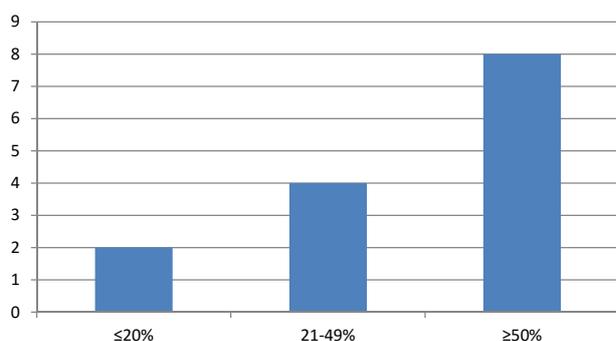


Figure 49 : Proportion de cellules tumorales réarrangées en FISH des cas ROS

Les prélèvements A et N (annexe B2) ont été réalisés chez le même patient.

On disposait des informations cliniques suivantes, pour certains patients uniquement :

- Tabagisme : 3 patients non-fumeurs (sur 3 patients dont le statut est tabagique est connu)
- Thérapie ciblée : 1 patient (sur 3 patients) a reçu une thérapie ciblée par crizotinib
- Efficacité de la thérapie ciblée pour ce patient : 1<sup>e</sup> ligne de traitement par chimiothérapie, réponse dissociée avec progression sous crizotinib (2<sup>e</sup> ligne de traitement pendant 1 mois), relais par ceritinib inefficace (3<sup>e</sup> ligne pendant 2 semaines), réponse dissociée avec progression après relais par crizotinib (4<sup>e</sup> ligne pendant 3 mois), relais par chimiothérapie (5<sup>e</sup> ligne pendant 3 semaines), relais par cabozantinib avec efficacité initiale puis progression (6<sup>e</sup> ligne pendant 2 mois), relais par chimiothérapie (7<sup>e</sup> ligne).

### 3. RET

Un cas présentant un réarrangement de *RET* a été inclu (annexe C1). Il s'agissait du prélèvement d'une femme de 47 ans.

Les caractéristiques anatomopathologiques de ce prélèvement étaient les suivantes :

- Nature du prélèvement : biopsie
- Site de prélèvement : bronche (tumeur primitive)
- Type histologique : adénocarcinome pulmonaire
- Autres biomarqueurs : absence d'altération d'un autre biomarqueur
- Surface tumorale : 4 mm<sup>2</sup>
- Proportion de cellules tumorales : 25-50%

La proportion de cellules tumorales réarrangées en FISH était de 80%.

On disposait des informations cliniques suivantes :

- Absence de tabagisme
- Absence de traitement par thérapie ciblée anti-RET à ce jour (patiente traitée par radiothérapie, chimiothérapie conventionnelle et immunothérapie)

#### 4. Témoins négatifs

Quatorze témoins négatifs étaient analysables en LD-RTPCR.

## B. Résultats de LD-RTPCR

### 1. Témoins positifs

#### a) *ALK*

Sur les 38 cas analysables, 15 (39%) présentaient un réarrangement de *ALK* détectable en LD-RTPCR (annexe A2), ce qui correspond, en chiffres bruts avant ajustement, à une sensibilité de 39,47% (IC 95% [25,6%-55,28%]) et à une spécificité de 100% (IC 95% [78,47%-100%]) ( $p=0,0048$ ) de la technique de LD-RTPCR par rapport à notre *gold standard* actuel, avec un accord inter-techniques (test du kappa de Cohen) de 0.260 (IC 95% [0.108-0.412]).

Onze cas (29%) étaient détectables à la fois en pyroséquençage et NGS et 4 cas (10%) étaient difficiles à interpréter en pyroséquençage (transcrit détecté mais non caractérisable précisément) mais aisément identifiables en NGS (figure 50).

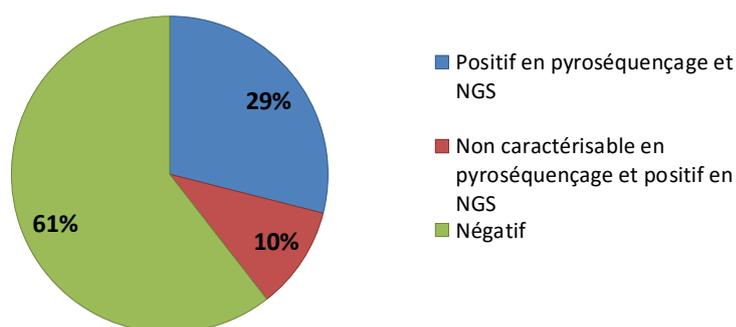


Figure 50 : Résultats de LD-RTPCR des témoins ALK

Le partenaire de *ALK* était exclusivement *EML4*, avec 5 points de cassures différents identifiés pour *EML4* (7 cas d'exon 13, 4 cas d'exon 6, 2 cas d'exon 20, 1 cas d'exon 2 et 1 cas d'exon 18) contre un seul pour *ALK* (exon 20).

La coexistence d'une polysomie du chromosome 2 était retrouvée chez 1 patient (patient 22).

Les cas LD-RTPCR+ présentait tous une IHC 3+ (figure 51).

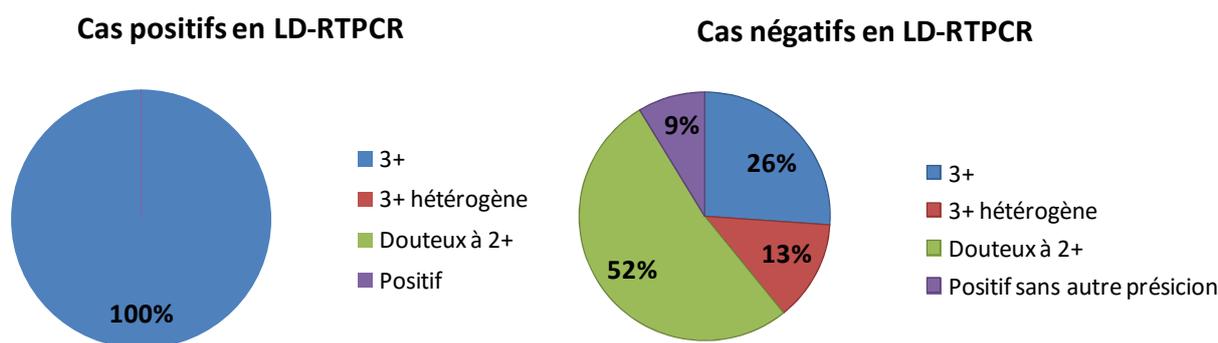


Figure 51 : Intensité d'immunomarquage des témoins ALK LD-RTPCR+ et LD-RTPCR-

Aucun cas LD-RTPCR+ ne présentait de mutation concomittante d'un autre biomarqueur.

La proportion et quantité de cellules tumorales, la surface tumorale et la proportion de cellules tumorales réarrangées en FISH (figure 52) étaient variables (annexe A2).

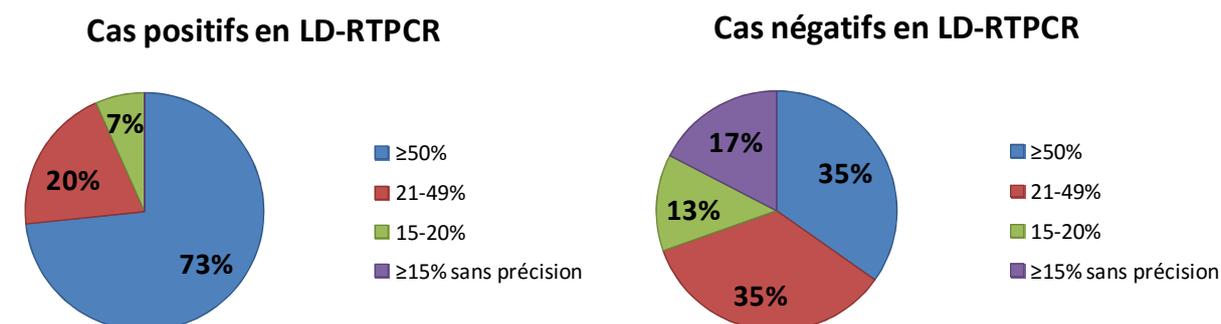


Figure 52 : Proportion de cellules tumorales réarrangées en FISH des témoins ALK LD-RTPCR+ et LD-RTPCR-

Un des cas LD-RTPCR+ (6,7%) présentait une faible expression de la *GAPDH* contre 6 des cas LD-RTPCR- (26%).

Parmi les cas LD-RTPCR+, on retrouvait 14 cas d'ADKP (93%) et 1 cas de CNPC (7%).

On retrouvait une discordance de résultat de LD-RTPCR pour les prélèvements 7 et 18 issus du même patient : transcrite de fusion identifié sur le prélèvement 18 mais pas sur le n°7.

Le transcrite de fusion de la lignée cellulaire était difficilement caractérisable en pyroséquençage et correctement analysable en NGS : il s'agissait de l'exon 20 de *ALK* fusionné avec l'exon 6 de *EML4* (transcrite *ALKe20-EML4e6*).

Parmi les 4 patients traités par thérapie ciblée LD-RTPCR+, 3 (75%) ont répondu au traitement (2 traitements efficaces et 1 réponse dissociée) et 1 (25%) n'a pas répondu, tandis que parmi les 3 LD-

RTPCR-, 1 patient (33%) a répondu (réponse dissociée) et pour 2 patients (67%) l'efficacité du traitement n'était pas évaluable (annexe A1).

Lorsque l'on s'intéresse uniquement à une catégorie spécifique de cas, les données statistiques sont les suivantes (figure 53) :

Statistiques Cohorte	Sensibilité	Spécificité	Kappa de Cohen
<b>IHC 3+ (diffuse ou hétérogène) (24 patients)</b>	62,50% IC 95% [42,71%-78,84%] p<0,0001	100% IC 95% [78,47%-100%] p<0,0001	0,551 IC 95% [0,322-0,780]
<b>Exclusion cas avec peu de CT et/ou faible expression de la GAPDH (28 patients)</b>	46,43% IC 95% [29,53%-64,19%] p=0,0016	100% IC 95% [78,47%-100%] p=0,0016	0,366 IC 95% [0,167-0,565]
<b>IHC 3+ (diffuse ou hétérogène) et exclusion cas avec peu de CT et/ou faible expression de la GAPDH (17 patients)</b>	<b>76,47%</b> IC 95% [52,74%-90,44%] p<0,0001	<b>100%</b> IC 95% [78,47%-100%] p<0,0001	<b>0,746</b> IC 95% [0,521-0,971]
<b>CT réarrangées en FISH &gt;20% (ou &gt;15% sans précision) (34 patients)</b>	41,18% IC 95% [26,37%-57,78%] p=0,0041	100% IC 95% [78,47%-100%] p=0,0041	0,290 IC 95% [0,123-0,457]
<b>CT réarrangées en FISH ≥50% (19 patients)</b>	57,89% IC 95% [36,28%-76,86%] p<0,0001	100% IC 95% [78,47%-100%] p<0,0001	0,538 IC 95% (0,292-0,785)

Figure 53 : Sensibilité, spécificité et Kappa de Cohen par catégorie de cas ALK (CT : cellule tumorale)

#### b) ROS

Sur les 14 cas analysables, 9 (64%) présentaient un réarrangement de ROS détectable en LD-RTPCR (annexe B2 et figure 54), ce qui correspond à une sensibilité de 64,29% (IC 95% [38,76%-83,66%]) et à une spécificité de 100% (IC 95% [78,47%-100%]) (p=0,0006) de la technique de LD-RTPCR par rapport à notre gold standart actuel, avec un accord inter-techniques (test du kappa de Cohen) de 0.643 (IC 95% [0.378-0.908]).

Les cas positifs étaient détectables à la fois en pyroséquençage et NGS, excepté les cas C et G pour lesquels le NGS n'a pas été effectué (temps insuffisant).

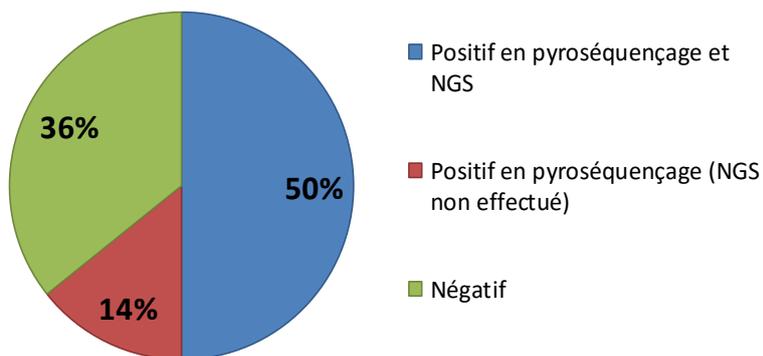


Figure 54 : Résultats de LD-RTPCR des témoins ROS

Les partenaires de *ROS* étaient *CD74* et *SLC34A2*, avec 1 point de cassure identifié pour *CD74* (exon 6) et 1 point de cassure pour *SLC34A2* (exon 13), contre 2 pour *ROS* (exons 32 et 34).

Les cas LD-RTPCR+ présentait un immunomarquage d'intensité variable (figure 55).

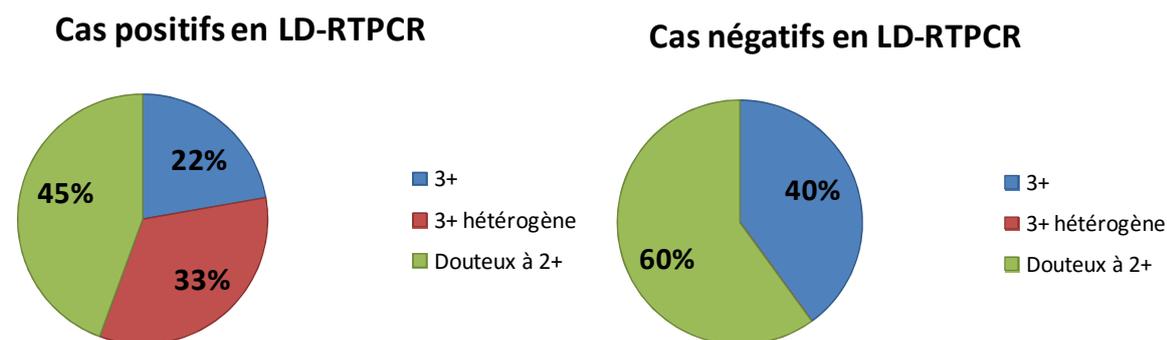


Figure 55 : Intensité d'immunomarquage des témoins ROS LD-RTPCR+ et LD-RTPCR-

La proportion et quantité de cellules tumorales, la surface tumorale et la proportion de cellules tumorales réarrangées en FISH (figure 56) étaient également variables (annexe B2).

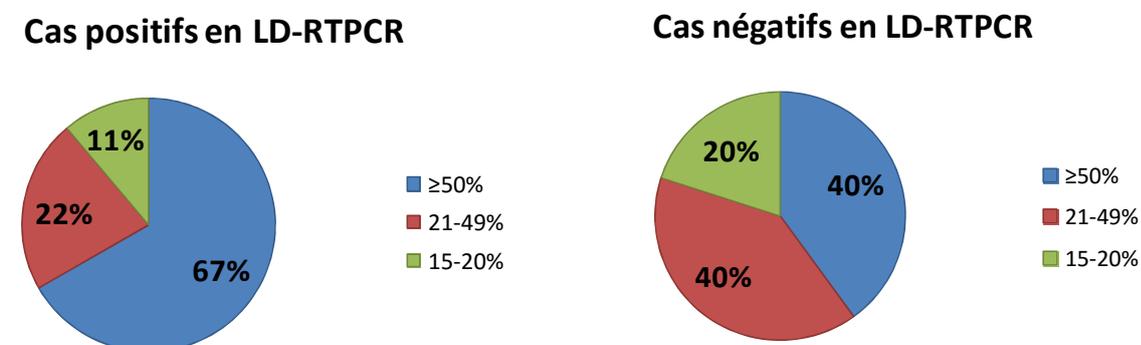


Figure 56 : Proportion de cellules tumorales réarrangées en FISH des témoins ROS LD-RTPCR+ et LD-RTPCR-

Tous les cas présentaient une expression forte de la *GAPDH*.

Parmi les cas LD-RTPCR+, on retrouvait 8 cas d'ADKP et 1 cas de CNPC.

On retrouvait une concordance en LD-RTPCR pour les prélèvements A et N issus du même patient.

Le patient traité par thérapie ciblée avait un transcrit de fusion *ROS* détectable en LD-RTPCR : il a présenté une réponse dissociée au traitement (annexe B1).

Lorsque l'on s'intéresse uniquement à une catégorie spécifique de cas, les données statistiques sont les suivantes (figure 57) :

Statistiques Cohorte	Sensibilité	Spécificité	Kappa de Cohen
<b>CT réarrangées en FISH &gt;20% (12 patients)</b>	66,67% IC 95% [39,06%-86,19%] p=0,0003	100% IC 95% [78,47%-100%] p=0,0003	0,683 IC 95% [0,412-0,954]
<b>CT réarrangées en FISH ≥50% (8 patients)</b>	75% IC 95% [40,93%-95,56%] p=0,0004	100% IC 95% [78,47%-100%] p=0,0004	0,792 IC 95% [0,524-1]

Figure 57 : Sensibilité, spécificité et Kappa de Cohen par catégorie de témoins ROS (CT : cellule tumorale)

#### c) *RET*

Ce cas présentait un réarrangement de *RET* détectable en LD-RTPCR en pyroséquençage (NGS non effectué). Le partenaire de *RET* (exon 12) était *KIF5B* (exon 15) (annexes C2 et C3).

#### d) *Relecture des cas discordants*

Les lames d'IHC ALK et ROS des cas discordants (excepté les cas 5, 6, 7, 25 et 34 en l'absence de lame d'immunohistochimie disponible) ont été relues : nous avons confirmé la positivité et la catégorie d'intensité de marquage (3+ ou douteux à 2+) de tous les cas.

Après relecture des photos de FISH *ALK* et *ROS* des cas discordants, nous avons confirmé la présence d'images de *split* ou de *spot* rouge isolé pour tous les cas relus, ces images pouvant correspondre à la présence d'une translocation.

## 2. Témoins négatifs

Aucun des 14 cas analysés ne présentait de réarrangement de *ALK*, *ROS* ou *RET* identifiable en LD-RTPCR. Ils comportaient tous une forte expression de la *GAPDH*.

## VI. Discussion

Ces résultats montrent que les transcrits de fusion impliquant *ALK*, *ROS* et *RET* dans l'adénocarcinome pulmonaire peuvent être mis en évidence avec la technique de LD-RTPCR, la sensibilité de celle-ci atteignant jusqu'à 76,47% (n = 17 cas avec IHC 3+ et ARN tumoral suffisant) pour *ALK*, 64,29% (n = 14) pour *ROS* et 100% (n = 1) pour *RET*.

### A. **Éléments pouvant entraîner des discordances**

#### 1. Quantité et qualité du matériel tumoral

##### a) *Nombre de cellules tumorales*

Parmi les 23 témoins ALK LD-RTPCR-, 4 prélèvements comportaient un nombre absolu de cellules tumorales "faible" ou "douteux" : 2 prélèvements avec une IHC 3+ (n° 31 et 33), 1 prélèvement avec une IHC positive sans autre précision (n° 7) et 1 prélèvement avec une IHC entre 1+ et 2+ (n°16).

Il n'est pas possible d'affirmer que ces prélèvements ne comportent pas de transcrite de fusion, la négativité du résultat pouvant être attribuée à la pauvreté du prélèvement en ARN tumoral.

##### b) *Proportion de cellules tumorales et surface du prélèvement*

La proportion de cellules tumorales et la surface tumorale étaient très variables, tant au niveau des cas LD-RTPCR- que LD-RTPCR+ des témoins ALK. Les cas LD-RTPCR- comportaient davantage de cas ayant à la fois une faible proportion de cellules tumorales ( $\leq 15\%$ ) et une petite surface tumorale ( $\leq 2$  mm<sup>2</sup>), c'est à dire un nombre absolu de cellules tumorales faible : 3 cas (n° 10, 31 et 34) contre aucun parmi les LD-RTPCR+.

Aucun témoin ROS ni RET ne comportait  $\leq 15\%$  de cellules tumorales sur  $\leq 2$  mm<sup>2</sup>.

##### c) *Qualité de l'ARN*

Parmi les témoins ALK LD-RTPCR-, 6 prélèvements présentaient une détection faible à très faible de la GAPDH, témoignant du peu d'ARN de qualité présent au sein de l'échantillon.

Il peut également s'agir de résultats faux-négatifs qu'il conviendrait de vérifier sur des prélèvements plus riches en ARN de qualité.

Tous les témoins ROS et RET comportaient une importante quantité de GAPDH détectable.

##### d) *Exclusion des cas non contributifs*

Au total, 8 cas LD-RTPCR- (8 cas ALK, aucun cas ROS ni RET) seraient à considérer non contributifs selon les critères énumérés précédemment.

Pour la cohorte ALK, on obtiendrait, après exclusion des cas non contributifs, une meilleure sensibilité (46,3% versus (vs) 39,47%) et un meilleur accord inter-techniques (0,366 vs 0,260).

Il convient toutefois de souligner que le cas n°27 avait un faible signal GAPDH et peu de cellules tumorales et les cas n°4 et H avaient peu de cellules tumorales mais que les transcrits de fusion ont tout de même été identifiés en LD-RTPCR : il semble qu'il y ait un intérêt à tester les prélèvements de mauvaise qualité, ceux-ci pouvant parfois se révéler contributifs.

## 2. IHC

La problématique de l'immunomarquage concerne uniquement la cohorte ALK. Pour ROS, il est reconnu, y compris dans notre expérience quotidienne au CHU de Rouen, que l'intensité de l'immunomarquage peut être très faible sans que cela ne remette en cause la présence d'un réarrangement (cf paragraphe D4b).

Pour ALK, les critères de positivité de l'immunohistochimie sont différents entre le programme ACSé de l'INCa (marquages 1+ à 3+ : critère retenu au CHU de Rouen) et le fournisseur de l'anticorps (marquage 3+ uniquement). On constate, lorsque l'on s'intéresse uniquement à la cohorte de cas IHC 3+, que la sensibilité de la LD-RTPCR passe de 39,47% à 62,5%, et l'accord inter-techniques de 0,260 (accord faible) à 0,551 (accord modéré). On atteint jusqu'à 76,47% de sensibilité et 0,746 d'accord inter-techniques (accord bon) dans la cohorte de cas 3+ contributifs. En effet, la négativité de 5 des 9 cas pourtant IHC 3+ (diffus ou hétérogène) peut s'expliquer par la faible quantité ou qualité d'ARN tumoral au sein des prélèvements, tandis que seul 1 des 12 cas IHC douteux à 2+ pourrait être considéré non-contributif.

Nos résultats semblent montrer soit un manque de spécificité des critères de positivité de l'INCa, soit un manque de sensibilité de la LD-RTPCR.

## 3. FISH

Les cas LD-RTPCR+ présentent une proportion de cas avec  $\geq 50\%$  de cellules tumorales réarrangées en FISH plus importante que les cas LD-RTPCR- (73% vs 35% pour les témoins ALK, 67% vs 40% pour ROS). La sensibilité de la LD-RTPCR (57,89% vs 39,47% pour ALK, 75% vs 64,29% pour ROS) et la concordance inter-techniques (0,538 vs 0,260 pour ALK, 0,792 vs 0,643 pour ROS) sont par ailleurs améliorées lorsque l'analyse n'est réalisée que sur les cas avec  $\geq 50\%$  de cellules tumorales réarrangées, c'est à dire sur une population sélectionnée pour laquelle le diagnostic de réarrangement génique peut difficilement être remis en cause.

En effet, d'après Von Laffert et al., il existe plus de risque de faux-positifs lorsque la proportion de cellules tumorales réarrangées est faible (entre 15% et 20%) (161). Il paraît donc cohérent de

retrouver une meilleure concordance lorsque la proportion de cellules tumorales réarrangées en FISH est élevée.

Sur ce critère, nous sommes de nouveau confrontés soit à un manque de sensibilité de la LD-RTPCR, soit à un manque de spécificité de notre *gold standard*, notamment en cas de faible proportion de cellules tumorales réarrangées en FISH.

#### 4. Mutation d'un autre biomarqueur

Dans notre cohorte de témoins ALK, nous avons mis en évidence qu'aucun cas LD-RTPCR+ ne présentait de mutation d'un autre biomarqueur tandis que 6 cas LD-RTPCR- (26%) présentaient une mutation concomitante de *KRAS* ou *EGFR*. Les co-mutations *ALK*/autre biomarqueur étant rares (environ 8% dans la littérature (78)), il s'agirait d'un argument en faveur d'une plus grande spécificité de la LD-RTPCR comparé à la FISH.

Les recherches de réarrangements de *ROS* et *RET* ne sont quant à elles effectuées dans notre service que dans un deuxième temps, lorsqu'aucune altération d'*EGFR*, *KRAS*, *BRAF*, *HER2* ou *ALK* n'est détectée.

#### 5. Exhaustivité du kit de détection

Les cas LD-RTPCR- peuvent être dus à l'absence au sein du kit de détection des sondes spécifiques du transcrit recherché.

De nouveaux transcrits de fusion sont régulièrement décrits dans la littérature : il sera nécessaire de mettre fréquemment à jour le panel de sondes du kit, celui-ci pouvant contenir au moins jusqu'à 150 sondes (173).

#### 6. Séquençage

Dans ce travail, 2 techniques de séquençage, le pyroséquençage et le NGS, ont été utilisées : bien qu'il n'y ait pas eu de discordance entre ces 2 techniques, dans 4 cas le NGS a permis d'identifier plus précisément le transcrit de fusion présent.

Il nous semble possible de se contenter d'un séquençage par pyroséquençage, moins coûteux. Le NGS pourrait être utilisé en seconde intention, en cas de pyrogramme d'interprétation difficile ne permettant pas de distinguer s'il s'agit d'un réarrangement de *ALK*, *ROS* ou *RET*.

### B. Limites de la technique de référence

Comme détaillé ci-dessus, les critères de positivité de l'IHC ALK et la difficulté d'interprétation de la FISH sont les limites de la fiabilité de notre *gold standard*. Celui-ci pourrait manquer de spécificité en

cas d'IHC ALK d'intensité douteuse à 2+ (158) ou de FISH avec une proportion de cellules tumorales réarrangées  $\leq 20\%$  (161).

Il serait intéressant de confronter nos résultats à une technique supplémentaire, telle que la RT-PCR en temps réel, ou de confronter nos résultats de FISH à ceux obtenus avec une analyse automatisée (175), afin d'évaluer plus précisément les sensibilité et spécificité de la LD-RTPCR.

### C. Reproductibilité chez un même patient

La discordance de résultat de LD-RTPCR pour les prélèvements 7 et 18 issus du même patient ALK peut s'expliquer par la non-contributivité du prélèvement 7 (doute sur la présence de cellules tumorales et très faible quantité d'ARN analysable).

Pour le patient ROS, les 2 prélèvements étaient concordants.

### D. Réponse à la thérapie ciblée

Seuls 6 cas comportaient des données cliniques exploitables, ce qui limite fortement l'interprétation de celles-ci.

On constate toutefois que 4 patients, sur 5 patients LD-RTPCR+ analysables, ont répondu à la thérapie ciblée, ce qui est très encourageant concernant la pertinence clinique de cette technique.

La non-réponse d'un patient ALK LD-RTPCR+ (cas 27) peut s'expliquer soit par un manque de spécificité de la technique, soit plus vraisemblablement par le fait que la réponse au crizotinib n'est pas de 100% chez les patients ALK+ (taux de réponse au traitement compris entre 53% et 65% (88)). La réponse au traitement d'un témoin ALK LD-RTPCR- (cas 34) peut être dûe à un faux-négatif en LD-RTPCR (cas non-contributif du fait de la très faible quantité d'ARN analysable et/ou manque d'exhaustivité du kit de détection).

### E. Place de la LD-RTPCR

La LD-RTPCR présente des avantages certains tels que son faible coût, sa rapidité et simplicité de mise en œuvre et l'objectivité de son interprétation.

Elle pourrait s'intégrer à la routine diagnostique des réarrangements de *ALK*, *ROS* et *RET* afin de limiter davantage la réalisation de FISH. Ainsi, après une première phase de dépistage par IHC pour ALK et ROS (dont les critères de positivité pourront éventuellement évoluer), la LD-RTPCR pourrait

être réalisée pour tous les cas IHC+ et pour toutes les recherches de réarrangement *RET*, ce qui équivaudrait à une nouvelle phase de dépistage. La FISH ne serait réalisée qu'en cas de négativité de la LD-RTPCR, celle-ci pouvant ne pas contenir les sondes spécifiques du transcrite recherché ou ne pas être contributive (figure 58).

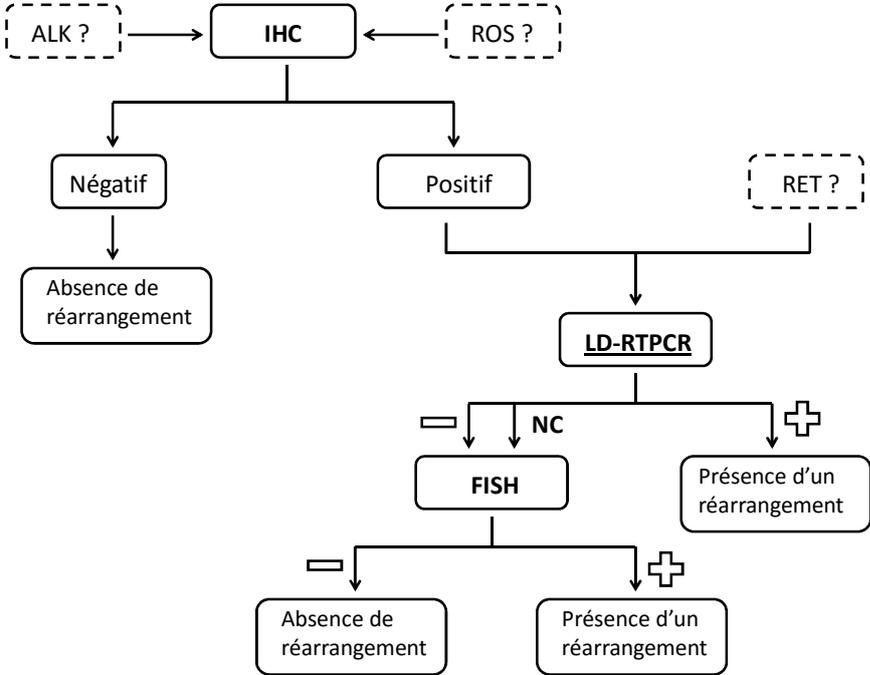


Figure 58 : Démarche diagnostique des réarrangements géniques dans l'adénocarcinome pulmonaire intégrant la technique de LD-RTPCR (NC : Non contributif)

Si cette démarche diagnostique avait été appliquée aux 3 cohortes de ce travail, 25 FISH (sur 53 réalisées au total) auraient pu être évitées.

Cette attitude nous semble plus pertinente que celle proposée en 2015 par l'équipe française de Lantuejoul *et al* qui recommande, en cas de FISH négative, de renouveler les techniques d'IHC et de FISH ou de réaliser une RT-PCR en temps réel, alors même que cette équipe conclue que la RT-PCR en temps réel n'était pas discriminante en cas de discordance IHC/FISH (figure 59) (176).

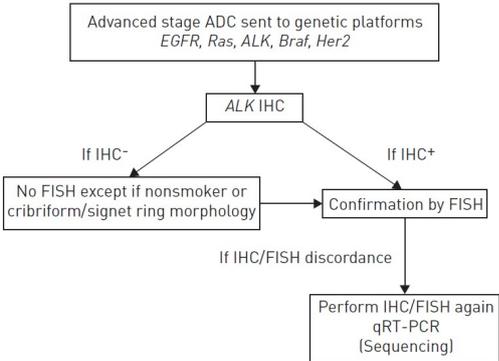


Figure 59 : Démarche diagnostique proposée par Lantuejoul *et al* (176)

Nous pensons en effet que renouveler l'IHC et la FISH entraînerait d'importants coûts supplémentaires et que le résultat obtenu risquerait d'être identique au précédent, excepté si un défaut dans la réalisation technique a pu être identifié et corrigé. Par ailleurs, placer en dernière étape diagnostique un examen non exhaustif entraîne un risque de résultat faux-négatif.

Afin de s'affranchir de l'impossibilité de disposer d'un kit de détection de LD-RTPCR parfaitement exhaustif, une nouvelle approche pourrait être envisagée : au lieu de cibler le point de cassure, 2 couples de sondes pourraient cibler les extrémités 3' et 5' de *ALK*, *ROS* et *RET* afin d'étudier le niveau d'expression de ces 2 régions par analyse de fragments. La présence d'un réarrangement génique induit une surexpression de la région appartenant au transcrite de fusion (figure 59) (82).

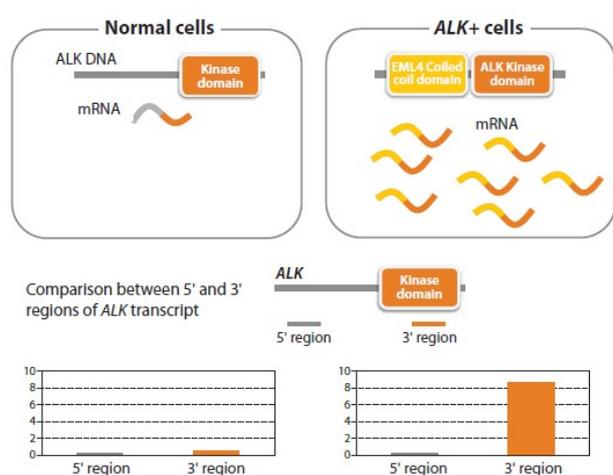


Figure 59 : Déséquilibre d'expression des régions 3' et 5' lors d'un réarrangement de *ALK* (82)

Ces sondes seraient identiques quel que soit le transcrite de fusion présent et permettraient ainsi de détecter tous les réarrangements, quels que soient le gène partenaire impliqué ou le point de cassure.

## VII. Conclusion

Bien que les réarrangements de *ALK*, *ROS* et *RET* dans l'adénocarcinome pulmonaire soient rares, leur recherche est un élément indispensable du bilan diagnostique de cette tumeur car ils permettent aux patients d'accéder à des thérapies ciblées performantes ayant transformé le pronostic, jusqu'alors sombre, de ce cancer.

Face à l'enjeu majeur de la détection de ces altérations, la LD-RTPCR apparaît comme étant une technique prometteuse qui pourrait à l'avenir représenter une alternative à la FISH dans un grand nombre de cas. Notre travail, qui a montré la faisabilité de la LD-RTPCR dans la détection en routine de ces réarrangements, nécessitera d'être complété par une validation de méthode s'inscrivant dans une démarche qualité.

Une évolution de la technique est également à envisager, consolidant ainsi la place de la LD-RTPCR dans le diagnostic des réarrangements de *ALK*, *ROS* et *RET*.

## VIII. Annexes

### A. Témoins ALK+

#### 1. Données anatomo-cliniques

Cas	Sexe	Age (ans)	Nature	Site	Organe	Type histologique	Tabac	Thérapie ciblée	Efficacité thérapie ciblée
1	F	43	B	M	Médiastin	ADK	N	O	Réponse dissociée au crizotinib 6 mois, relais céritinib inefficace
2	H	88	B	M	Plèvre	ADK	x	x	x
3	F	45	B	M	Peau	ADK	x	x	x
4	F	52	B	P	Bronche	ADK	N	O	Crizotinib efficace 14 mois (réponse complète), relais céritinib efficace (stabilisation métastases cérébrales)
5	F	50	B	P	Bronche	CNPC	O	O	Décès 3 jours après introduction
6	H	85	B	M	Médiastin	ADK	O	N	x
7	H	65	B	P	Poumon	CNPC	x	x	x
8	F	62	B	M	Sein	ADK	x	O	Non connue
9	H	50	PO	P	Poumon	ADK	x	x	x
10	H	54	B	P	Bronche	CNPC	x	x	x
11	H	65	B	M	Ganglion	ADK	x	x	x
12	F	53	PO	P	Poumon	ADK	x	x	x
13	F	74	PO	M	Ganglion	CNPC	x	x	x
14	F	66	B	M	Peau	ADK	x	x	x
15	H	64	B	M	Cerveau	ADK	x	x	x
16	H	62	B	P	Poumon	ADK	x	x	x
17	F	57	B	M	Médiastin	ADK	x	x	x
18	H	65	B	M	Plèvre	ADK	x	x	x
19	H	56	PO	P	Poumon	ADK	x	x	x
20	H	64	B	P	Bronche	ADK	x	N	x
21	F	70	PO	P	Poumon	ADK	x	x	x
22	H	54	B	P	Bronche	ADK	x	x	x
23	H	50	PO	P	Poumon	ADK	x	x	x
24	H	64	PO	M	Poumon	ADK	x	x	x
25	H	49	B	M	Cerveau	ADK	x	x	x
26	H	44	B	M	Cerveau	ADK	x	x	x
27	F	77	B	P	Bronche	ADK	x	O	Crizotinib pendant 5 mois inefficace, relais par céritinib, décès 3 semaines après introduction
28.	F	83	B	M	Plèvre	ADK	N	N	x
29.	H	57	B	M	Plèvre	ADK	x	x	x
30.	H	59	PO	P	Poumon	ADK	x	x	x
31	F	83	B	P	Bronche	ADK	x	N	x
32	H	64	B	M	Plèvre	ADK	x	x	x
33	H	59	B	M	Surrénale	ADK	x	x	x
34	F	63	B	P	Bronche	ADK	S (1PA)	O	Réponse dissociée au crizotinib pendant 2 mois1/2
35	F	36	B	P	Bronche	ADK	x	x	x
36	H	69	B	M	Ganglion	ADK	x	x	x
37	F	61	PO	P	Poumon	ADK	x	x	x
38	F	71	B	M	Plèvre	ADK	x	O	Efficacité du crizotinib 20 mois, relais par lorlatinib efficace sur métastases cérébrales

Légende : F : Femme ; H : Homme ; B : Biopsie ; PO : Pièce opératoire ; P : Primitif ; M : Métastase ; ADK : Adénocarcinome; CNPC : Carcinome non à petite cellules; O : Oui ; N : Non ; S : Sevré; PA : Paquet-année; x : non connu

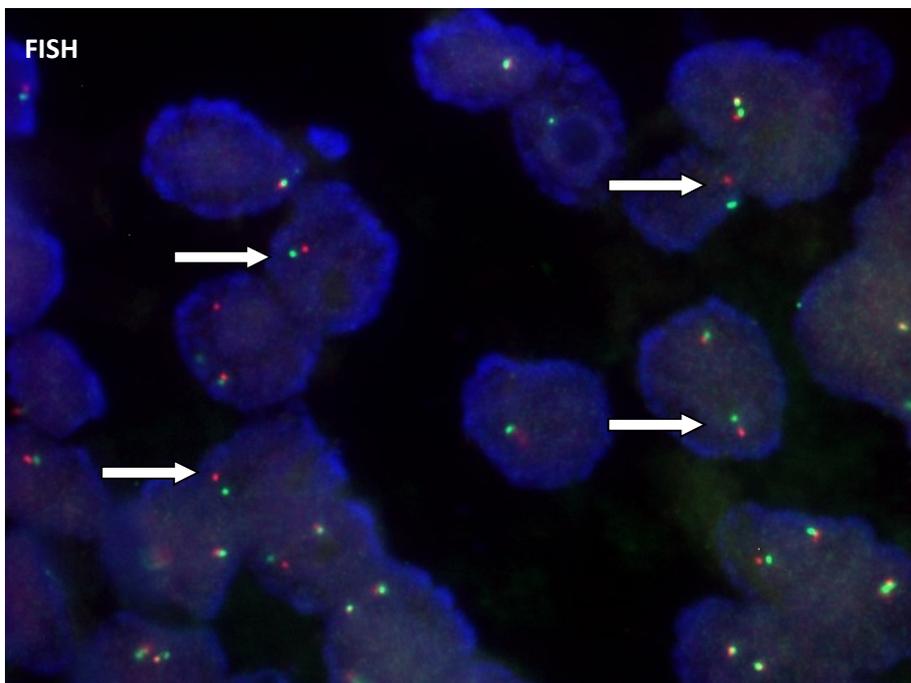
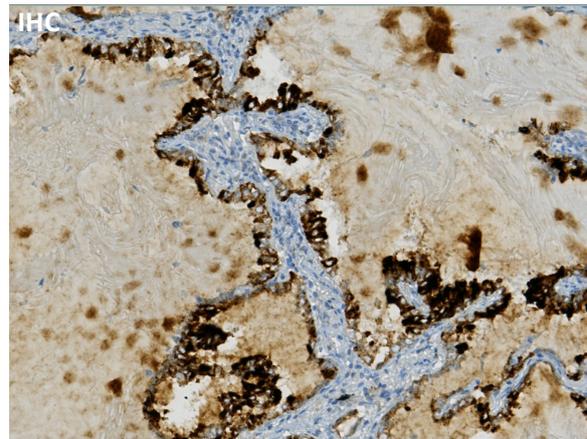
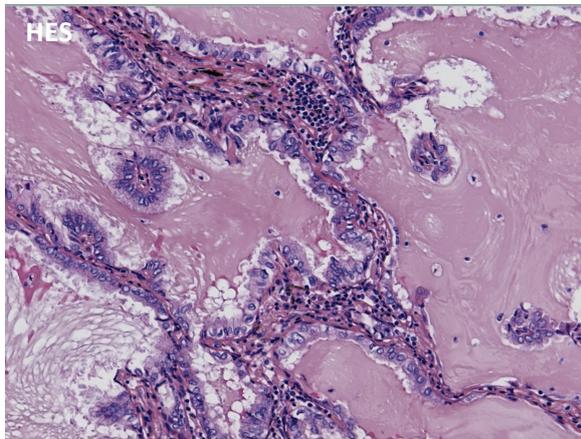
## 2. Données de biologie moléculaire

Cas	IHC intensité	Proportion CT	Surface CT (mm2)	FISH : Proportion CT réarrangées	Autre mutation	GAPDH	Résultat	Transcrit
1	3+	>50%	80	30%	N	Elevée	M	ALK e20-EML4 e6
2	douteux	>50%	15	>15% hétérogène	EGFR	Elevée	WT	
3	douteux	>50%	2	50%	N	Elevée	WT	
4	3+	peu de CT	3	50%	N	Elevée	M	ALK e20-EML4 e13
5	positif	25-50 %	4	50%	N	Faible	WT	
6	1+	>50%	25	50%	N	Elevée	WT	
7	positif	doute CT	<1	50%	N	Très faible	WT	
8	3+	doute CT	9	50%	N	Très faible	WT	
9	1 à 2+	>50%	110	>15%	KRAS	Elevée	WT	
10	3+	5.-15%	2	50%	N	Faible	WT	
11	3+	>50%	40	>50%	N	Elevée	M	ALK e20-EML4 e6
12	1 à 3+	25-50%	230	>50%	N	Elevée	WT	
13	3+	>50%	50	50%	N	Elevée	M	ALK e20-EML4 e6
14	3+	>50%	55	> 50%	N	Elevée	M	ALK e20-EML4 e13
15	1+ à 2+	>50%	120	25%	N	Elevée	WT	
16	1 à 2+	peu de CT	1	35%	N	Elevée	WT	
17	3+	15-25%	4	40%	N	Elevée	M	ALK e20-EML4 e13
18	3+	25-50%	70	40%	N	Elevée	M	ALK e20-EML4 e6
19	1 à 2+	25-50%	70	20-30%	N	Elevée	WT	
20	1 à 2+	>50%	1	20%	KRAS	Elevée	WT	
21	3+	>50%	100	50%	N	Elevée	M	ALK e20-EML4 e13
22	3+	>50%	1	20% + polysomie	N	Elevée	M	ALK e20-EML4 e13
23	3+	>50%	110	70%	N	Elevée	M	ALK e20-EML4 e2
24	2 à 3+	25-50%	60	38%	N	Elevée	WT	
25	3+	>50%	200	>15%	N	Elevée	WT	
26	3+	>50%	250	88%	N	Elevée	M	ALK e20-EML4 e20
27	3+	peu de CT	<1	50%	N	Faible	M	ALK e20-EML4 e13
28.	1+	25-50%	4	15%	KRAS	Elevée	WT	
29.	1 à 2+	25-50%	70	18%	KRAS	Elevée	WT	
30.	3+	>50%	200	72%	N	Elevée	M	ALK e20-EML4 e20
31	3+	<5%	1	>15%	N	Faible	WT	
32	1+	25-50%	60	23%	N	Elevée	WT	
33	3+	peu de CT	1	30%	KRAS	Elevée	WT	
34	3+	<5%	1	22%	N	Très faible	WT	
35	3+	25-50%	20	69%	N	Elevée	WT	
36	1 à 2+	25-50%	4	28%	N	Elevée	WT	
37	3+	25-50 %	200	73%	N	Elevée	M	ALK e20-EML4 e13
38	3+	30%	45	>50%	N	Elevée	M	ALK e20-EML4 e18

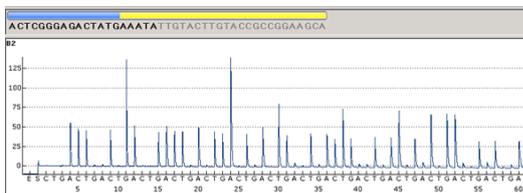
Légende : CT : Cellule Tumorale ; M : Muté; N : non; WT : *Wild Type*, absence de mutation

### 3. Exemples

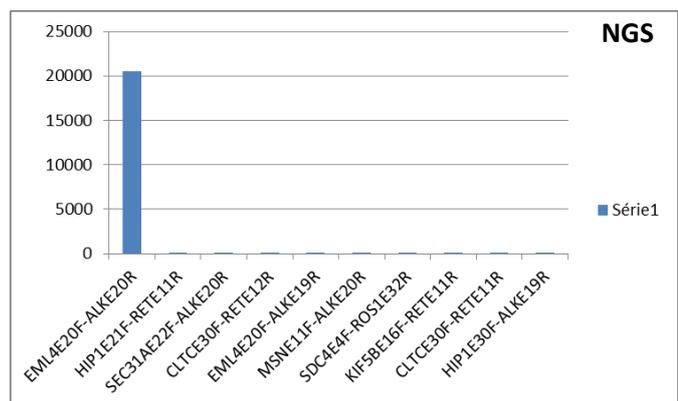
Cas n°30



#### Pyroséquence



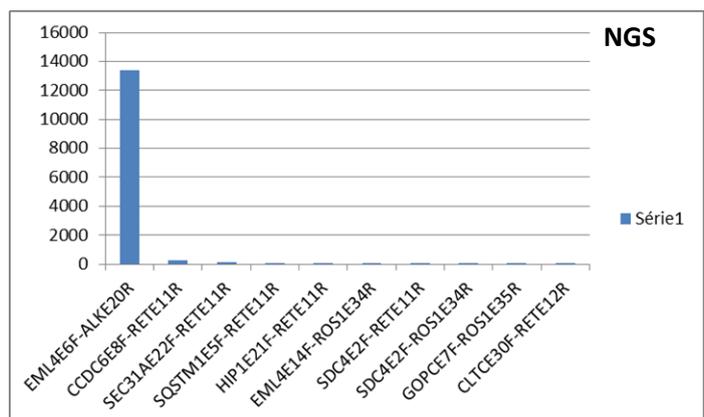
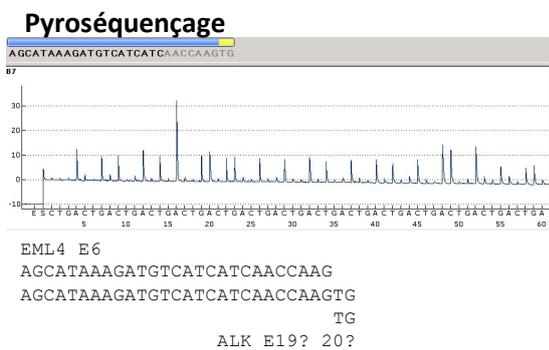
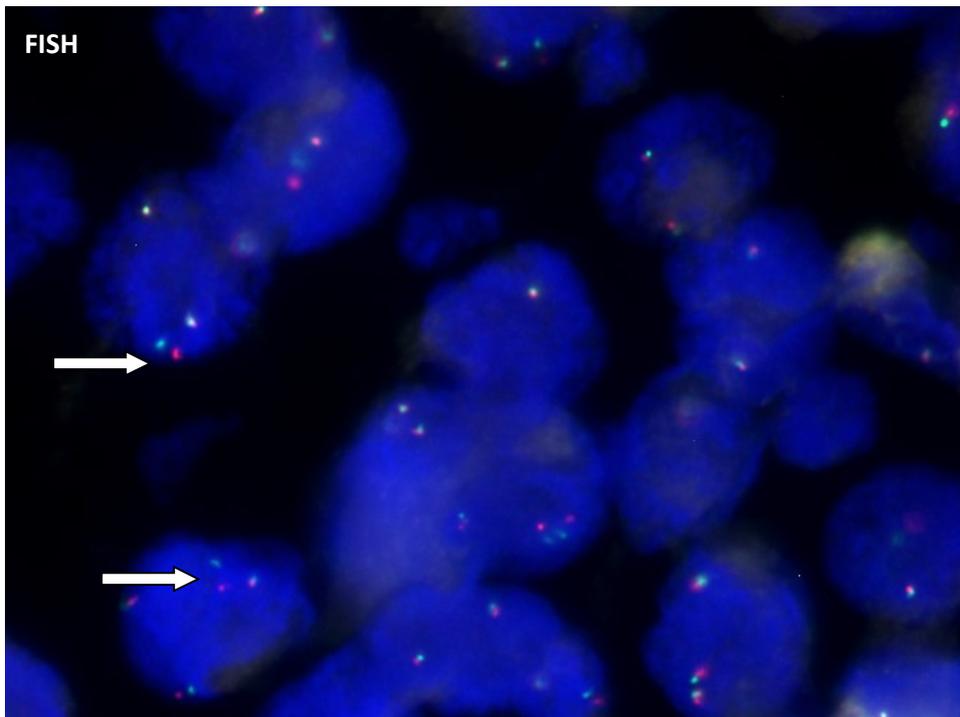
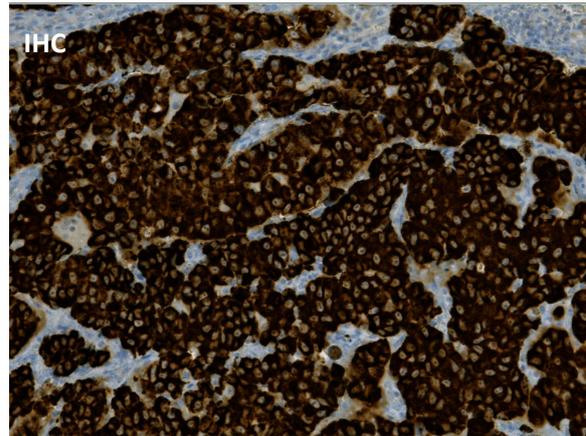
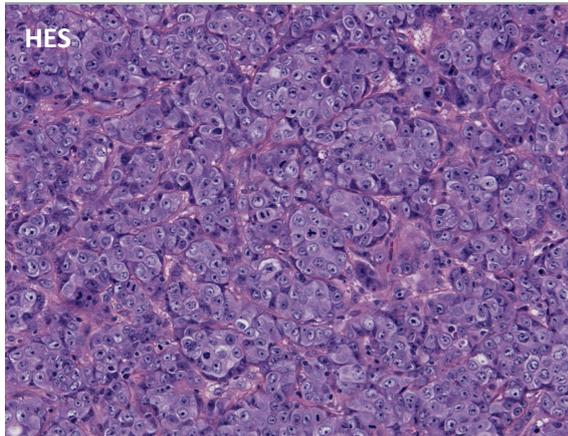
EML4 E20  
 ACTCGGGAGACTATGAAATATGTACT  
 ACTCGGGAGACTATGAAATATGTACTTGTACCGCCGGAAGCA  
 TGTACCGCCGGAAGCA  
 ALK E20



Commentaire : Positivité 3+ en IHC ALK, présence de *split* en FISH, positivité franche en LD-RTPCR, en pyroséquence et NGS

(IHC ALK : clone D5F3 Ventana®; FISH ALK : sondes Vysis break apart, Abbott®)

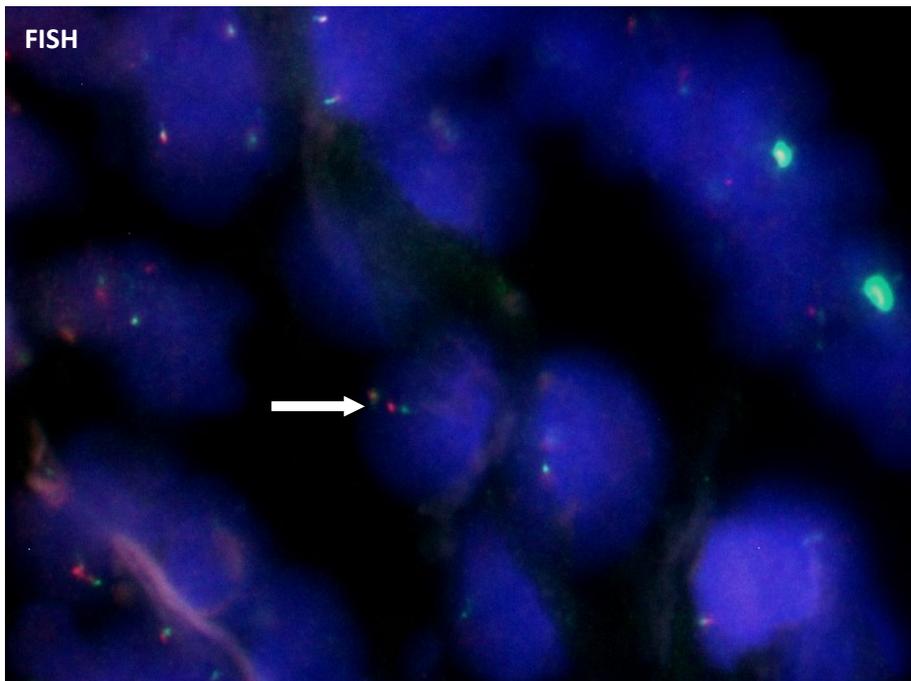
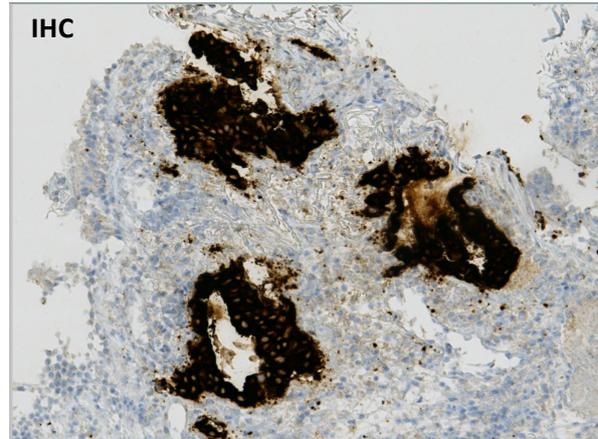
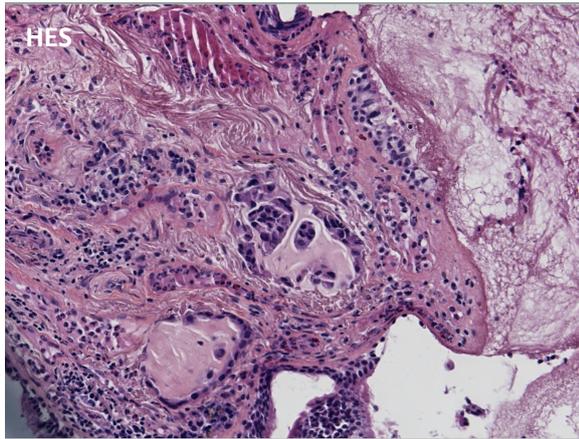
Cas n° 11



Commentaire : Positivité 3+ en IHC ALK, présence de *split* en FISH, positivité franche en LD-RTPCR, transcrit difficile à caractériser en pyroséquençage et caractérisable en NGS

(IHC ALK : clone D5F3 Ventana®; FISH ALK : sondes Vysis break apart, Abbott®)

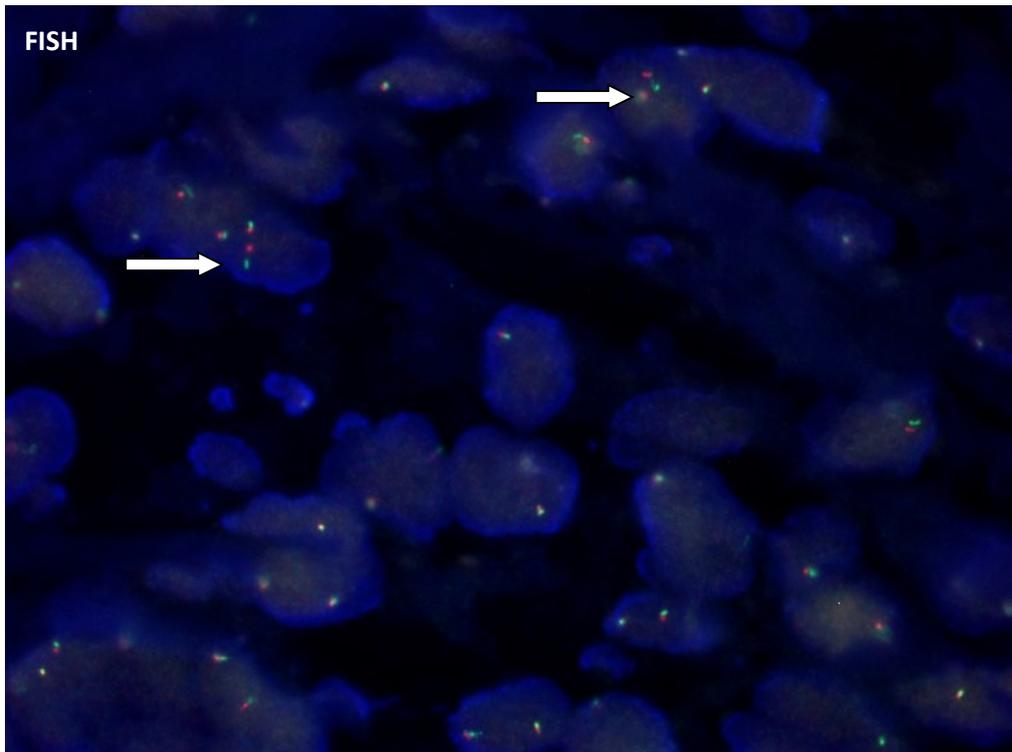
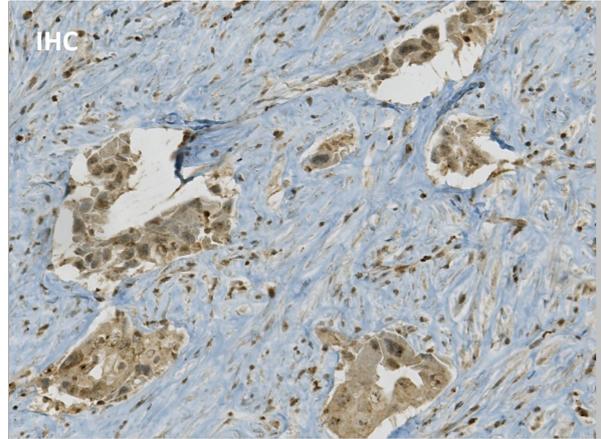
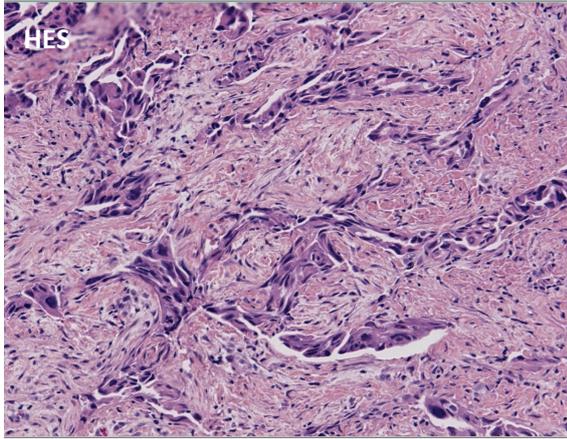
Cas n°31



Commentaire : Positivité 3+ en IHC ALK, présence de *split* en FISH, cas négatif en LD-RTPCR : absence de produit de PCR sur le gel d'agarose, pyroséquençage et NGS non réalisés de ce fait. Il s'agit d'un prélèvement qui contenait peu d'ARN exploitable.

(IHC ALK : clone D5F3 Ventana®; FISH ALK : sondes Vysis break apart, Abbott®)

Cas n°32



Commentaire : Positivité 1+ en IHC ALK, présence de *split* en FISH, cas négatif en LD-RTPCR : absence de produit de PCR sur le gel d'agarose, pyroséquençage et NGS non réalisés de ce fait.

(IHC ALK : clone D5F3 Ventana®; FISH ALK : sondes Vysis break apart, Abbott®)

## B. Témoins ROS

### 1. Données anatomo-cliniques

Cas	Sexe	Age (ans)	Nature	Site	Organe	Type histologique	Tabac	Thérapie ciblée	Efficacité thérapie ciblée
A	H	52	PO	M	Poumon	ADK	x	x	x
B	H	54	PO	M	Ganglion	ADK	x	x	x
C	H	49	B	M	Cerveau	ADK	x	x	x
D	F	55	PO	P	Poumon	CAD	x	x	x
E	H	77	B	P	Bronche	CS	x	x	x
F	F	56	B	M	Os	ADK	N	N	x
G	H	56	PO	P	Poumon	ADK	x	x	x
H	F	34	B	P	Bronche	ADK	N	N	x
I	F	62	CYTO	M	Péricarde	CNPC	x	x	x
J	F	31	B	M	Ganglion	ADK	N	O	Réponse dissociée, relais par plusieurs TKI de nouvelle génération
K	F	70	B	M	Plèvre	ADK	x	x	x
L	H	41	PO	M	Ganglion	ADK	x	x	x
M	H	59	PO	M	Ganglion	CNPC	x	x	x
N	H	52	PO	M	Poumon	ADK	x	x	x

Légende : F : Femme ; H : Homme ; B : Biopsie ; PO : Pièce opératoire ; CYTO : Cytologie P : Primitif ; M : Métastase ; ADK : Adénocarcinome ; CNPC: Carcinome non à petite cellules; CAD : Carcinome adénoquameux ; CS : Carcinome sarcomatoïde ; O : Oui ; N : Non; TKI : Inhibiteur de tyrosine kinase; x : Non connu

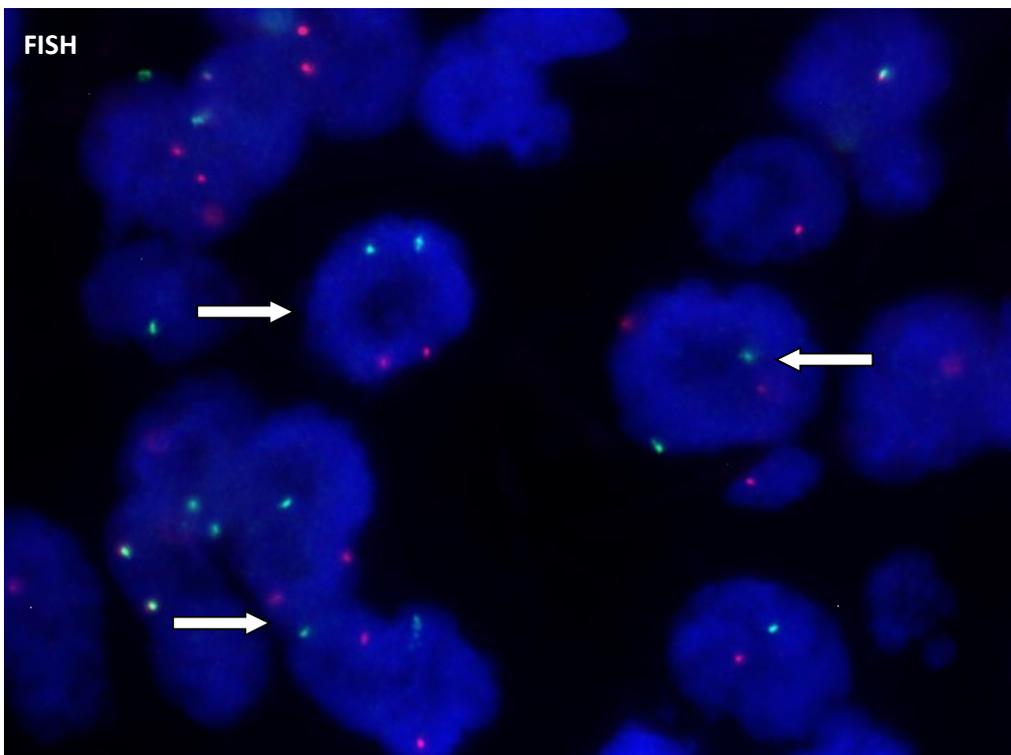
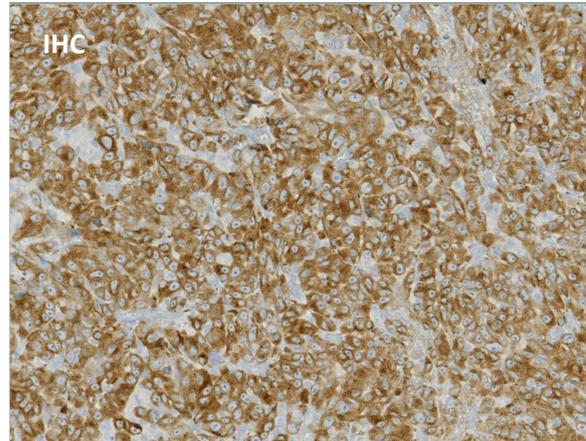
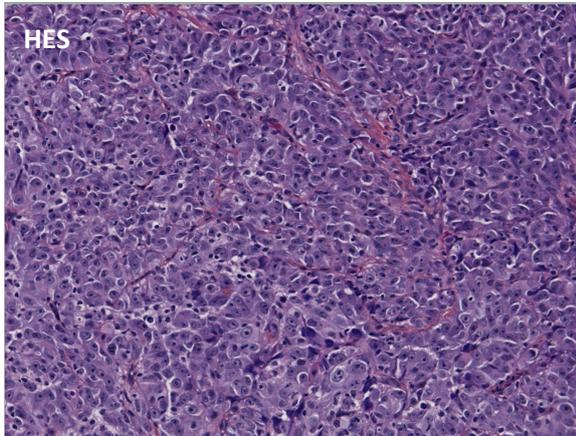
### 2. Données de biologie moléculaire

Cas	IHC intensité	Proportion CT	Surface CT (mm2)	CT réarrangées en FISH	Autre mutation	GAPDH	Résultat	Transcrit
A	2+	>50	100	50%	x	Elevée	M	ROSe34-CD74e6
B	1+	25-50	70	30%	x	Elevée	M	ROSe34-CD74e6
C	douteux	>50	400	78%	x	Elevée	M	ROSe34-CD74e6
D	douteux à 1+	>50	200	23%	x	Elevée	WT	
E	douteux à 1+	25-50	6	18%	x	Elevée	WT	
F	3+	25-50	40	25%	x	Elevée	M	ROSe32-SLC34A2e13
G	1+	>50	200	20%	x	Elevée	M	ROSe34-CD74e6
H	2 à 3+	peu de CT	3	80%	x	Elevée	M	ROSe34-CD74e6
I	1+	>50	250	57%	x	Elevée	WT	
J	3+	>50	60	98%	x	Elevée	WT	
K	3+	>50	60	95%	x	Elevée	M	ROSe34-CD74e6
L	3+	>50	50	30%	x	Elevée	WT	
M	2 à 3+	>50	55	76%	x	Elevée	M	ROSe34-CD74e6
N	2 à 3+	>50	180	91%	x	Elevée	M	ROSe34-CD74e6

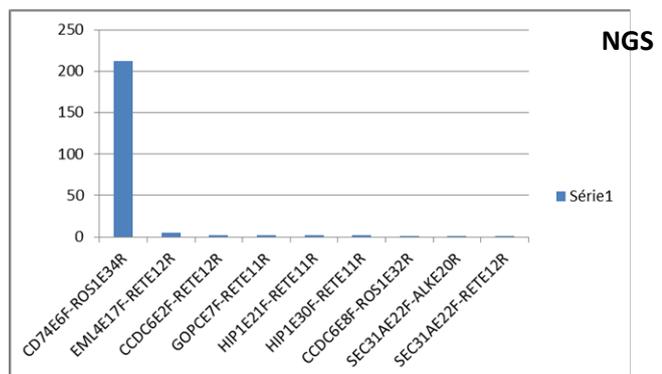
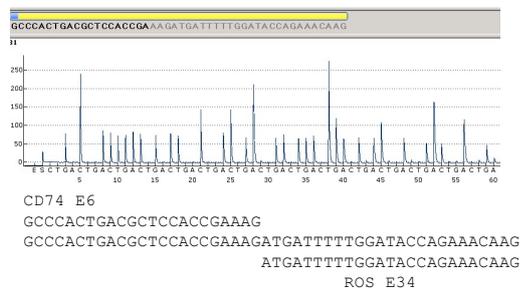
Légende : CT : Cellule Tumorale ; x : absence d'autre mutation; M : Muté; WT : *Wild Type*, absence de mutation

### 3. Exemples

#### Cas K



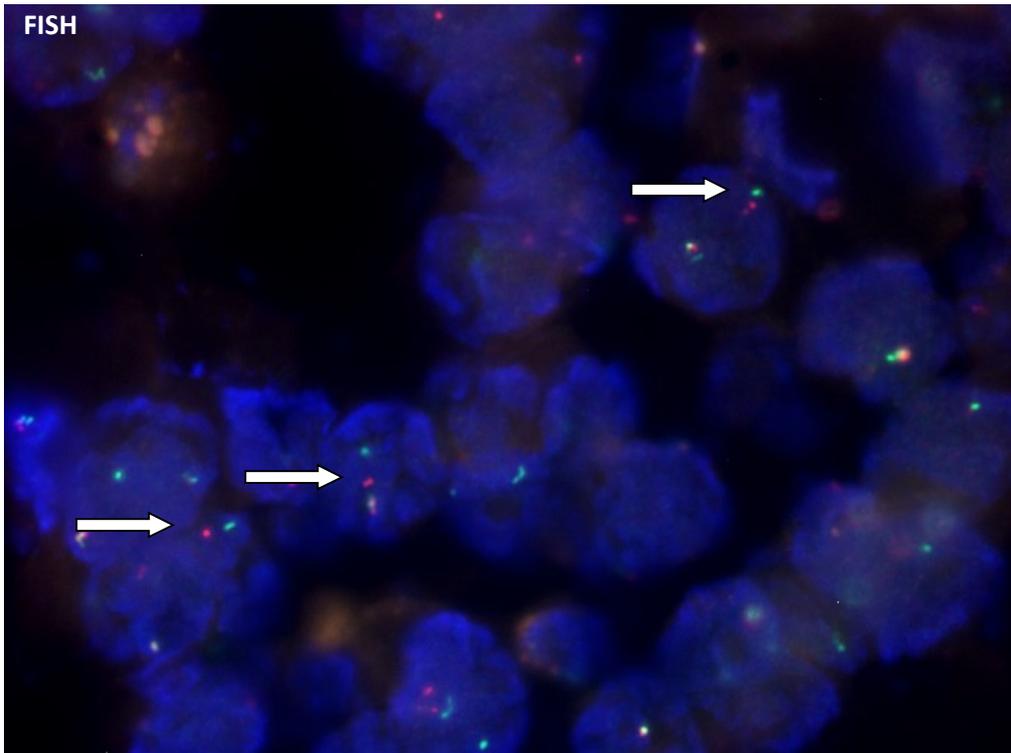
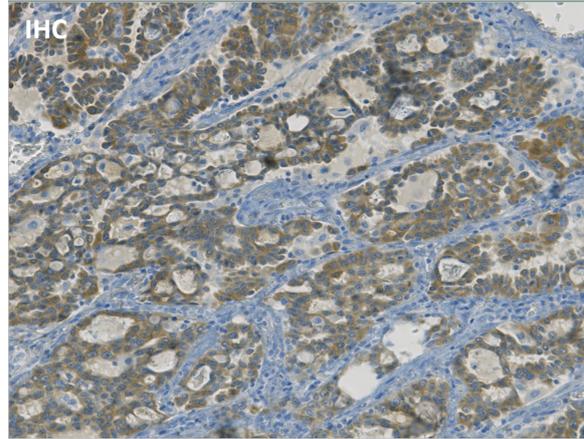
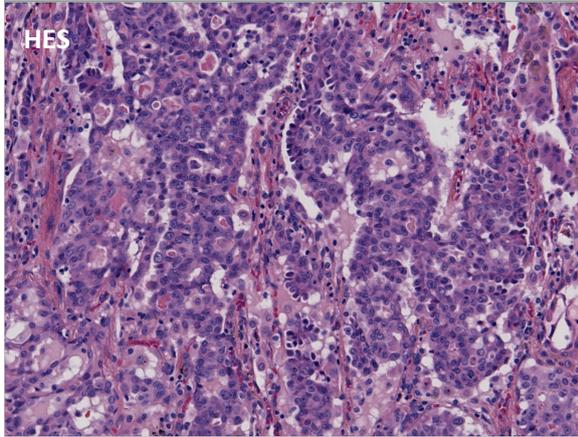
#### Pyroséquencage



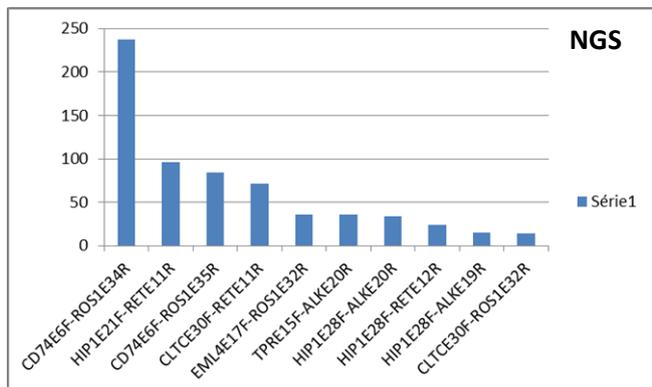
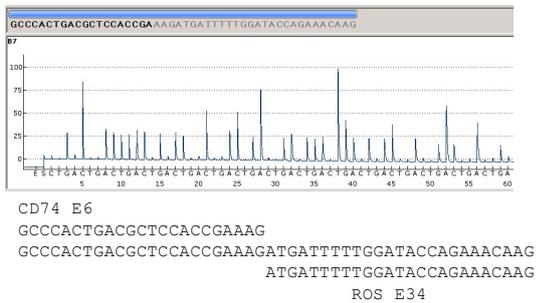
Commentaire : Positivité 3+ en IHC ROS, présence de *split* en FISH, positivité franche en LD-RTPCR, en pyroséquencage et NGS

(IHC ROS : clone D4D6 Cell Signaling Technology®; FISH ROS : Dual Color Break Apart Probe ZytoVision®)

Cas A



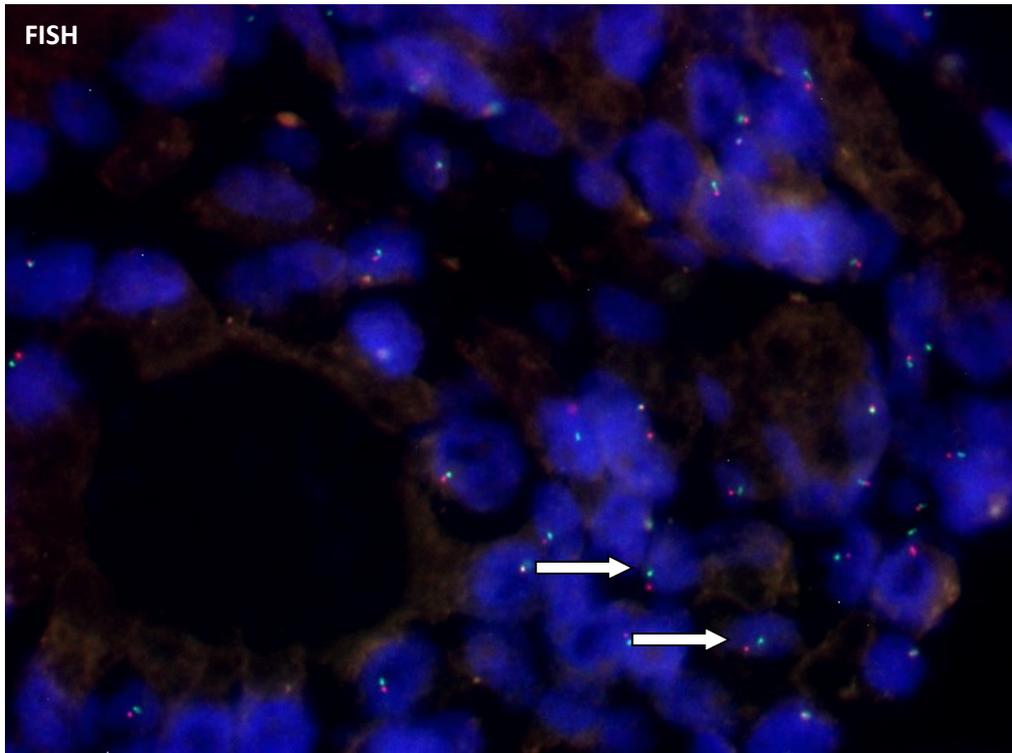
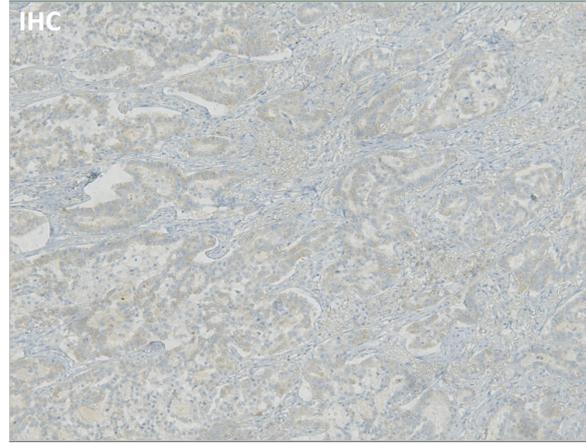
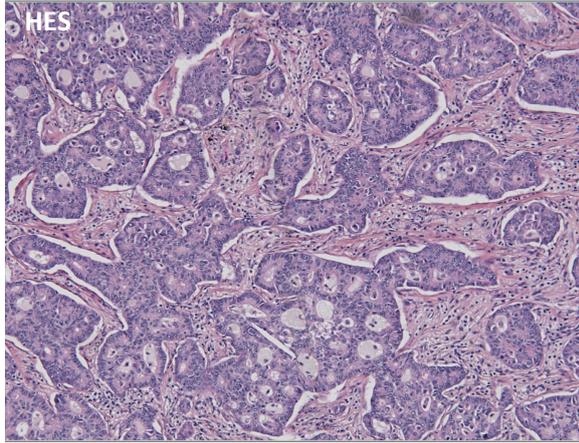
Pyroséquençage



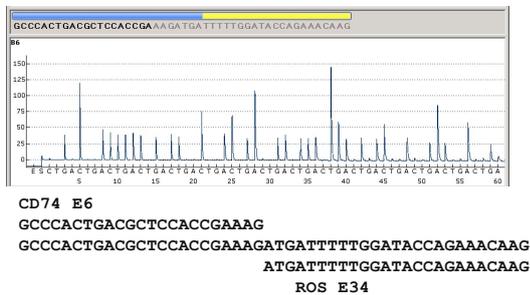
Commentaire : Positivité 2+ en IHC ROS, présence de *split* en FISH, positivité en LD-RTPCR, en pyroséquençage et NGS

(IHC ROS : clone D4D6 Cell Signaling Technology®; FISH ROS : Dual Color Break Apart Probe ZytoVision®)

## Cas G



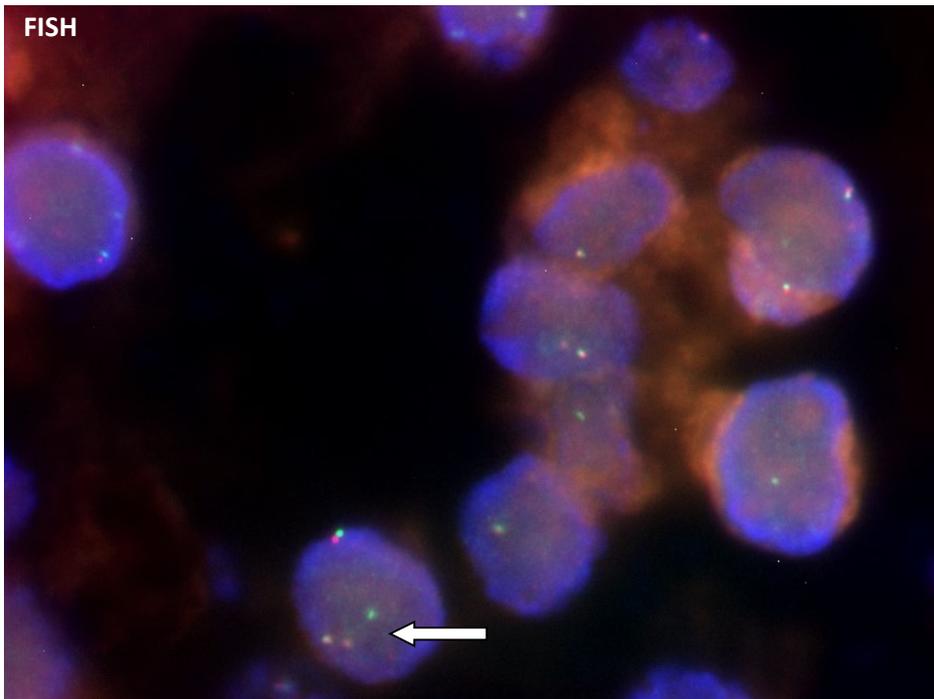
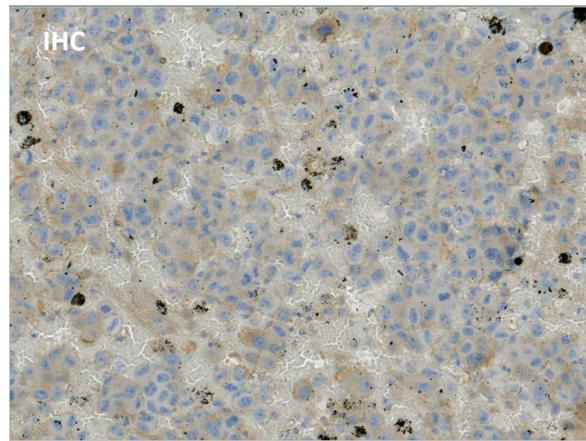
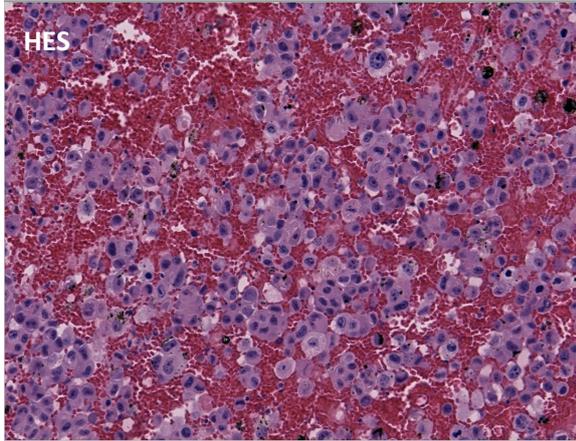
## Pyroséquençage



Commentaire : Positivité 1+ en IHC ROS, présence de *split* en FISH, positivité franche en LD-RTPCR en pyroséquençage

(IHC ROS : clone D4D6 Cell Signaling Technology®; FISH ROS : Dual Color Break Apart Probe ZytoVision®)

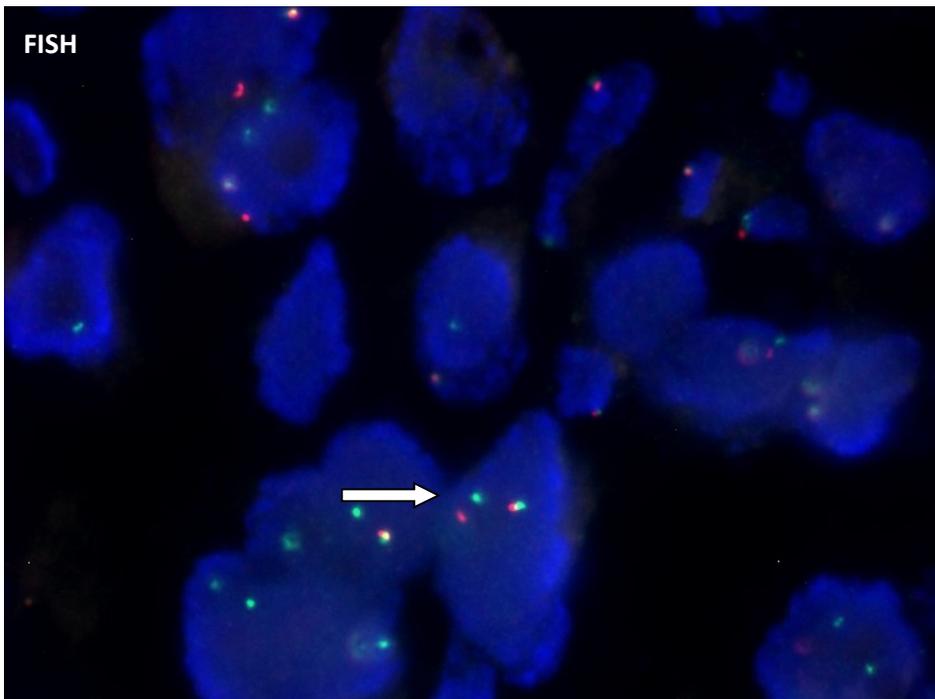
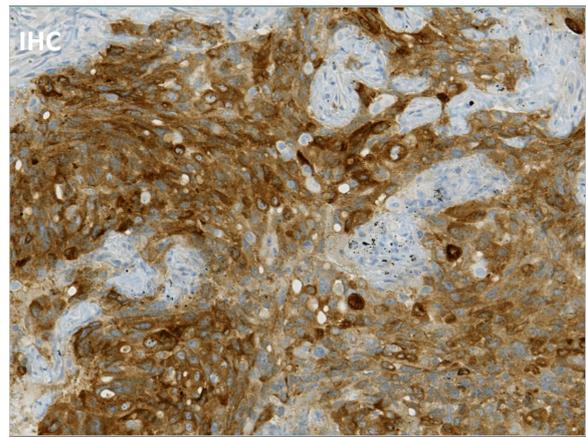
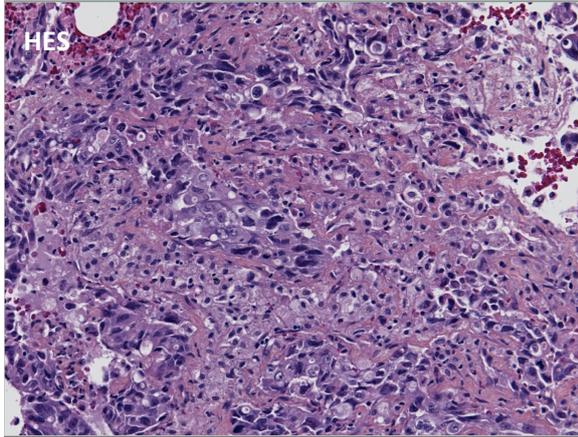
Cas I



Commentaire : Positivité 1+ en IHC ROS, présence de *split* en FISH, cas négatif en LD-RTPCR : absence de produit de PCR sur le gel d'agarose, pyroséquençage et NGS non réalisés de ce fait

(IHC ROS : clone D4D6 Cell Signaling Technology®; FISH ROS : Dual Color Break Apart Probe ZytoVision®)

Cas J



Commentaire : Positivité 3+ en IHC ROS, présence de *split* en FISH, cas négatif en LD-RTPCR : absence de produit de PCR sur le gel d'agarose, pyroséquençage et NGS non réalisés de ce fait

(IHC ROS : clone D4D6 Cell Signaling Technology®; FISH ROS : Dual Color Break Apart Probe ZytoVision®)

## C. Témoin RET

### 1. Données anatomo-cliniques

Cas	Sexe	Age	Nature	Site	Organe	Type histologique	Tabac	Thérapie ciblée	Efficacité thérapie ciblée
α	F	47	B	P	Bronche	ADK	N	N	x

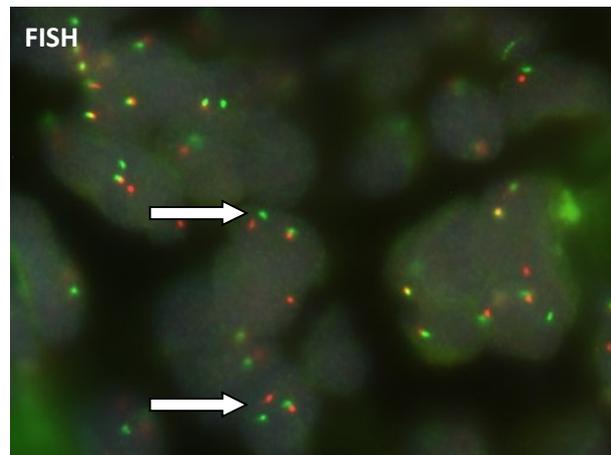
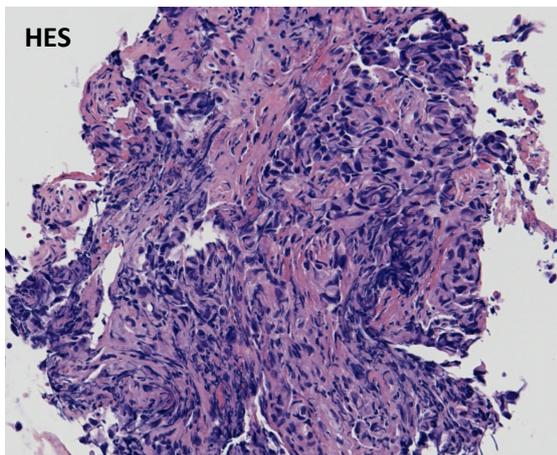
Légende : F : Femme; B : Biopsie; P : Primitif; ADK : Adénocarcinome; N : Non; x : Non connu

### 2. Données de biologie moléculaire

Cas	IHC intensité	Proportion CT	Surface CT (mm <sup>2</sup> )	CT réarrangées en FISH	Autre mutation	GAPDH	Résultat	Transcrit
α	x	25-50%	4	80%	N	Elevée	M	RET e12-KIF5B e15

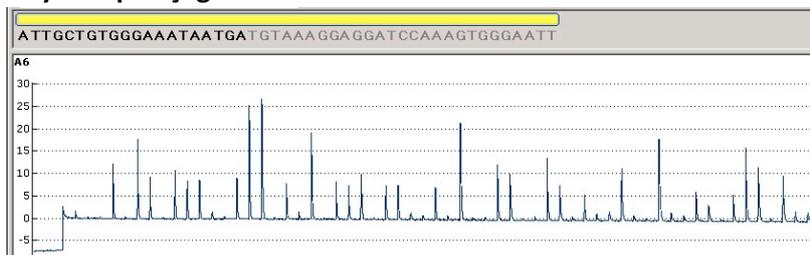
Légende : CT : Cellule Tumorale ; M : Muté; N : Non

### 3. Résultats



Avec l'aimable autorisation du service  
d'Anatomie Pathologique du CHU de Caen

### Pyroséquençage



KIF5B E15

ATTGCTGTGGGAAATAATGATGTAAAAG

ATTGCTGTGGGAAATAATGATGTAAAAGGAGGATCCAAAAGTGGGAATT

GAGGATCCAAAAGTGGGAATT

RET E12

Commentaire : Présence de *split* en FISH, positivité franche en LD-RTPCR, en pyroséquençage

(FISH RET : sondes Zytolight® SPEC RET Dual Color Break Apart Probe)

## IX. Bibliographie

1. Weinstein IB. Cancer. Addiction to oncogenes--the Achilles heel of cancer. *Science*. 5 juill 2002;297(5578):63-4.
2. Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, Gurubhagavatula S, Okimoto RA, Brannigan BW, et al. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med*. 20 mai 2004;350(21):2129-39.
3. Guibert N, Ilie M, Léna H, Didier A, Hofman P, Mazieres J. [KRAS and bronchial adenocarcinoma. Between disappointments and hopes]. *Rev Mal Respir*. 5 nov 2015;
4. Mazières J, Peters S, Lepage B, Cortot AB, Barlesi F, Beau-Faller M, et al. Lung cancer that harbors an HER2 mutation: epidemiologic characteristics and therapeutic perspectives. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 1 juin 2013;31(16):1997-2003.
5. Soda M, Choi YL, Enomoto M, Takada S, Yamashita Y, Ishikawa S, et al. Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature*. 2 août 2007;448(7153):561-6.
6. 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*. 14 déc 2007;131(6):1190-203.
7. Takeuchi K, Soda M, Togashi Y, Suzuki R, Sakata S, Hatano S, et al. RET, ROS1 and ALK fusions in lung cancer. *Nat Med*. mars 2012;18(3):378-81.
8. Kohno T, Ichikawa H, Totoki Y, Yasuda K, Hiramoto M, Nammo T, et al. KIF5B-RET fusions in lung adenocarcinoma. *Nat Med*. mars 2012;18(3):375-7.
9. Yokota K, Sasaki H, Okuda K, Shimizu S, Shitara M, Hikosaka Y, et al. KIF5B/RET fusion gene in surgically-treated adenocarcinoma of the lung. *Oncol Rep*. oct 2012;28(4):1187-92.
10. IARC. Globocan 2012 [Internet]. Disponible sur: [http://globocan.iarc.fr/Pages/fact\\_sheets\\_population.aspx](http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_population.aspx)
11. Travis WD, Brambilla E, Muller-Hermelink HK, Harris CC. WHO Pathology and genetics of tumors of the lung, pleura, thymus and heart. Lyon: IARC; 2004.
12. INCa. Les cancers en France, Les Données. 2015.
13. INCa. Les cancers en France en 2014, L'essentiel des faits et chiffres. 2015.
14. Coëtmeur D, Leveiller G, Frappat V, Martin M, Peureux M, Dehette S, et al. [Relationship between primary lung cancer and tobacco consumption. Results of the KBP-2010-CPHG study by the French College of General Hospital Respiratory Physicians]. *Rev Mal Respir*. 24 nov 2015;
15. Travis WD, Brambilla E, Burke AP, Marx A, Nicholson AG. WHO classification of tumors of the lung, pleura, thymus and heart (4th edition). Lyon: IARC; 2015.
16. World Health Organisation. World cancer report 2008. IARC. Lyon; 2008.
17. Fernandez-Cuesta L, McKay JD. Genomic architecture of lung cancers. *Curr Opin Oncol*. janv 2016;28(1):52-7.
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 Off Publ Int Assoc Study Lung Cancer*. févr 2011;6(2):244-85.

19. Rouquette Lassalle I. [Pulmonary neuroendocrine tumors and preneoplastic lesions]. *Ann Pathol*. janv 2016;36(1):34-43.
20. Collège des enseignants de pneumologie. *Pneumologie*. S-Edition; 2015.
21. Hirsch FR, Wynes MW, Gandara DR, Bunn PA. The tissue is the issue: personalized medicine for non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 15 oct 2010;16(20):4909-11.
22. Union Internationale Contre le Cancer. *TNM, classification des tumeurs malignes*. 7e éd. Cassini; 2010.
23. INCa. *Cancer bronchique non à petites cellules, référentiel national de RCP*. 2015.
24. Penault-Llorca F, Tixier L, Perrot L, Cayre A. [Strategy for molecular testing in pulmonary carcinoma]. *Ann Pathol*. janv 2016;36(1):73-9.
25. Brosseau S, Viala M, Varga A, Planchard D, Besse B, Soria J-C. [3rd generation's TKI in lung cancer non-small cell EGFR-mutated having acquired a secondary T790M resistance]. *Bull Cancer (Paris)*. sept 2015;102(9):749-57.
26. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 4 mars 2011;144(5):646-74.
27. Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, Zhou S, Diaz LA, Kinzler KW. Cancer genome landscapes. *Science*. 29 mars 2013;339(6127):1546-58.
28. Kandoth C, McLellan MD, Vandin F, Ye K, Niu B, Lu C, et al. Mutational landscape and significance across 12 major cancer types. *Nature*. 17 oct 2013;502(7471):333-9.
29. Govindan R, Ding L, Griffith M, Subramanian J, Dees ND, Kanchi KL, et al. Genomic landscape of non-small cell lung cancer in smokers and never-smokers. *Cell*. 14 sept 2012;150(6):1121-34.
30. Seo J-S, Ju YS, Lee W-C, Shin J-Y, Lee JK, Bleazard T, et al. The transcriptional landscape and mutational profile of lung adenocarcinoma. *Genome Res*. nov 2012;22(11):2109-19.
31. Barlesi F, Mazieres J, Merlio J-P, Debieuvre D, Mosser J, Lena H, et al. Routine molecular profiling of patients with advanced non-small-cell lung cancer: results of a 1-year nationwide programme of the French Cooperative Thoracic Intergroup (IFCT). *Lancet Lond Engl*. 14 janv 2016;
32. Ruppert A-M, Wislez M, Poulot V, Lacave R, Antoine M, Cadranet J. [A simple view on lung cancer biology: The EGFR pathway]. *Rev Mal Respir*. avr 2011;28(4):565-77.
33. Sharma SV, Bell DW, Settleman J, Haber DA. Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *Nat Rev Cancer*. mars 2007;7(3):169-81.
34. Roukos V, Misteli T. The biogenesis of chromosome translocations. *Nat Cell Biol*. avr 2014;16(4):293-300.
35. Pan Y, Zhang Y, Li Y, Hu H, Wang L, Li H, et al. ALK, ROS1 and RET fusions in 1139 lung adenocarcinomas: a comprehensive study of common and fusion pattern-specific clinicopathologic, histologic and cytologic features. *Lung Cancer Amst Neth*. mai 2014;84(2):121-6.

36. Jancík S, Drábek J, Radzioch D, Hajdúch M. Clinical relevance of KRAS in human cancers. *J Biomed Biotechnol.* 2010;2010:150960.
37. Devarakonda S, Morgensztern D, Govindan R. Genomic alterations in lung adenocarcinoma. *Lancet Oncol.* juill 2015;16(7):e342-351.
38. Villaruz LC, Socinski MA, Cunningham DE, Chiosea SI, Burns TF, Siegfried JM, et al. The prognostic and predictive value of KRAS oncogene substitutions in lung adenocarcinoma. *Cancer.* 15 juin 2013;119(12):2268-74.
39. Ohtaki Y, Shimizu K, Kakegawa S, Nagashima T, Nakano T, Atsumi J, et al. Postrecurrence survival of surgically resected pulmonary adenocarcinoma patients according to EGFR and KRAS mutation status. *Mol Clin Oncol.* mars 2014;2(2):187-96.
40. Mazières J, Barlesi F, Filleron T, Besse B, Monnet I, Beau-Faller M, et al. Lung cancer patients with HER2 mutations treated with chemotherapy and HER2-targeted drugs: Results from the European EUHER2 cohort. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol ESMO.* 23 nov 2015;
41. Rouviere D, Bousquet E, Pons E, Milia J-D, Guibert N, Mazieres J. [New targets and new drugs in thoracic oncology]. *Rev Mal Respir.* oct 2015;32(8):867-76.
42. Gautschi O, Pauli C, Strobel K, Hirschmann A, Printzen G, Aebi S, et al. A patient with BRAF V600E lung adenocarcinoma responding to vemurafenib. *J Thorac Oncol Off Publ Int Assoc Study Lung Cancer.* oct 2012;7(10):e23-24.
43. Peters S, Michielin O, Zimmermann S. Dramatic response induced by vemurafenib in a BRAF V600E-mutated lung adenocarcinoma. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 10 juill 2013;31(20):e341-344.
44. Robinson SD, O'Shaughnessy JA, Cowey CL, Konduri K. BRAF V600E-mutated lung adenocarcinoma with metastases to the brain responding to treatment with vemurafenib. *Lung Cancer Amst Neth.* août 2014;85(2):326-30.
45. Hyman DM, Puzanov I, Subbiah V, Faris JE, Chau I, Blay J-Y, et al. Vemurafenib in Multiple Nonmelanoma Cancers with BRAF V600 Mutations. *N Engl J Med.* 20 août 2015;373(8):726-36.
46. Planchard D, Mazieres J, Riely GJ, Rudin CM, Barlesi F, Quoix EA, et al. Interim results of phase II study BRF113928 of dabrafenib in BRAF V600E mutation-positive non-small cell lung cancer (NSCLC) patients. *ASCO Meet Abstr.* 20 mai 2013;31(15\_suppl):8009.
47. Ruppert A-M, Beau-Faller M, Belmont L, Lavolé A, Gounant V, Cadranel J, et al. [A simple view on lung cancer biology: the MET pathway]. *Rev Mal Respir.* déc 2011;28(10):1241-9.
48. AcSé crizotinib - Le programme AcSé | Institut National Du Cancer [Internet]. [cité 23 nov 2015]. Disponible sur: <http://www.e-cancer.fr/Professionnels-de-la-recherche/Recherche-clinique/Le-programme-AcSe2/AcSe-crizotinib>
49. Les plateformes de génétique moléculaire des cancers - Les thérapies ciblées | Institut National Du Cancer [Internet]. [cité 7 déc 2015]. Disponible sur: <http://www.e-cancer.fr/Professionnels-de-sante/Les-therapies-ciblees/Les-plateformes-de-genetique-moleculaire-des-cancers>
50. AcSé vemurafenib - Le programme AcSé | Institut National Du Cancer [Internet]. [cité 15 juin 2016]. Disponible sur: <http://www.e-cancer.fr/Professionnels-de-la-recherche/Recherche-clinique/Le-programme-AcSe/AcSe-vemurafenib>

51. Zhao Z, Verma V, Zhang M. Anaplastic lymphoma kinase: role in cancer and therapy perspective. *Cancer Biol Ther.* 3 nov 2015;0.
52. Palmer RH, Verneris E, Grabbe C, Hallberg B. Anaplastic lymphoma kinase: signalling in development and disease. *Biochem J.* 15 juin 2009;420(3):345-61.
53. Voena C, Peola S, Chiarle R. The anaplastic lymphoma kinase as an oncogene in solid tumors. *Front Biosci Sch Ed.* 2015;7:269-82.
54. Shackelford RE, Vora M, Mayhall K, Cotelingam J. ALK-rearrangements and testing methods in non-small cell lung cancer: a review. *Genes Cancer.* avr 2014;5(1-2):1-14.
55. Ou S-HI, Bartlett CH, Mino-Kenudson M, Cui J, Iafrate AJ. Crizotinib for the treatment of ALK-rearranged non-small cell lung cancer: a success story to usher in the second decade of molecular targeted therapy in oncology. *The Oncologist.* 2012;17(11):1351-75.
56. Chan ELY, Chin CHY, Lui VWY. An update of ALK inhibitors in human clinical trials. *Future Oncol Lond Engl.* 30 nov 2015;
57. Chiarle R, Voena C, Ambrogio C, Piva R, Inghirami G. The anaplastic lymphoma kinase in the pathogenesis of cancer. *Nat Rev Cancer.* janv 2008;8(1):11-23.
58. Barreca A, Lasorsa E, Riera L, Machiorlatti R, Piva R, Ponzoni M, et al. Anaplastic lymphoma kinase in human cancer. *J Mol Endocrinol.* août 2011;47(1):R11-23.
59. Choi Y-L, Lira ME, Hong M, Kim RN, Choi S-J, Song J-Y, et al. A novel fusion of TPR and ALK in lung adenocarcinoma. *J Thorac Oncol Off Publ Int Assoc Study Lung Cancer.* avr 2014;9(4):563-6.
60. Togashi Y, Soda M, Sakata S, Sugawara E, Hatano S, Asaka R, et al. KLC1-ALK: a novel fusion in lung cancer identified using a formalin-fixed paraffin-embedded tissue only. *PloS One.* 2012;7(2):e31323.
61. Wong DW-S, Leung EL-H, Wong SK-M, Tin VP-C, Sihoe AD-L, Cheng L-C, et al. A novel KIF5B-ALK variant in nonsmall cell lung cancer. *Cancer.* 15 juin 2011;117(12):2709-18.
62. Shan L, Jiang P, Xu F, Zhang W, Guo L, Wu J, et al. BIRC6-ALK, a Novel Fusion Gene in ALK Break-Apart FISH-Negative Lung Adenocarcinoma, Responds to Crizotinib. *J Thorac Oncol Off Publ Int Assoc Study Lung Cancer.* juin 2015;10(6):e37-39.
63. To K-F, Tong JHM, Yeung KSF, Lung RWM, Law PPY, Chau SL, et al. Detection of ALK rearrangement by immunohistochemistry in lung adenocarcinoma and the identification of a novel EML4-ALK variant. *J Thorac Oncol Off Publ Int Assoc Study Lung Cancer.* juill 2013;8(7):883-91.
64. Sanders HR, Li H-R, Bruey J-M, Scheerle JA, Meloni-Ehrig AM, Kelly JC, et al. Exon scanning by reverse transcriptase-polymerase chain reaction for detection of known and novel EML4-ALK fusion variants in non-small cell lung cancer. *Cancer Genet.* janv 2011;204(1):45-52.
65. Fang DD, Zhang B, Gu Q, Lira M, Xu Q, Sun H, et al. HIP1-ALK, a novel ALK fusion variant that responds to crizotinib. *J Thorac Oncol Off Publ Int Assoc Study Lung Cancer.* mars 2014;9(3):285-94.
66. Hong M, Kim RN, Song J-Y, Choi S-J, Oh E, Lira ME, et al. HIP1-ALK, a novel fusion protein identified in lung adenocarcinoma. *J Thorac Oncol Off Publ Int Assoc Study Lung Cancer.* mars 2014;9(3):419-22.
67. Ou S-HI, Klempner SJ, Greenbowe JR, Azada M, Schrock AB, Ali SM, et al. Identification of a novel HIP1-ALK fusion variant in Non-Small-Cell Lung Cancer (NSCLC) and discovery of ALK I1171

- (I1171N/S) mutations in two ALK-rearranged NSCLC patients with resistance to Alectinib. *J Thorac Oncol Off Publ Int Assoc Study Lung Cancer*. déc 2014;9(12):1821-5.
68. Iyevleva AG, Raskin GA, Tiurin VI, Sokolenko AP, Mitiushkina NV, Aleksakhina SN, et al. Novel ALK fusion partners in lung cancer. *Cancer Lett*. 28 juin 2015;362(1):116-21.
69. Kim RN, Choi Y-L, Lee M-S, Lira ME, Mao M, Mann D, et al. SEC31A-ALK Fusion Gene in Lung Adenocarcinoma. *Cancer Res Treat Off J Korean Cancer Assoc*. 17 févr 2015;
70. Penzel R, Schirmacher P, Warth A. A novel EML4-ALK variant: exon 6 of EML4 fused to exon 19 of ALK. *J Thorac Oncol Off Publ Int Assoc Study Lung Cancer*. juill 2012;7(7):1198-9.
71. Wang R, Pan Y, Li C, Hu H, Zhang Y, Li H, et al. The use of quantitative real-time reverse transcriptase PCR for 5' and 3' portions of ALK transcripts to detect ALK rearrangements in lung cancers. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 1 sept 2012;18(17):4725-32.
72. 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 Off J Am Assoc Cancer Res*. 1 mai 2009;15(9):3143-9.
73. Jung Y, Kim P, Jung Y, Keum J, Kim S-N, Choi YS, et al. Discovery of ALK-PTPN3 gene fusion from human non-small cell lung carcinoma cell line using next generation RNA sequencing. *Genes Chromosomes Cancer*. juin 2012;51(6):590-7.
74. Morris SW, Kirstein MN, Valentine MB, Dittmer KG, Shapiro DN, Saltman DL, et al. Fusion of a kinase gene, ALK, to a nucleolar protein gene, NPM, in non-Hodgkin's lymphoma. *Science*. 4 mars 1994;263(5151):1281-4.
75. Rodig SJ, Mino-Kenudson M, Dacic S, Yeap BY, Shaw A, Barletta JA, et al. Unique Clinicopathologic Features Characterize ALK-Rearranged Lung Adenocarcinoma in the Western Population. *Clin Cancer Res*. 15 août 2009;15(16):5216-23.
76. Doebele RC, Lu X, Sumey C, Maxson DA, Weickhardt AJ, Oton AB, et al. Oncogene status predicts patterns of metastatic spread in treatment-naïve nonsmall cell lung cancer. *Cancer*. 15 sept 2012;118(18):4502-11.
77. Kwak EL, Bang Y-J, Camidge DR, Shaw AT, Solomon B, Maki RG, et al. Anaplastic lymphoma kinase inhibition in non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*. 28 oct 2010;363(18):1693-703.
78. Camidge DR, Bang Y-J, Kwak EL, Iafrate AJ, Varella-Garcia M, Fox SB, et al. Activity and safety of crizotinib in patients with ALK-positive non-small-cell lung cancer: updated results from a phase 1 study. *Lancet Oncol*. oct 2012;13(10):1011-9.
79. 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*. août 2011;35(8):1226-34.
80. Shaw AT, Yeap BY, Mino-Kenudson M, Digumarthy SR, Costa DB, Heist RS, et al. Clinical features and outcome of patients with non-small-cell lung cancer who harbor EML4-ALK. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 10 sept 2009;27(26):4247-53.
81. Toyokawa G, Seto T. Anaplastic lymphoma kinase rearrangement in lung cancer: its biological and clinical significance. *Respir Investig*. nov 2014;52(6):330-8.
82. Tsao M-S, Hirsch FR, Yatabe Y. IASLC Atlas of ALK Testing in Lung Cancer. IASLC press. 2013.

83. Kim H, Xu X, Yoo S-B, Sun P-L, Jin Y, Paik JH, et al. Discordance between anaplastic lymphoma kinase status in primary non-small-cell lung cancers and their corresponding metastases. *Histopathology*. janv 2013;62(2):305-14.
84. Martin V, Bernasconi B, Merlo E, Balzarini P, Vermi W, Riva A, et al. ALK testing in lung adenocarcinoma: technical aspects to improve FISH evaluation in daily practice. *J Thorac Oncol Off Publ Int Assoc Study Lung Cancer*. avr 2015;10(4):595-602.
85. Zhou J, Zhao J, Sun K, Wang B, Wang L, Chen X, et al. Accurate and economical detection of ALK positive lung adenocarcinoma with semiquantitative immunohistochemical screening. *PloS One*. 2014;9(3):e92828.
86. Sasaki T, Koivunen J, Ogino A, Yanagita M, Nikiforow S, Zheng W, et al. A novel ALK secondary mutation and EGFR signaling cause resistance to ALK kinase inhibitors. *Cancer Res*. 15 sept 2011;71(18):6051-60.
87. Gainor JF, Varghese AM, Ou S-HI, Kabraji S, Awad MM, Katayama R, et al. ALK rearrangements are mutually exclusive with mutations in EGFR or KRAS: an analysis of 1,683 patients with non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 1 août 2013;19(15):4273-81.
88. Cooper W, Fox S, O'Toole S, Morey A, Frances G, Pavlakis N, et al. National Working Group Meeting on ALK diagnostics in lung cancer. *Asia Pac J Clin Oncol*. avr 2014;10 Suppl 2:11-7.
89. Camidge DR, Kono SA, Lu X, Okuyama S, Barón AE, Oton AB, et al. Anaplastic lymphoma kinase gene rearrangements in non-small cell lung cancer are associated with prolonged progression-free survival on pemetrexed. *J Thorac Oncol Off Publ Int Assoc Study Lung Cancer*. avr 2011;6(4):774-80.
90. Crescenzo R, Inghirami G. Anaplastic lymphoma kinase inhibitors. *Curr Opin Pharmacol*. août 2015;23:39-44.
91. Camidge DR, Skokan M, Kiatsimkul P, Helfrich B, Lu X, Barón AE, et al. Native and rearranged ALK copy number and rearranged cell count in non-small cell lung cancer: implications for ALK inhibitor therapy. *Cancer*. 15 nov 2013;119(22):3968-75.
92. Camidge DR, Pao W, Sequist LV. Acquired resistance to TKIs in solid tumours: learning from lung cancer. *Nat Rev Clin Oncol*. août 2014;11(8):473-81.
93. Liao B-C, Lin C-C, Shih J-Y, Yang JC-H. Treating patients with ALK-positive non-small cell lung cancer: latest evidence and management strategy. *Ther Adv Med Oncol*. sept 2015;7(5):274-90.
94. Hamard C, Ruppert A-M, Lavole A, Rozensztajn N, Antoine M, Cadranel J, et al. [News about targeted therapies in non-small-cell lung cancer in 2015 (except immuno-therapy)]. *Ann Pathol*. janv 2016;36(1):63-72.
95. Camidge DR, Theodoro M, Maxson DA, Skokan M, O'Brien T, Lu X, et al. Correlations between the percentage of tumor cells showing an anaplastic lymphoma kinase (ALK) gene rearrangement, ALK signal copy number, and response to crizotinib therapy in ALK fluorescence in situ hybridization-positive nonsmall cell lung cancer. *Cancer*. 15 sept 2012;118(18):4486-94.
96. Salido M, Pijuan L, Martínez-Avilés L, Galván AB, Cañadas I, Rovira A, et al. Increased ALK gene copy number and amplification are frequent in non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol Off Publ Int Assoc Study Lung Cancer*. janv 2011;6(1):21-7.

97. Heuckmann JM, Balke-Want H, Malchers F, Peifer M, Sos ML, Koker M, et al. Differential protein stability and ALK inhibitor sensitivity of EML4-ALK fusion variants. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 1 sept 2012;18(17):4682-90.
98. Bergethon K, Shaw AT, Ou S-HI, Katayama R, Lovly CM, McDonald NT, et al. ROS1 rearrangements define a unique molecular class of lung cancers. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 10 mars 2012;30(8):863-70.
99. Acquaviva J, Wong R, Charest A. The multifaceted roles of the receptor tyrosine kinase ROS in development and cancer. *Biochim Biophys Acta.* janv 2009;1795(1):37-52.
100. Shaw AT, Ou S-HI, Bang Y-J, Camidge DR, Solomon BJ, Salgia R, et al. Crizotinib in ROS1-rearranged non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med.* 20 nov 2014;371(21):1963-71.
101. Gainor JF, Shaw AT. Novel targets in non-small cell lung cancer: ROS1 and RET fusions. *The Oncologist.* 2013;18(7):865-75.
102. Ou S-HI, Chalmers ZR, Azada MC, Ross JS, Stephens PJ, Ali SM, et al. Identification of a novel TMEM106B-ROS1 fusion variant in lung adenocarcinoma by comprehensive genomic profiling. *Lung Cancer Amst Neth.* juin 2015;88(3):352-4.
103. Cai W, Li X, Su C, Fan L, Zheng L, Fei K, et al. ROS1 fusions in Chinese patients with non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol ESMO.* juill 2013;24(7):1822-7.
104. Rimkunas VM, Crosby KE, Li D, Hu Y, Kelly ME, Gu T-L, et al. Analysis of receptor tyrosine kinase ROS1-positive tumors in non-small cell lung cancer: identification of a FIG-ROS1 fusion. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 15 août 2012;18(16):4449-57.
105. Suehara Y, Arcila M, Wang L, Hasanovic A, Ang D, Ito T, et al. Identification of KIF5B-RET and GOPC-ROS1 fusions in lung adenocarcinomas through a comprehensive mRNA-based screen for tyrosine kinase fusions. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 15 déc 2012;18(24):6599-608.
106. Davies KD, Doebele RC. Molecular pathways: ROS1 fusion proteins in cancer. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 1 août 2013;19(15):4040-5.
107. Jun HJ, Johnson H, Bronson RT, de Feraudy S, White F, Charest A. The oncogenic lung cancer fusion kinase CD74-ROS activates a novel invasiveness pathway through E-Syt1 phosphorylation. *Cancer Res.* 1 août 2012;72(15):3764-74.
108. Warth A, Muley T, Dienemann H, Goeppert B, Stenzinger A, Schnabel PA, et al. ROS1 expression and translocations in non-small-cell lung cancer: clinicopathological analysis of 1478 cases. *Histopathology.* août 2014;65(2):187-94.
109. Jin Y, Sun P-L, Kim H, Park E, Shim HS, Jheon S, et al. ROS1 gene rearrangement and copy number gain in non-small cell lung cancer. *Virchows Arch Int J Pathol.* janv 2015;466(1):45-52.
110. Scheffler M, Schultheis A, Teixido C, Michels S, Morales-Espinosa D, Viteri S, et al. ROS1 rearrangements in lung adenocarcinoma: prognostic impact, therapeutic options and genetic variability. *Oncotarget.* 30 avr 2015;6(12):10577-85.
111. Kim HR, Lim SM, Kim HJ, Hwang SK, Park JK, Shin E, et al. The frequency and impact of ROS1 rearrangement on clinical outcomes in never smokers with lung adenocarcinoma. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol ESMO.* sept 2013;24(9):2364-70.

112. Go H, Kim D-W, Kim D, Keam B, Kim TM, Lee S-H, et al. Clinicopathologic analysis of ROS1-rearranged non-small-cell lung cancer and proposal of a diagnostic algorithm. *J Thorac Oncol Off Publ Int Assoc Study Lung Cancer*. nov 2013;8(11):1445-50.
113. Cai W, Li W, Ren S, Zheng L, Li X, Zhou C. Coexistence of three variants involving two different fusion partners of ROS1 including a novel variant of ROS1 fusions in lung adenocarcinoma: a case report. *J Thorac Oncol Off Publ Int Assoc Study Lung Cancer*. juin 2014;9(6):e43-46.
114. Lee HJ, Seol HS, Kim JY, Chun S-M, Suh Y-A, Park Y-S, et al. ROS1 receptor tyrosine kinase, a druggable target, is frequently overexpressed in non-small cell lung carcinomas via genetic and epigenetic mechanisms. *Ann Surg Oncol*. janv 2013;20(1):200-8.
115. Birchmeier C, Sharma S, Wigler M. Expression and rearrangement of the ROS1 gene in human glioblastoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. déc 1987;84(24):9270-4.
116. Charest A, Lane K, McMahon K, Park J, Preisinger E, Conroy H, et al. Fusion of FIG to the receptor tyrosine kinase ROS in a glioblastoma with an interstitial del(6)(q21q21). *Genes Chromosomes Cancer*. mai 2003;37(1):58-71.
117. Zhu Q, Zhan P, Zhang X, Lv T, Song Y. Clinicopathologic characteristics of patients with ROS1 fusion gene in non-small cell lung cancer: a meta-analysis. *Transl Lung Cancer Res*. juin 2015;4(3):300-9.
118. Clavé S, Gimeno J, Muñoz-Mármol AM, Vidal J, Reguart N, Carcereny E, et al. ROS1 copy number alterations are frequent in non-small cell lung cancer. *Oncotarget*. 15 janv 2016;
119. Gu T-L, Deng X, Huang F, Tucker M, Crosby K, Rimkunas V, et al. Survey of tyrosine kinase signaling reveals ROS kinase fusions in human cholangiocarcinoma. *PloS One*. 2011;6(1):e15640.
120. Lee J, Lee SE, Kang SY, Do I-G, Lee S, Ha SY, et al. Identification of ROS1 rearrangement in gastric adenocarcinoma. *Cancer*. 1 mai 2013;119(9):1627-35.
121. Birch AH, Arcand SL, Oros KK, Rahimi K, Watters AK, Provencher D, et al. Chromosome 3 anomalies investigated by genome wide SNP analysis of benign, low malignant potential and low grade ovarian serous tumours. *PloS One*. 2011;6(12):e28250.
122. Mescam-Mancini L, Lantuéjoul S, Moro-Sibilot D, Rouquette I, Souquet P-J, Audigier-Valette C, et al. On the relevance of a testing algorithm for the detection of ROS1-rearranged lung adenocarcinomas. *Lung Cancer Amst Neth*. févr 2014;83(2):168-73.
123. Sholl LM, Sun H, Butaney M, Zhang C, Lee C, Jänne PA, et al. ROS1 immunohistochemistry for detection of ROS1-rearranged lung adenocarcinomas. *Am J Surg Pathol*. sept 2013;37(9):1441-9.
124. Boyle TA, Masago K, Ellison KE, Yatabe Y, Hirsch FR. ROS1 immunohistochemistry among major genotypes of non-small-cell lung cancer. *Clin Lung Cancer*. mars 2015;16(2):106-11.
125. Chen Y-F, Hsieh M-S, Wu S-G, Chang Y-L, Shih J-Y, Liu Y-N, et al. Clinical and the prognostic characteristics of lung adenocarcinoma patients with ROS1 fusion in comparison with other driver mutations in East Asian populations. *J Thorac Oncol Off Publ Int Assoc Study Lung Cancer*. août 2014;9(8):1171-9.
126. Bos M, Gardizi M, Schildhaus H-U, Buettner R, Wolf J. Activated RET and ROS: two new driver mutations in lung adenocarcinoma. *Transl Lung Cancer Res*. avr 2013;2(2):112-21.

127. Mazières J, Zalcman G, Crinò L, Biondani P, Barlesi F, Filleron T, et al. Crizotinib therapy for advanced lung adenocarcinoma and a ROS1 rearrangement: results from the EUROS1 cohort. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 20 mars 2015;33(9):992-9.
128. EUCROSS: European Trial on Crizotinib in ROS1 Translocated Lung Cancer - Tabular View - ClinicalTrials.gov [Internet]. [cité 15 juin 2016]. Disponible sur: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/record/NCT02183870>
129. Awad MM, Katayama R, McTigue M, Liu W, Deng Y-L, Brooun A, et al. Acquired resistance to crizotinib from a mutation in CD74-ROS1. *N Engl J Med*. 20 juin 2013;368(25):2395-401.
130. Drilon A, Somwar R, Wagner JP, Vellore NA, Eide CA, Zabriskie MS, et al. A novel crizotinib-resistant solvent-front mutation responsive to cabozantinib therapy in a patient with ROS1-rearranged lung cancer. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 16 déc 2015;
131. Song A, Kim TM, Kim D-W, Kim S, Keam B, Lee S-H, et al. Molecular Changes Associated with Acquired Resistance to Crizotinib in ROS1-Rearranged Non-Small Cell Lung Cancer. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 15 mai 2015;21(10):2379-87.
132. Cargnelutti M, Corso S, Pergolizzi M, Mévellec L, Aisner DL, Dziadziuszko R, et al. Activation of RAS family members confers resistance to ROS1 targeting drugs. *Oncotarget*. 10 mars 2015;6(7):5182-94.
133. Davare MA, Vellore NA, Wagner JP, Eide CA, Goodman JR, Drilon A, et al. Structural insight into selectivity and resistance profiles of ROS1 tyrosine kinase inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 29 sept 2015;112(39):E5381-5390.
134. Borrello MG, Ardini E, Locati LD, Greco A, Licitra L, Pierotti MA. RET inhibition: implications in cancer therapy. *Expert Opin Ther Targets*. avr 2013;17(4):403-19.
135. Lin C, Wang S, Xie W, Chang J, Gan Y. The RET fusion gene and its correlation with demographic and clinicopathological features of non-small cell lung cancer: a meta-analysis. *Cancer Biol Ther*. 2015;16(7):1019-28.
136. Lira ME, Choi Y-L, Lim SM, Deng S, Huang D, Ozeck M, et al. A single-tube multiplexed assay for detecting ALK, ROS1, and RET fusions in lung cancer. *J Mol Diagn JMD*. mars 2014;16(2):229-43.
137. Drilon A, Wang L, Hasanovic A, Suehara Y, Lipson D, Stephens P, et al. Response to Cabozantinib in patients with RET fusion-positive lung adenocarcinomas. *Cancer Discov*. juin 2013;3(6):630-5.
138. Ju YS, Lee W-C, Shin J-Y, Lee S, Bleazard T, Won J-K, et al. A transforming KIF5B and RET gene fusion in lung adenocarcinoma revealed from whole-genome and transcriptome sequencing. *Genome Res*. mars 2012;22(3):436-45.
139. Lee SE, Lee B, Hong M, Song J-Y, Jung K, Lira ME, et al. Comprehensive analysis of RET and ROS1 rearrangement in lung adenocarcinoma. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc*. avr 2015;28(4):468-79.
140. Michels S, Scheel AH, Scheffler M, Schultheis AM, Gautschi O, Aebbersold F, et al. Clinicopathological Characteristics of RET Rearranged Lung Cancer in European Patients. *J Thorac Oncol Off Publ Int Assoc Study Lung Cancer*. janv 2016;11(1):122-7.
141. Lipson D, Capelletti M, Yelensky R, Otto G, Parker A, Jarosz M, et al. Identification of new ALK and RET gene fusions from colorectal and lung cancer biopsies. *Nat Med*. mars 2012;18(3):382-4.

142. Fusco A, Grieco M, Santoro M, Berlingieri MT, Pilotti S, Pierotti MA, et al. A new oncogene in human thyroid papillary carcinomas and their lymph-nodal metastases. *Nature*. 9 juill 1987;328(6126):170-2.
143. Gournay M, Médane S, Dugay F, Llamas-Gutierrez F, Belaud-Rotureau M-A, Cabillic F. Etude du réarrangement du gène RET dans les adénocarcinomes pulmonaires. Poster présenté à: 20es journées du collège des histologistes, embryologistes et cytogénéticiens; 2015 mars; Paris.
144. Mukhopadhyay S, Pennell NA, Ali SM, Ross JS, Ma PC, Velcheti V. RET-rearranged lung adenocarcinomas with lymphangitic spread, psammoma bodies, and clinical responses to cabozantinib. *J Thorac Oncol Off Publ Int Assoc Study Lung Cancer*. nov 2014;9(11):1714-9.
145. Cai W, Su C, Li X, Fan L, Zheng L, Fei K, et al. KIF5B-RET fusions in Chinese patients with non-small cell lung cancer. *Cancer*. 2013;119(8):1486-94.
146. Tsai T-H, Wu S-G, Hsieh M-S, Yu C-J, Yang JC-H, Shih J-Y. Clinical and prognostic implications of RET rearrangements in metastatic lung adenocarcinoma patients with malignant pleural effusion. *Lung Cancer Amst Neth*. mai 2015;88(2):208-14.
147. Dacic S, Luvison A, Evdokimova V, Kelly L, Siegfried JM, Villaruz LC, et al. RET rearrangements in lung adenocarcinoma and radiation. *J Thorac Oncol Off Publ Int Assoc Study Lung Cancer*. janv 2014;9(1):118-20.
148. Klempner SJ, Bazhenova LA, Braiteh FS, Nikolinakos PG, Gowen K, Cervantes CM, et al. Emergence of RET rearrangement co-existing with activated EGFR mutation in EGFR-mutated NSCLC patients who had progressed on first- or second-generation EGFR TKI. *Lung Cancer Amst Neth*. sept 2015;89(3):357-9.
149. Gautschi O, Zander T, Keller FA, Strobel K, Hirschmann A, Aebi S, et al. A patient with lung adenocarcinoma and RET fusion treated with vandetanib. *J Thorac Oncol Off Publ Int Assoc Study Lung Cancer*. mai 2013;8(5):e43-44.
150. Kodama T, Tsukaguchi T, Satoh Y, Yoshida M, Watanabe Y, Kondoh O, et al. Alectinib shows potent antitumor activity against RET-rearranged non-small cell lung cancer. *Mol Cancer Ther*. déc 2014;13(12):2910-8.
151. Lin F, Chen Z. Standardization of diagnostic immunohistochemistry: literature review and geisinger experience. *Arch Pathol Lab Med*. déc 2014;138(12):1564-77.
152. Gruchy JR, Barnes PJ, Dakin Haché KA. CytoLyt® fixation and decalcification pretreatments alter antigenicity in normal tissues compared with standard formalin fixation. *Appl Immunohistochem Mol Morphol AIMM Off Publ Soc Appl Immunohistochem*. avr 2015;23(4):297-302.
153. 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 Off Publ Int Assoc Study Lung Cancer*. févr 2012;7(2):348-54.
154. Wynes MW, Sholl LM, Dietel M, Schuurin E, Tsao MS, Yatabe Y, et al. An international interpretation study using the ALK IHC antibody D5F3 and a sensitive detection kit demonstrates high concordance between ALK IHC and ALK FISH and between evaluators. *J Thorac Oncol Off Publ Int Assoc Study Lung Cancer*. mai 2014;9(5):631-8.
155. Alì G, Proietti A, Pelliccioni S, Niccoli C, Lupi C, Sensi E, et al. ALK rearrangement in a large series of consecutive non-small cell lung cancers: comparison between a new immunohistochemical

approach and fluorescence in situ hybridization for the screening of patients eligible for crizotinib treatment. *Arch Pathol Lab Med.* nov 2014;138(11):1449-58.

156. 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 Off J Am Assoc Cancer Res.* 1 mars 2010;16(5):1561-71.

157. Paik JH, Choe G, Kim H, Choe J-Y, Lee HJ, Lee C-T, 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 Off Publ Int Assoc Study Lung Cancer.* mars 2011;6(3):466-72.

158. Jiang L, Yang H, He P, Liang W, Zhang J, Li J, et al. Improving Selection Criteria for ALK Inhibitor Therapy in Non-Small Cell Lung Cancer: A Pooled-Data Analysis on Diagnostic Operating Characteristics of Immunohistochemistry. *Am J Surg Pathol.* 27 janv 2016;

159. Le Quesne J, Maurya M, Yancheva SG, O'Brien M, Popat S, Wotherspoon AC, et al. A comparison of immunohistochemical assays and FISH in detecting the ALK translocation in diagnostic histological and cytological lung tumor material. *J Thorac Oncol Off Publ Int Assoc Study Lung Cancer.* juin 2014;9(6):769-74.

160. Conklin CMJ, Craddock KJ, Have C, Laskin J, Couture C, Ionescu DN. Immunohistochemistry is a reliable screening tool for identification of ALK rearrangement in non-small-cell lung carcinoma and is antibody dependent. *J Thorac Oncol Off Publ Int Assoc Study Lung Cancer.* janv 2013;8(1):45-51.

161. von Laffert M, Stenzinger A, Hummel M, Weichert W, Lenze D, Warth A, et al. ALK-FISH borderline cases in non-small cell lung cancer: Implications for diagnostics and clinical decision making. *Lung Cancer Amst Neth.* 23 oct 2015;

162. Thunnissen E, Bubendorf L, Dietel M, ElMBERGER G, Kerr K, Lopez-Rios F, et al. EML4-ALK testing in non-small cell carcinomas of the lung: a review with recommendations. *Virchows Arch Int J Pathol.* sept 2012;461(3):245-57.

163. Gao X, Sholl LM, Nishino M, Heng JC, Jänne PA, Oxnard GR. Clinical Implications of Variant ALK FISH Rearrangement Patterns. *J Thorac Oncol Off Publ Int Assoc Study Lung Cancer.* nov 2015;10(11):1648-52.

164. Sun J-M, Choi Y-L, Won J-K, Hirsch FR, Ahn JS, Ahn M-J, et al. A dramatic response to crizotinib in a non-small-cell lung cancer patient with IHC-positive and FISH-negative ALK. *J Thorac Oncol Off Publ Int Assoc Study Lung Cancer.* déc 2012;7(12):e36-38.

165. Peled N, Palmer G, Hirsch FR, Wynes MW, Ilouze M, Varella-Garcia M, et al. Next-generation sequencing identifies and immunohistochemistry confirms a novel crizotinib-sensitive ALK rearrangement in a patient with metastatic non-small-cell lung cancer. *J Thorac Oncol Off Publ Int Assoc Study Lung Cancer.* sept 2012;7(9):e14-16.

166. Cha YJ, Lee JS, Kim HR, Lim SM, Cho BC, Lee CY, et al. Screening of ROS1 rearrangements in lung adenocarcinoma by immunohistochemistry and comparison with ALK rearrangements. *PLoS One.* 2014;9(7):e103333.

167. Yoshida A, Tsuta K, Wakai S, Arai Y, Asamura H, Shibata T, et al. Immunohistochemical detection of ROS1 is useful for identifying ROS1 rearrangements in lung cancers. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc.* mai 2014;27(5):711-20.

168. Platt A, Morten J, Ji Q, Elvin P, Womack C, Su X, et al. A retrospective analysis of RET translocation, gene copy number gain and expression in NSCLC patients treated with vandetanib in four randomized Phase III studies. *BMC Cancer*. 2015;15:171.
169. Go H, Jung YJ, Kang HW, Park I-K, Kang C-H, Lee JW, et al. Diagnostic method for the detection of KIF5B-RET transformation in lung adenocarcinoma. *Lung Cancer Amst Neth*. oct 2013;82(1):44-50.
170. Lamy A, Sabourin J-C. Les techniques de séquençage « moyen débit » et leurs applications en génétique somatique des tumeurs. *Corresp En Onco-Théranostic*. mars 2014;3(1):12-8.
171. Eldering E, Spek CA, Aberson HL, Grummels A, Derks IA, de Vos AF, et al. Expression profiling via novel multiplex assay allows rapid assessment of gene regulation in defined signalling pathways. *Nucleic Acids Res*. 1 déc 2003;31(23):e153.
172. Angot E. Evaluation de la RT-DL-PCR multiplexe pour la mise en évidence de transcrits de fusion dans les sarcomes [thèse]. 2014.
173. Mareschal S, Ruminy P, Bagacean C, Marchand V, Cornic M, Jais J-P, et al. Accurate Classification of Germinal Center B-Cell-Like/Activated B-Cell-Like Diffuse Large B-Cell Lymphoma Using a Simple and Rapid Reverse Transcriptase-Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification Assay: A CALYM Study. *J Mol Diagn JMD*. 9 avr 2015;
174. Ruminy P, Marchand V, Buchbinder N, Larson T, Joly B, Penther D, et al. Multiplexed targeted sequencing of recurrent fusion genes in acute leukaemia. *Leukemia*. 3 juill 2015;
175. Zwaenepoel K, Merkle D, Cabillic F, Berg E, Belaud-Rotureau M-A, Grazioli V, et al. Automation of ALK gene rearrangement testing with fluorescence in situ hybridization (FISH): a feasibility study. *Exp Mol Pathol*. févr 2015;98(1):113-8.
176. Lantuejoul S, Rouquette I, Blons H, Le Stang N, Ilie M, Begueret H, et al. French multicentric validation of ALK rearrangement diagnostic in 547 lung adenocarcinomas. *Eur Respir J*. juill 2015;46(1):207-18.