



Détection des variants de fusion du gène ALK par séquençage massif parallèle ciblé à partir d'ARN et réponse au crizotinib dans les cancers bronchiques non à petites cellules

Julian Pinsolle

► To cite this version:

Julian Pinsolle. Détection des variants de fusion du gène ALK par séquençage massif parallèle ciblé à partir d'ARN et réponse au crizotinib dans les cancers bronchiques non à petites cellules. Médecine humaine et pathologie. 2017. dumas-01609830

HAL Id: dumas-01609830

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01609830>

Submitted on 4 Oct 2017

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.

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il n'a pas été réévalué depuis la date de soutenance.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact au SID de Grenoble :
bump-theses@univ-grenoble-alpes.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

<http://www.cfcopies.com/juridique/droit-auteur>
<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES
FACULTÉ DE MÉDECINE DE GRENOBLE

Année : 2017

**DÉTECTION DES VARIANTS DE FUSION DU GÈNE ALK PAR
SÉQUENCAGE MASSIF PARALLÈLE CIBLÉ A PARTIR D'ARN ET
RÉPONSE AU CRIZOTINIB DANS LES CANCERS PULMONAIRES NON
A PETITES CELLULES**

THÈSE
PRESENTÉE POUR L'OBTENTION DU DOCTORAT EN MEDECINE
DIPLOME D'ÉTAT

Julian PINSOLLE

[Données à caractère personnel]

THÈSE SOUTENUE PUBLIQUEMENT A LA FACULTÉ DE MÉDECINE DE
GRENOBLE*

Le 15 Septembre 2017

DEVANT LE JURY COMPOSÉ DE

Président du jury : M. le Professeur Denis Moro-Sibilot

Directrice de thèse : Mme le Docteur Anne McLeer

Mme le Professeur Sylvie Lantuejoul

Mme le Docteur Anne-Claire Toffart

M. le Professeur Christophe Pison

**La Faculté de Médecine de Grenoble n'entend donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les thèses ; ces opinions sont considérées comme propres à leurs auteurs.*

Doyen de la Faculté : M. le Pr. Jean Paul ROMANET

Année 2016-2017

ENSEIGNANTS A L'UFR DE MEDECINE

CORPS	NOM-PRENOM	Discipline universitaire
PU-PH	ALBALADEJO Pierre	Anesthésiologie réanimation
PU-PH	APTEL Florent	Ophthalmologie
PU-PH	ARVIEUX-BARTHELEMY Catherine	Chirurgie générale
PU-PH	BALOSSO Jacques	Radiothérapie
PU-PH	BARONE-ROCHETTE Gilles	Cardiologie
PU-PH	BARRET Luc	Médecine légale et droit de la santé
PU-PH	BAYAT Sam	Physiologie
PU-PH	BENHAMOU Pierre Yves	Endocrinologie, diabète et maladies métaboliques
PU-PH	BERGER François	Biologie cellulaire
MCU-PH	BIDART-COUTTON Marie	Biologie cellulaire
MCU-PH	BOISSET Sandrine	Agents infectieux
PU-PH	BONAZ Bruno	Gastro-entérologie, hépatologie, addictologie
PU-PH	BONNETERRE Vincent	Médecine et santé au travail
PU-PH	BOREL Anne-Laure	Endocrinologie, diabète et maladies métaboliques
PU-PH	BOSSON Jean-Luc	Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication
MCU-PH	BOTTARI Serge	Biologie cellulaire
PU-PH	BOUGEROL Thierry	Psychiatrie d'adultes
PU-PH	BOUILLET Laurence	Médecine interne
PU-PH	BOUZAT Pierre	Réanimation
PU-PH	BRAMBILLA Christian	Pneumologie
MCU-PH	BRENIER-PINCHART Marie Pierre	Parasitologie et mycologie
PU-PH	BRICAULT Ivan	Radiologie et imagerie médicale
PU-PH	BRICHON Pierre-Yves	Chirurgie thoracique et cardio- vasculaire
MCU-PH	BRIOT Raphaël	Thérapeutique, médecine d'urgence
MCU-PH	BROUILLET Sophie	Biologie et médecine du développement et de la reproduction
PU-PH	CAHN Jean-Yves	Hématologie
MCU-PH	CALLANAN-WILSON Mary	Hématologie, transfusion
PU-PH	CARPENTIER Françoise	Thérapeutique, médecine d'urgence
PU-PH	CARPENTIER Patrick	Chirurgie vasculaire, médecine vasculaire
PU-PH	CESBRON Jean-Yves	Immunologie
PU-PH	CHABARDES Stephan	Neurochirurgie
PU-PH	CHABRE Olivier	Endocrinologie, diabète et maladies métaboliques
PU-PH	CHAFFANJON Philippe	Anatomie

PU-PH	CHARLES Julie	Dermatologie
PU-PH	CHAVANON Olivier	Chirurgie thoracique et cardio- vasculaire
PU-PH	CHIQUET Christophe	Ophtalmologie
PU-PH	CINQUIN Philippe	Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication
PU-PH	COHEN Olivier	Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication
PU-PH	COUTURIER Pascal	Gériatrie et biologie du vieillissement
PU-PH	CRACOWSKI Jean-Luc	Pharmacologie fondamentale, pharmacologie clinique
PU-PH	CURE Hervé	Oncologie
PU-PH	DEBILLON Thierry	Pédiatrie
PU-PH	DECAENS Thomas	Gastro-entérologie, Hépatologie
PU-PH	DEMATTEIS Maurice	Addictologie
MCU-PH	DERANSART Colin	Physiologie
PU-PH	DESCOTES Jean-Luc	Urologie
MCU-PH	DETANTE Olivier	Neurologie
MCU-PH	DIETERICH Klaus	Génétique et procréation
MCU-PH	DOUTRELEAU Stéphane	Physiologie
MCU-PH	DUMESTRE-PERARD Chantal	Immunologie
PU-PH	EPAULARD Olivier	Maladies Infectieuses et Tropicales
PU-PH	ESTEVE François	Biophysique et médecine nucléaire
MCU-PH	EYSSERIC Hélène	Médecine légale et droit de la santé
PU-PH	FAGRET Daniel	Biophysique et médecine nucléaire
PU-PH	FAUCHERON Jean-Luc	Chirurgie générale
MCU-PH	FAURE Julien	Biochimie et biologie moléculaire
PU-PH	FERRETTI Gilbert	Radiologie et imagerie médicale
PU-PH	FEUERSTEIN Claude	Physiologie
PU-PH	FONTAINE Éric	Nutrition
PU-PH	FRANCOIS Patrice	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
MCU-MG	GABOREAU Yoann	Médecine Générale
PU-PH	GARBAN Frédéric	Hématologie, transfusion
PU-PH	GAUDIN Philippe	Rhumatologie
PU-PH	GAVAZZI Gaétan	Gériatrie et biologie du vieillissement
PU-PH	GAY Emmanuel	Neurochirurgie
MCU-PH	GILLOIS Pierre	Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication
MCU-PH	GRAND Sylvie	Radiologie et imagerie médicale
PU-PH	GRIFFET Jacques	Chirurgie infantile
PU-PH	GUEBRE-EGZIABHER Fitsum	Néphrologie
MCU-PH	GUZUN Rita	Endocrinologie, diabétologie, nutrition, éducation thérapeutique
PU-PH	HAINAUT Pierre	Biochimie, biologie moléculaire
PU-PH	HENNEBICQ Sylviane	Génétique et procréation
PU-PH	HOFFMANN Pascale	Gynécologie obstétrique
PU-PH	HOMMEL Marc	Neurologie
PU-MG	IMBERT Patrick	Médecine Générale
PU-PH	JOUK Pierre-Simon	Génétique
PU-PH	JUVIN Robert	Rhumatologie

PU-PH	KAHANE Philippe	Physiologie
PU-PH	KRACK Paul	Neurologie
PU-PH	KRAINIK Alexandre	Radiologie et imagerie médicale
PU-PH	LABARERE José	Epidémiologie ; Eco. de la Santé
MCU-PH	LANDELLE Caroline	Bactériologie - virologie
MCU-PH	LAPORTE François	Biochimie et biologie moléculaire
MCU-PH	LARDY Bernard	Biochimie et biologie moléculaire
MCU-PH	LARRAT Sylvie	Bactériologie, virologie
MCU - PH	LE GOUËLLEC Audrey	Biochimie et biologie moléculaire
PU-PH	LECCIA Marie-Thérèse	Dermato-vénéréologie
PU-PH	LEROUX Dominique	Génétique
PU-PH	LEROY Vincent	Gastro-entérologie, hépatologie, addictologie
PU-PH	LEVY Patrick	Physiologie
MCU-PH	LONG Jean-Alexandre	Urologie
PU-PH	MAGNE Jean-Luc	Chirurgie vasculaire
MCU-PH	MAIGNAN Maxime	Thérapeutique, médecine d'urgence
PU-PH	MAITRE Anne	Médecine et santé au travail
MCU-PH	MALLARET Marie-Reine	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
MCU-PH	MARLU Raphaël	Hématologie, transfusion
MCU-PH	MAUBON Danièle	Parasitologie et mycologie
PU-PH	MAURIN Max	Bactériologie - virologie
MCU-PH	MC LEER Anne	Cytologie et histologie
PU-PH	MERLOZ Philippe	Chirurgie orthopédique et traumatologie
PU-PH	MORAND Patrice	Bactériologie - virologie
PU-PH	MOREAU-GAUDRY Alexandre	Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication
PU-PH	MORO Elena	Neurologie
PU-PH	MORO-SIBILOT Denis	Pneumologie
PU-PH	MOUSSEAU Mireille	Cancérologie
PU-PH	MOUTET François	Chirurgie plastique, reconstructrice et esthétique ; brûlologie
MCU-PH	PACLET Marie-Hélène	Biochimie et biologie moléculaire
PU-PH	PALOMBI Olivier	Anatomie
PU-PH	PARK Sophie	Hémato - transfusion
PU-PH	PASSAGGIA Jean-Guy	Anatomie
PU-PH	PAYEN DE LA GARANDERIE Jean-François	Anesthésiologie réanimation
MCU-PH	PAYSANT François	Médecine légale et droit de la santé
MCU-PH	PELLETIER Laurent	Biologie cellulaire
PU-PH	PELLOUX Hervé	Parasitologie et mycologie
PU-PH	PEPIN Jean-Louis	Physiologie
PU-PH	PERENNOU Dominique	Médecine physique et de réadaptation
PU-PH	PERNOD Gilles	Médecine vasculaire
PU-PH	PIOLAT Christian	Chirurgie infantile
PU-PH	PISON Christophe	Pneumologie
PU-PH	PLANTAZ Dominique	Pédiatrie
PU-PH	POIGNARD Pascal	Virologie

PU-PH	POLACK Benoît	Hématologie
PU-PH	POLOSAN Mircea	Psychiatrie d'adultes
PU-PH	PONS Jean-Claude	Gynécologie obstétrique
PU-PH	RAMBEAUD Jacques	Urologie
PU-PH	RAY Pierre	Biologie et médecine du développement et de la reproduction
PU-PH	REYT Émile	Oto-rhino-laryngologie
PU-PH	RIGHINI Christian	Oto-rhino-laryngologie
PU-PH	ROMANET Jean Paul	Ophthalmologie
PU-PH	ROSTAING Lionel	Néphrologie
MCU-PH	ROUSTIT Matthieu	Pharmacologie fondamentale, pharmaco clinique, addictologie
MCU-PH	ROUX-BUISSON Nathalie	Biochimie, toxicologie et pharmacologie
MCU-PH	RUBIO Amandine	Pédiatrie
PU-PH	SARAGAGLIA Dominique	Chirurgie orthopédique et traumatologie
MCU-PH	SATRE Véronique	Génétique
PU-PH	SAUDOU Frédéric	Biologie Cellulaire
PU-PH	SCHMERBER Sébastien	Oto-rhino-laryngologie
PU-PH	SCHWEBEL-CANALI Carole	Réanimation médicale
PU-PH	SCOLAN Virginie	Médecine légale et droit de la santé
MCU-PH	SEIGNEURIN Arnaud	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
PU-PH	STAHL Jean-Paul	Maladies infectieuses, maladies tropicales
PU-PH	STANKE Françoise	Pharmacologie fondamentale
MCU-PH	STASIA Marie-José	Biochimie et biologie moléculaire
PU-PH	STURM Nathalie	Anatomie et cytologie pathologiques
PU-PH	TAMISIER Renaud	Physiologie
PU-PH	TERZI Nicolas	Réanimation
MCU-PH	TOFFART Anne-Claire	Pneumologie
PU-PH	TONETTI Jérôme	Chirurgie orthopédique et traumatologie
PU-PH	TOUSSAINT Bertrand	Biochimie et biologie moléculaire
PU-PH	VANZETTO Gérald	Cardiologie
PU-PH	VUILLEZ Jean-Philippe	Biophysique et médecine nucléaire
PU-PH	WEIL Georges	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
PU-PH	ZAOUÏ Philippe	Néphrologie
PU-PH	ZARSKI Jean-Pierre	Gastro-entérologie, hépatologie, addictologie

PU-PH : Professeur des Universités et Praticiens Hospitaliers

MCU-PH : Maître de Conférences des Universités et Praticiens Hospitaliers

PU-MG : Professeur des Universités de Médecine Générale

MCU-MG : Maître de Conférences des Universités de Médecine Générale

Remerciements

Aux membres de mon Jury,

A Anne, qui m'accompagne depuis mon master 2. Merci pour ton encadrement exemplaire, ta grande disponibilité et ta bienveillance à mon égard. J'ai vraiment compris ce qu'étaient la science et la biologie à tes côtés, de la joie de découvrir (attention spoiler) un nouveau variant de fusion jusqu'à la claque de la qPCR qui foire ! Moi aussi je crie haut et fort « I f*****g love science » !

A Anne Claire, spécialiste de l'examen neuro et des réflexes (!), avec qui je n'ai jamais vraiment travaillé dans le service. Mais qui s'est toujours rendue disponible et qui a joué les « Huggy bons tuyaux » avec moi ! Merci pour ton aide et au plaisir de vraiment travailler à tes côtés.

A Sylvie Lantuejoul que je ne connais pas assez mais que j'ai souvent croisée, entendue ou lue ! Un chaleureux merci pour avoir accepté cette invitation et pour votre sympathie.

A Christophe Pison, le « patron de la pneumo » et à Denis Moro, le « roi de l'onco » ! Merci de toujours croire en chacun de vos internes et d'être de vrais papas bienveillants. Merci de m'avoir guidé durant ces cinq années et de continuer à le faire pendant les deux prochaines. Si tout le monde rêve de devenir pneumologue à Grenoble, c'est un peu grâce à l'énergie que vous mettez pour maintenir cette ambiance conviviale et familiale !

A mes proches,

Hélène Pluchart avec un T comme Terrible #Chacha #Blondie #Ptite tête ou grosse joue comme tu préféreras. Ma particule de bonheur qui rend chaque journée plus colorée et lumineuse, qui sait me rendre le sourire quand je le perds et avec qui j'ai envie de tout partager (sauf la couette !) depuis bientôt 4 ans. Pour tous ces voyages exotiques, ces carottes à 3€50 achetées, ces randos sans marmotte et ces cyclistes asiatiques perdus grâce à nous, ces questions au milieu des films, ces nœuds roses dans tes cheveux, ces compliments sur mon haut sens du rangement, ces minutes de geekage matinal, ces km de pistes de ski dévalés, ces débats sur qui est le pire entre Franck et Claire, ces bretzels que je n'ai plus le droit d'avalier, ces danses endiablées et concerts de Coldplay, ces plantes vertes killées (RIP jasmin de Mada'), ces fois où tu as VRAIMENT peur et où tu m'as traité (!), ces chagrins liés à la piqure de Lipuce le chien de mon frère à Marseille qui était devenu méchant, ces fois où c'est drôle non (?), ces brocolis ingurgités et tout ce qui reste à partager, tye melanyë Mithrandir. AMBIIIAANCE !!!

A mes chers parents, qui ont toujours été à mes côtés, sans jamais flancher, pendant ces 11 ans de périple. Qui ont vécu par moment ces années de labeur avec une telle intensité qu'ils mériteraient eux aussi de prêter serment. Chauffeurs de taxi ponctuels, rois du mojito et des bons petits plats nissarts ou landuches, jamais contre une soirée à m'écouter me plaindre, me conseiller mais surtout à nous marrer ! Les mots me manquent pour vous dire à quel point je vous suis reconnaissant pour tout ce soutien. Une fois de plus, ça y est, on l'a fait. Je vous aime. Au commandant petit Pié, plus frère que cousin, pour tous ses délires de jeunesse sur Joe le mec du moulin, le rire de Farrugia et Jérém' Présent Présent... A ma marraine Nanou et à Gallo, pour tous ces étés passés ensemble, ces vacances au ski mais surtout ces apéros conviviaux ! A marraine Laure pour toutes ces braderies dévalisées, pistes de ski sans panettone et machines à laver dans les rouleaux. A Aline pour sa différence de taille ! A ma sœur, Bernard et les deux chouquettes adorées qui m'ont fait découvrir les Pyjamasques, merci pour ces bons moments !

A ma belle-famille de DK, Neuilly plaiz' et Reims. Merci à chacun pour votre accueil au sein de la Pluchart family ! Toujours un plaisir de vous retrouver pour les carbonades, les cours de bricolage, les laser game, le char à voile, les canards fous et j'en passe.

A mes grands-parents et tous ceux qui scintillent là-haut.

A tous les amis croisés durant ces 11 années à trainer dans les hôpitaux,

Aux M&M's, ma Manue et mon Jojo, qui me supportent depuis le premier jour à Annecy ! Merci pour votre amitié. Et au reste de la bande de BG : Béran, Virgin', Marie, Faguet et Bebeux l'ancien Président sans oublier Nala et Kiwi. Qui comptent parmi eux, des personnes ne reculant devant rien pour un apéro, le seul orthopédiste potable (!), les rois du burger et de la pasta party, une docteur émérite du pool dance, le Dr Jolicoeur, un bébé star qui mange des boudoirs, une voix genre Céline Dion en mieux (non, je ne parle malheureusement pas de Jojo...) mais surtout une belle bande de potes. Merci pour tous ces bons moments passés et les futurs.

A mes deux voisines d'en face, ma Cloclo et ma Pay-pay qui me régalent au quotidien par l'étendage très, voire trop, ostentatoire de leur linge... Pour tous ces sketchs de Marie Chantal, ces canulars téléphoniques, ces réveils matins de bon poil mais surtout ces randonnées se terminant par 10 bornes d'ascension, un grand merci d'être toujours là.

A mes coproms. Elo, ma préférée, qui détient le record de longévité en stage avec moi (2 médailles du mérite et une légion d'honneur du coup). Et Léo, ma préférée, que je couvrirai de bouteilles d'eau dès novembre prochain et ce, avec un immense plaisir. Merci à vous deux d'avoir toujours été disponibles durant ces cinq années et d'avoir su si bien incarner ce néologisme « coprom ». Je vous KLF. Signé votre Bad Boy préféré.

A Loulou, mon premier contact grenoblois. Pour toute cette puf entamée par nos carres, ces litres de Despé en mode Hulk et surtout pour les sœurs Kanes. A Franckito pour sa prononciation des « avec » et sa finesse légendaire. Mais aussi ce bad boy de Nico, le roi du comté pour son casque très louche de garde. PS : courage pour les couches les gars ! A PAM qui est sûrement la secrétaire de quelqu'un au final, Fanoche la plus nounou des IDE et Fifi la plus organisée. A cette bonne vieille raclure de Moumoune qui est, *quoi qu'on en dise*, quelqu'un d'agréable. A Flo un néphro marrant (!), Aldric le seul interniste compréhensible, et Benja le « picou » ! Aux Président(e)s de l'AIMG pour avoir fait vivre l'internat. Tous les copains d'onco, Johan cet autre fan de socca, the Flesch, Natacha première sur le potin, ClaudineX, mais également les vieux : Maitres Laramas, Rebischung, Shestaeva et Farnetti. A Claire Wonder pour cette amazing week à SF, I was like « oh my god » !

A Zaza qui maîtrise autant la recette du houmous que l'examen médicaaaaaal, à Sissi le futur pneumologue qui ne le sait pas encore et à Mymy notre directrice du musée de la IIe guerre mondiale ! Merci pour ces bons moments passés ensemble et puis au pire, si on en a marre...

A tous les copains pharmaciens : Camillou ma future coach escalade, Galetos et ses galétades, Leroy de la triche, Pradou le seul cha qui aime les poissons, Aude et le chouuuuuu, la duchesse Astride et son valeureux BRaymond qui m'a fait découvrir que CTC ne signifiait pas seulement corticoïdes, Michou la star de Freedom, Zu pour « l'escabeau » des 3 Salazes et tous les autres copains de Cularo ! Sans oublier, Lolo la star du Morgon, Dodo, Maudounette et Toto, ma troupe de Chicken Techno !

A tous les copains externes qui me manquent, Elise et Nico mes deux sous-colleurs avec qui je dormais bien au milieu ! Axelle et Greg, les inventeurs du crozipong, Maxime aka Christophe Person, Marie, Bérangère, Marc, Jessy « les rats quittent le navire », Flo du Pépéneau Mag...!

A tous mes co-internes qui ont su transformer des heures de travail en secondes de bonne humeur : Popo, Dr Jegère et Louvel le Dr de l'amour à Annecy. A Coco qui aime se faire manger le quignon donc j'en profite. A Fanny, Juliette et Marie, pour toutes ces heures passées au téléphone à répondre à vos canulars ou pour les apéros post staff du jeudi. Et enfin Sarah et Jérém', mes deux RT things avec qui j'y finis en beauté (rayonnante !).

A toutes ces canailles de la PneumoTeam : Totor mon coPapa, avec qui j'ai eu l'immense honneur d'être confondu maintes fois, Gomar la seule qui comprend le mot panisse et pissaladière dans ce monde de brut, Mathoune Chanchan aka ça dépend ça dépasse et son élégance de parigo, mon petit Falque et sa douce Léone pour ses régales olfactifs matinaux et un peu aussi pour toute cette fonte soulevée avec Guy, Fedoche la brioche pour sa grande souplesse endobronchique, Hubert Gheerbrant d'Arras pour ses mouhahaha et sa maîtrise absolue du programme essorage 17 min, Thomas « keskidi » Pierret et sa copine imaginaire, Hélo et ses 100 000 bornes parcourues en montagne, Flo le seul marseillais que je sais apprécier (peut-être parce qu'il est de Dignois en fait), Micka le petit externe devenu grand pneumologue, Salomé qu'on a adopté, Malik Verjanus qui représente à lui seul l'ensemble des Avengers mais en version mexicaine, Geoffroy Merycopter pour ses chemises impeccables et Justin Benet le Meilleur Externe que le CHU ait enfanté (c'est juste qu'il est roux) ! Sans oublier toutes les vieilles qui sont parties loin mais que je retrouve toujours avec plaisir. Je vous KLF.

A tous mes assistant(e)s qui m'ont fait grandir : chatounette, Maman Linda et le Dr petit ruisseau, Papavillet et son stylo rouge, Marcella mi parajita, Claire et ses apéros vin rouge, Isa et son chalet perdu dans la neige. A maman Marie et le Dr Fess (je me permets une dernière fois) pour leur bienveillance et leur amitié. A Mounayar qui ne m'a jamais assistée mais que j'ai adorée enterrer. A Jojo qui fait tous ces jeudis avec moi (c'est louche). A Carole et Violaine qui s'attachent à rendre agréables mes vieux jours d'interne !

A tous les séniors de pneumo et onco tho : à Mattéo aka « lasciatemi cantare » à qui je ferai bien une gazo à l'occasion ! SQ qui a quelques lettres près aurait donné PQ, au meilleur des meilleurs j'ai nommé Boubou, à la star des pistes de danse Christel, au deux grands endoscopistes Amandine et François. A Rita pour sa sympathie et les calculs de tête du KCO ! A Renaud et Jean Louis Pépin pour leur bienveillance et leurs bons conseils. Aux annéciens, Chantal la rockstar, Stéphane et son écureuil et tous les autres. Un grand merci à tous les médecins rencontrés durant cet internat à travers chaque stage et chaque garde (réanimateurs, infectiologues, oncologues et radiothérapeutes).

A toutes les équipes paraméd de pneumo, onco tho, soins continus, radiothérapie et infectio : je vous en ai fait baver en gardes mais c'est parce que je vous aime ! Toi aussi Thérèse ! Merci à la fine équipe du labo de pathologie moléculaire pour leur accueil. Une pensée particulière pour Nelly qui cherche encore tous les supernatants que j'ai jetés !

Enfin, un grand merci un peu jaune à tous les frigos d'Optimed qui ont su bercer mes nuits de gardes. Aux « cocottes sésames », à Coldplay et à Nina Simone, pour leur réconfort durant ces longues soirées biblio. Sans oublier K-marò pour les autres soirées. Et à celui que j'ai oublié de remercier, merci.

Et une pensée particulière pour chaque patient qui constitue une pièce maîtresse de ce travail.

Acronymes et abréviations

- ADNc : ADN complémentaire
- ALK : anaplastic lymphoma kinase
- AMM : autorisation de mise sur le marché
- ARNm : ARN messenger
- BRAF : B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase
- CPNPC : cancer pulmonaire non à petites cellules
- CLIP1 : CAP-Gly domain containing linker protein 1
- EGFR : epidermal growth factor receptor
- EML4 : echinoderm microtubule-associated protein like-4
- ERBB2 : erb-b2 receptor tyrosine kinase 2
- FISH : hybridation in situ en fluorescence
- IHC : immunohistochimie
- KRAS : V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
- Mb : megabases
- NGS : next generation sequencing, séquençage massif parallèle
- PCR : polymerase chain reaction
- RNA-Seq : RNA-sequencing, séquençage à partir d'ARN
- ROS1 : ROS proto-oncogene 1, receptor tyrosine kinase
- RT-qPCR : reverse transcription quantitative polymerase chain reaction

Table des matières

1. Introduction	11
a. Cancer pulmonaire	11
b. Anomalies génétiques « driver » et thérapies ciblées	11
c. Réarrangements du gène ALK	12
d. Thérapies ciblées anti-ALK	14
e. Partenaires de fusion d'ALK et variants de fusion	15
f. Outils pour la détection des réarrangements ALK	16
g. Séquençage massif parallèle	19
h. PCR ancrée multiplexe	22
i. Objectifs	23
2. Articles	24
a. Article 1 (McLeer-Florin et al)	24
b. Article 2 (Duruisseaux et al)	55
c. Article 3 (Pinsolle et al)	62
3. Résultats	70
4. Discussion et perspectives	71
a. Evaluation de l'efficacité du RNA-seq dans la détection du réarrangement ALK	71
b. Mise en place d'une PCR ancrée multiplexe pour l'amélioration de l'efficacité du RNA-seq dans la détection du réarrangement ALK	74
c. Corrélation entre la nature du variant de fusion et la réponse au crizotinib	75
5. Bibliographie	78
6. Conclusion	83
7. Serment d'Hippocrate	84
8. Résumés	85

1. Introduction

a. Cancer pulmonaire

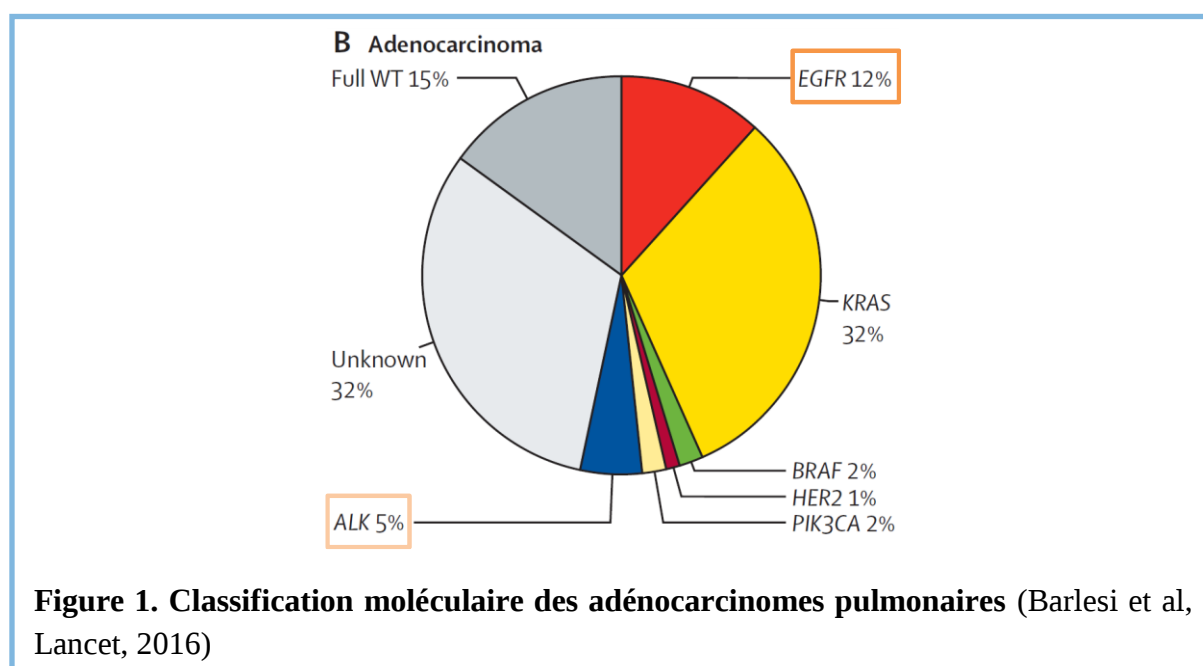
Le cancer pulmonaire représente la première cause de mortalité par cancer en France mais également dans le monde. En France, on rapportait 45 222 nouveaux cas et 30 555 décès en 2015 (1). Dans 70 à 80% des cas, la maladie est diagnostiquée au stade métastatique. Dans cette situation, le traitement chirurgical n'est pas recommandé et la survie des patients est amoindrie. De ce fait, la survie globale à 5 ans est estimée à 14%, quel que soit le stade de la pathologie. Ces chiffres sont paradoxaux puisque le principal facteur de risque de la pathologie, le tabac, est clairement identifié et reste évitable.

Il existe deux grands types histologiques de cancer pulmonaire : les cancers pulmonaires non à petites cellules (CPNPC) et les cancers pulmonaires à petites cellules. Les CPNPC comptent pour plus de 80% des cas et se répartissent en trois sous types : l'adénocarcinome (différenciation glandulaire ; 45% des cas), le carcinome épidermoïde ou malpighien (30-35% des cas) et le carcinome à grandes cellules (sans différenciation glandulaire ni malpighienne ; 5-10% des cas).

b. Anomalies génétiques « driver » et thérapies ciblées

Le cancer peut être défini schématiquement comme le résultat de la sénescence cellulaire, d'une division incontrôlée et de l'accumulation d'anomalies génétiques, non prises en charge par les systèmes de réparation de l'ADN. Ainsi, les dix dernières années ont été marquées par la mise en évidence d'altérations génétiques « driver » ou « conductrices » intervenant dans l'oncogénèse. De nombreuses anomalies conductrices ont été découvertes dans les adénocarcinomes bronchiques, les trois plus fréquentes étant les mutations de *KRAS* (V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog) dans 32% des cas, les mutations d'*EGFR*

(Epidermal Growth Factor Receptor) dans 12% des cas et les réarrangements du gène *ALK* (Anaplastic Lymphoma Kinase) dans 5% des cas en moyenne (Figure 1) (2). Suite à ces découvertes, des thérapies spécifiques ciblant les cellules porteuses de ces anomalies ont été développées et ont permis d'améliorer la survie et la qualité de vie des malades. De ce fait, il est recommandé de rechercher systématiquement plusieurs de ces anomalies chez les patients porteurs d'adénocarcinomes bronchiques métastatiques avant de démarrer un traitement : mutation des gènes *EGFR*, *KRAS*, *BRAF* (B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase), *ERBB2* (erb-b2 receptor tyrosine kinase 2) et les réarrangements *ALK* et *ROS1* (ROS proto-oncogene 1, receptor tyrosine kinase) (3). Actuellement, plusieurs de ces anomalies ont permis le développement de thérapies ciblées ayant une autorisation de mise sur le marché en France dans les CPNPC : les mutations activatrices du gène *EGFR* et les réarrangements des gènes *ALK* et *ROS1*.

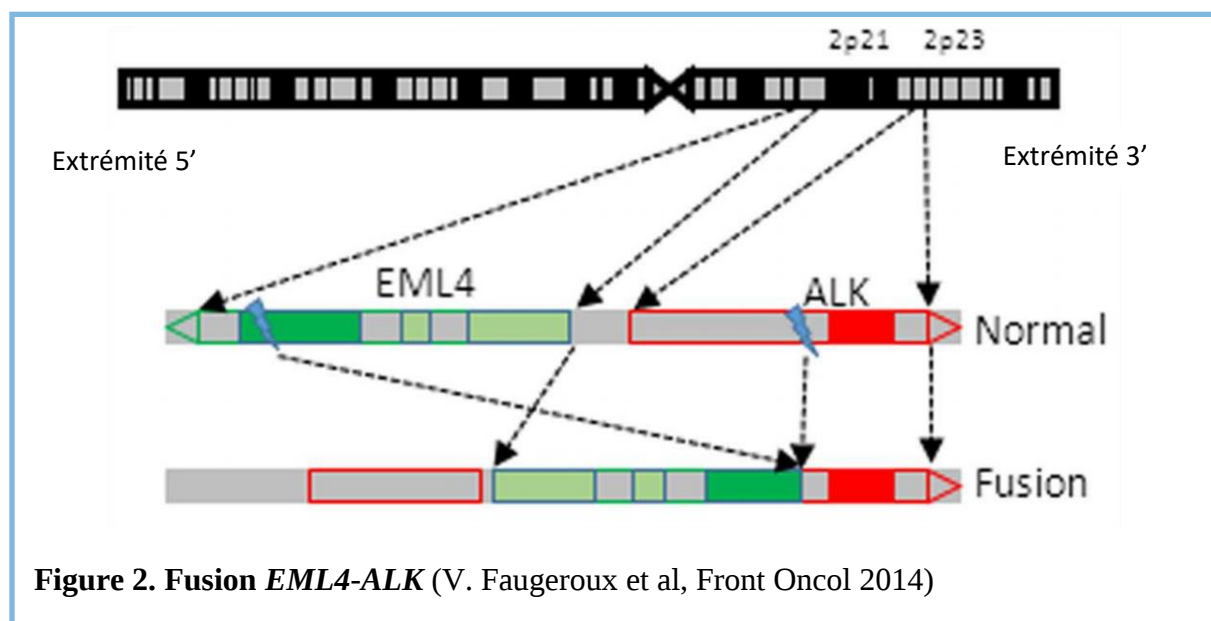


c. Réarrangements du gène *ALK*

Le gène *ALK* est situé sur le bras court du chromosome 2 et code pour un récepteur à tyrosine kinase (RTK) de la superfamille des récepteurs à l'insuline, dont FAM150A (Augmentor α) et

FAM150B (Augmentor β) sont les ligands (4,5). Les RTK sont des récepteurs transmembranaires dont la fixation du ligand sur son secteur extra cellulaire conduit à la dimérisation du récepteur puis à son activation par autophosphorylation (activité kinase) de son domaine intra cellulaire.

Les réarrangements du gène *ALK* sont retrouvés dans 2 à 7% des CPNPC (6,7), principalement dans les adénocarcinomes. Ils ont initialement été décrits dans les lymphomes anaplastiques à grandes cellules et par la suite dans d'autres pathologies comme les neuroblastomes et les tumeurs myofibroblastiques (8). Une translocation ou une inversion créent un gène de fusion (Figure 2), constitué par l'extrémité 3' d'*ALK* et l'extrémité 5' de son partenaire, le plus souvent le gène *EML4* (echinoderm microtubule-associated protein like-4), entraînant la production d'une protéine de fusion dont le domaine kinase est activé de manière constitutive. La protéine de fusion ALK active plusieurs voies de signalisation intracellulaire telles que celle des MAP kinases, PI3K/AKT/mTOR ou JAK2/3/STAT3 (Figure 3). Par ce biais, cette anomalie joue un rôle dans l'oncogénèse favorisant l'invasion, la prolifération et la survie cellulaire ainsi que l'angiogenèse au sein de la tumeur (9).



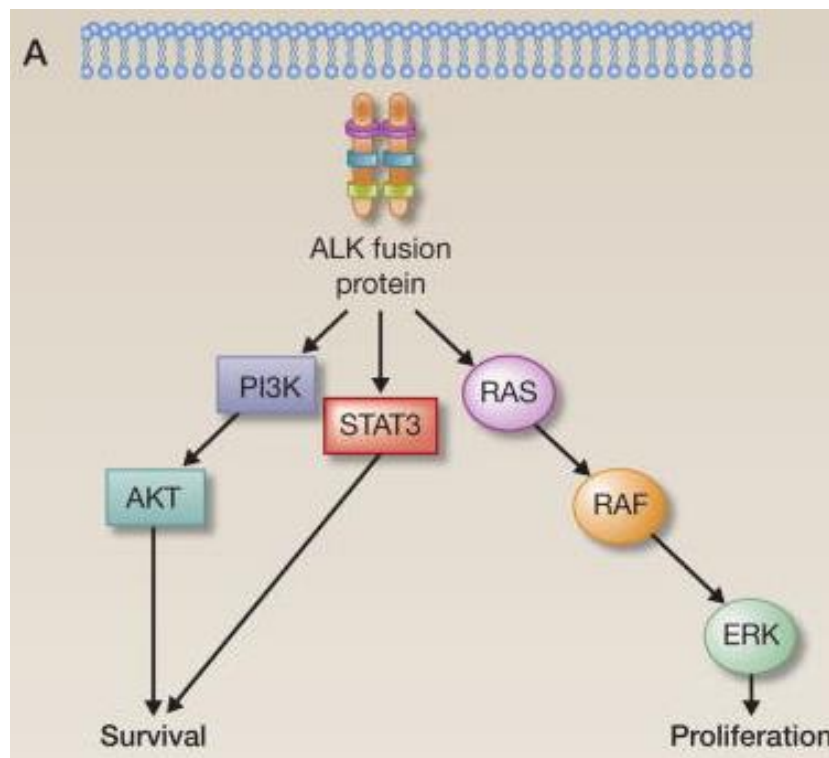


Figure 3. Voies de signalisation activées par la protéine de fusion ALK (T. Sasaki et al, Clin Cancer Res 2011)

Dans le cancer pulmonaire, cette anomalie touche plus volontiers les patients jeunes, non- ou « petits » fumeurs (tabagisme estimé à moins de 10 paquets-année) et concerne majoritairement des adénocarcinomes, sans autre anomalie génétique driver (10,11).

d. Thérapies ciblées anti-ALK

Le crizotinib est un inhibiteur de l'activité kinase du récepteur ALK, induisant une apoptose des cellules tumorales porteuses de ce réarrangement. Différents essais thérapeutiques ont démontré un bénéfice mesurable chez les patients atteints de CPNPC métastatique avec réarrangement *ALK* traités par crizotinib dès la première ligne thérapeutique, par rapport à la chimiothérapie usuelle (majoration de la survie sans progression d'environ 4 mois en première ligne) (12,13). Le taux de réponse au crizotinib est estimé à 74% en première ligne

contre 45% pour la chimiothérapie. Toutefois, ces réponses à la thérapie ciblée sont hétérogènes d'un patient à l'autre en termes de durée (7). De plus, des résistances au crizotinib apparaissent en moyenne au bout d'onze mois de traitement, le rendant inefficace (12). Les mécanismes biologiques de ces résistances continuent d'être identifiés mais incluent l'apparition de mutations acquises, l'activation de voies de signalisation parallèles ou encore le développement d'une transition épithélio-mésenchymateuse (14). De ce fait, une thérapie anti ALK de 2^e génération, le céritinib, a reçu son AMM française en 2015, après une ligne de traitement par crizotinib (15). En décembre 2016, l'alectinib a également obtenu une AMM conditionnelle chez les patients traités au préalable par crizotinib et une étude de phase III publiée récemment démontre une large supériorité de cette nouvelle molécule en 1^{ère} ligne comparée au crizotinib (16). Enfin, d'autres molécules, efficaces sur les mutations de résistance, sont en cours de développement (17).

e. Partenaires de fusion d'ALK et variants de fusion

Dans les cancers pulmonaires, on dénombre plusieurs gènes partenaires de fusion d'ALK (*KIF5*, *KLC1*, *TGF*, *PTPN3*...) (18) mais le plus fréquent est *EML4* qui se trouve également sur le bras court du chromosome 2, séparé d'ALK par 12 Mb. Le point de cassure au sein du gène partenaire peut survenir au niveau des différents exons, définissant ainsi le variant de fusion (19) (Figure 4). Une vingtaine de variants de fusion *EML4-ALK* sont décrits à ce jour, les deux plus fréquents étant le variant 1 (fusion entre l'exon 13 d'*EML4* et l'exon 20 d'ALK qui s'écrit selon la nomenclature : E13 ; A20 ou *EML4(13)-ALK(20)*) et le variant 3a/b (E6 ; A20) qui correspondent respectivement à 33 et 29% des cas (20). Trois caractéristiques sont communes à ces différents variants. Tout d'abord, le domaine kinase d'ALK est totalement conservé. De même, le promoteur et le domaine d'oligomérisation du partenaire sont systématiquement préservés, impliquant l'expression aberrante et l'activation constitutive

de la protéine de fusion (21). De ce fait, le niveau d'expression de cette protéine de fusion et les capacités d'invasion ou de prolifération tumorales pourraient partiellement dépendre de la nature du variant de fusion.

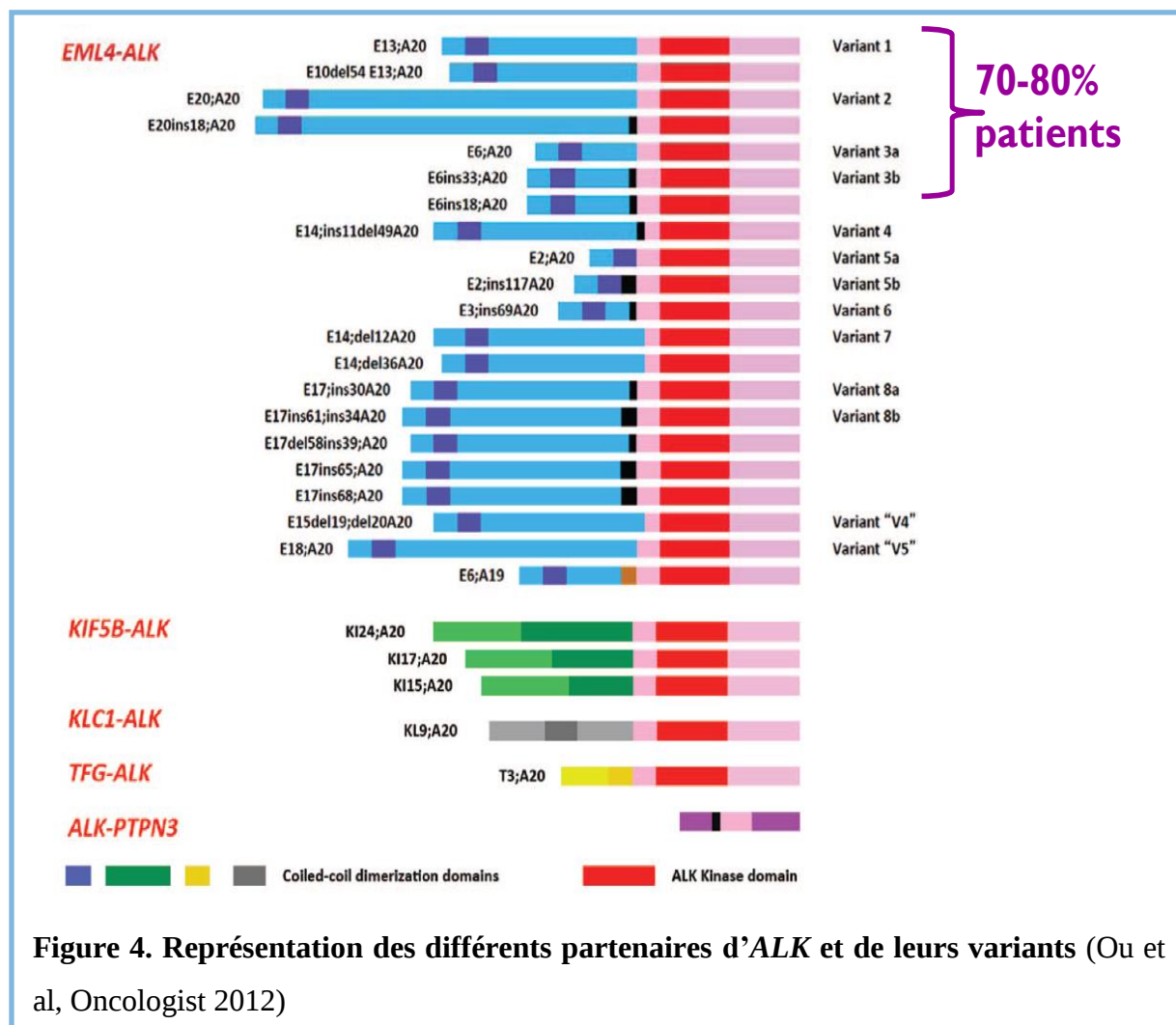


Figure 4. Représentation des différents partenaires d'ALK et de leurs variants (Ou et al, Oncologist 2012)

f. Outils pour la détection des réarrangements ALK

Du fait de son intérêt thérapeutique majeur, il est nécessaire de posséder des outils robustes pour l'identification des réarrangements *ALK*. Réalisée le plus souvent à la suite d'une immunohistochimie (IHC) positive, la technique de référence reste l'hybridation in situ en fluorescence (FISH) (22). Ces deux techniques sont réalisées sur des coupes tumorales fixées au formol et incluses en paraffine. L'immunohistochimie emploie un anticorps monoclonal, couplé à un chromogène et détecte la protéine ALK « normale ». Cette technique peut être

utilisée car la protéine ALK n'est pas exprimée dans le tissu pulmonaire sain. Ce pré test est rendu positif ou négatif selon le taux de cellules marquées ainsi que l'intensité du marquage (de 0 à 3+, selon l'objectif du microscope nécessaire pour constater la coloration). L'IHC est une méthode peu couteuse, rapide à effectuer mais son interprétation varie selon l'opérateur. En cas de positivité de l'IHC (marquages 1+ à 3+), la FISH est utilisée pour confirmer ou non la présence d'un réarrangement du gène *ALK*. La FISH confirme le diagnostic en cas de positivité de plus de 15% des cellules, par l'utilisation d'une sonde de réarrangement, mais son interprétation reste délicate, même par un opérateur expérimenté (Figure 5).

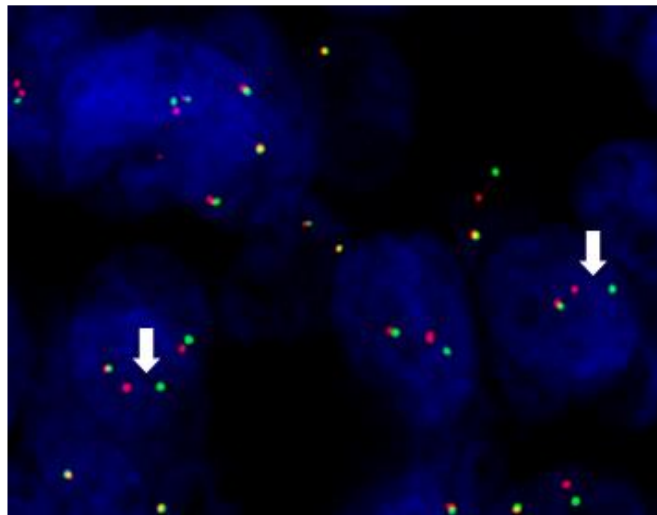


Figure 5. Hybridation in situ avec sondes fluorescentes « break apart ».
Flèches blanches : visualisation de réarrangements

Toutefois, cet algorithme diagnostique est parfois remis en cause. La U.S. Food and Drug Administration (FDA) a d'ailleurs récemment validé l'utilisation d'un kit d'IHC (Ventana ALK D5F3 CDx Assay from Ventana Medical Systems) à visée diagnostique en vue de la prescription d'une thérapie anti-ALK (23). Dans ce cas, la FISH n'est employée que pour les cas douteux, c'est-à-dire présentant un faible marquage en IHC (1+ ou 2+). Ces modifications de pratique viennent notamment de la mise en évidence de résultats discordants entre IHC et FISH, comme ceux obtenus sur une vaste cohorte par Cabillic et al (24). Récemment, à partir

de 35 échantillons présentant des résultats discordants, issus de 14 études différentes, Marchetti et al ont montré que l'ensemble des cas FISH-négatifs/IHC-positifs ont répondu au traitement ciblé contre seulement 46% des cas FISH-positifs/IHC-négatifs (25) (Figure 6). Il est enfin important de préciser que l'IHC et la FISH n'identifient ni les partenaires, ni les variants de fusion. Ces différents points montrent le besoin de développer de nouvelles techniques diagnostiques afin d'éviter des cas faux négatifs et de pouvoir préciser le variant de fusion qui pourrait avoir un impact thérapeutique.

Table 4. FISH/IHC-Discordant Results Reported in the Literature and in This Study: Comparison with Response to Anti-ALK Therapy

Studies	No. Patients	Methods	Discordant Cases (with Follow-Up)		Response to Anti-ALK Therapy	
			FISH–/IHC+	FISH+/IHC–	FISH–/IHC+	FISH+/IHC–
Ali et al. ²³	523	BA Vysis; D5F3 Ventana		2 (2)		0
Cabillio et al. ¹⁰	2714	BA Vysis/DAKO; D5F3 Ventana/ 5A4 Bond Leica	19 (2)	36 (4)	2	3
Gao et al. ²⁴	1614	BA Vysis; D5F3 Ventana		3 (2)		0
Ilie et al. ²¹	176	BA Vysis; D5F3 Ventana	2	5 (3)		3
Mitsudomi et al. ²⁰	2337	BA Vysis; 5A4 amplification		21 (15)		6
Pekar-Zlotin ²⁵	51	BA Vysis; D5F3 Ventana	5 (2)		2	
Peled et al. ²⁶	1	BA Vysis; D5F3 Ventana	1 (1)		1	
Ren et al. ²⁷	1	BA Vysis; D5F3 Ventana	1 (1)		1	
Savic et al. ⁷	375	BA Vysis; D5F3 Ventana/5A4		4		
Sholl et al. ⁴	186	BA Vysis; 5A4	1	3		
Von Laffert et al. ²⁸	753	BA Vysis; D5F3 Ventana	1	5		
Wang et al. ²⁹	430	BA Vysis; D5F3 Ventana	7			
Ying et al. ³⁰	196	BA Vysis; D5F3 Ventana	2			
Marchetti et al., (present study)	1031	BA Vysis; D5F3 Ventana/5A4	2 (1)	3 (2)	1	1
Total	10388	—	41 (7)	82 (28)	7 (100%)^a	13 (46%)^a

^aPercentage values in parentheses indicate response rates for IHC-positive (Ventana test)/FISH-negative or IHC-negative (all tests)/FISH-positive patients. FISH, fluorescence in situ hybridization; IHC, immunohistochemical analysis; ALK, anaplastic lymphoma receptor tyrosine kinase; BA, break-apart probe.

Figure 6. Réponse au crizotinib des patients présentant des résultats discordants entre FISH et IHC (Marchetti et al, J Thorac Oncol 2016)

D'autres techniques sont utilisées. Par exemple, la RT-qPCR (reverse transcription quantitative polymerase chain reaction) peut mettre en évidence un réarrangement grâce à la détection des variants de fusion recherchés (26,27). En revanche, cette méthode ne permet pas de déterminer des variants inconnus. Elle est également difficile à mettre en place en routine du fait du nombre important de variants existants et donc du nombre d'amorces à utiliser.

g. Séquençage massif parallèle

Le séquençage massif parallèle ou NGS (Next Generation Sequencing) présente un débit d'analyse très nettement supérieur aux techniques traditionnelles. En effet, alors que les anciennes techniques telles que les PCR non multiplexes, l'IHC, la FISH ou le génotypage par spectrométrie de masse, ne permettent l'analyse qu'à l'échelle d'un gène, cet outil autorise le séquençage d'un panel de gènes, jusqu'au séquençage de l'exome (ADN), du transcriptome (ARN) voire du génome entier (28). Son utilisation courante en clinique s'est largement développée dans le domaine de l'oncologie. En partant d'une faible quantité d'acides nucléiques, les techniques basées sur le NGS peuvent détecter, au sein d'un même échantillon et au cours d'une même analyse, de multiples altérations géniques (mutations, amplifications, délétions, réarrangements) impliquant des conséquences thérapeutiques. Une technique de NGS ciblée, c'est-à-dire se focalisant uniquement sur certaines localisations géniques connues pour contenir des mutations impactant le traitement (« mutation hotspots »), est aussi sensible mais moins coûteuse que l'enchaînement de techniques individuelles testant « gène par gène » (29).

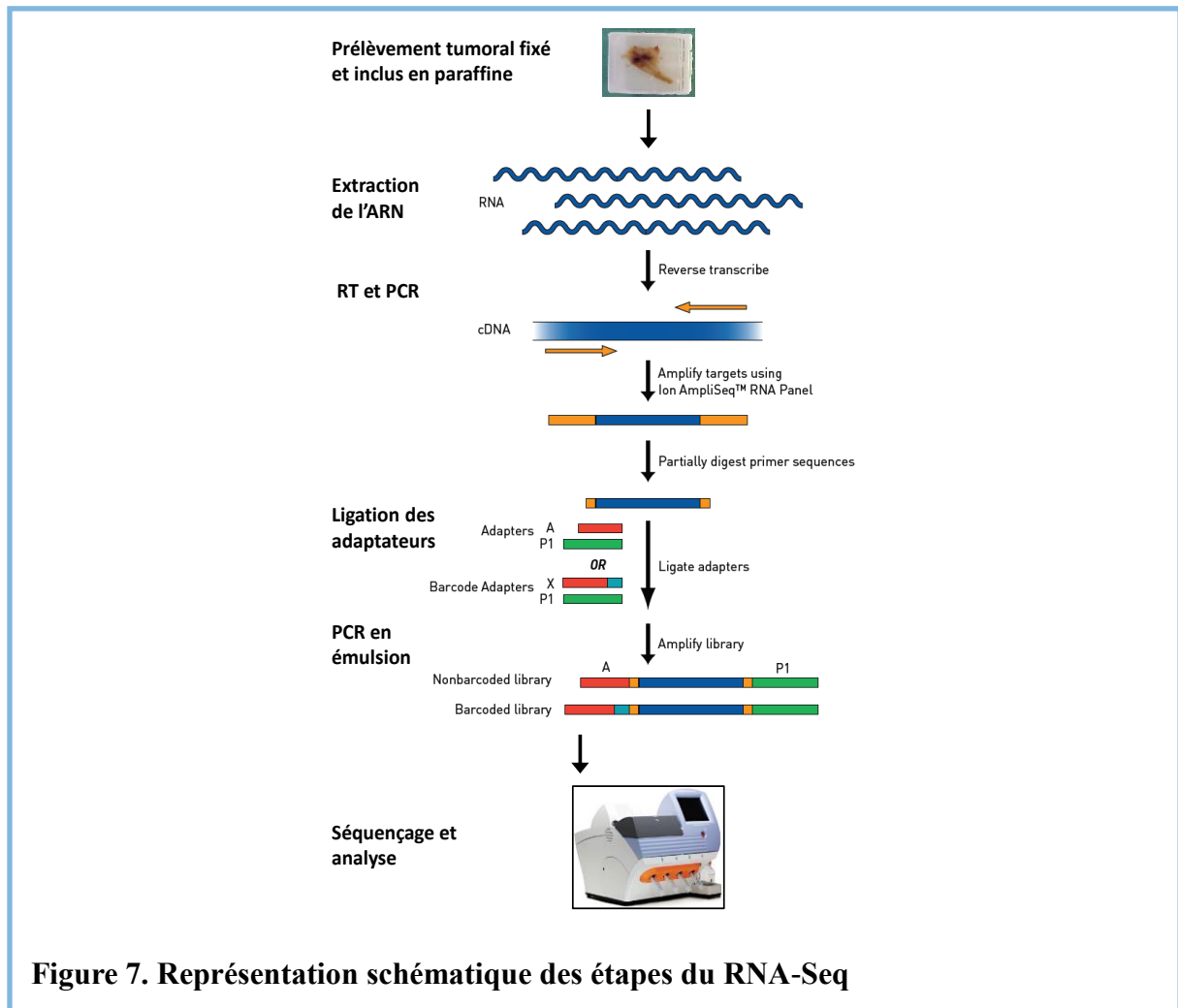
Toutefois, des difficultés peuvent être rencontrées. En effet, les biopsies effectuées sont de tailles de plus en plus réduites donnant peu de matériel génétique. De plus, les prélèvements utilisés pour le diagnostic moléculaire sont des échantillons tissulaires ou cellulaires fixés en

formol et inclus en paraffine. Ce traitement induit une fragmentation ainsi que des modifications chimiques des acides nucléiques au sein de ces prélèvements, rendant parfois les analyses moléculaires non interprétables ou non réalisables. Concernant le CPNPC, il s'agit du type tumoral possédant le plus grand nombre de mutations par paires de base (30) et divers types d'anomalies coexistent (mutations, réarrangements, surexpressions) compliquant la mise en œuvre des analyses de séquençage.

Plusieurs études ont testé et validé le NGS pour la détection de mutations « driver », y compris des panels spécifiques pour les CPNPC. Cette méthode prend le pas sur les tests individuels « gène par gène » et devient progressivement un standard en routine. La technique la plus employée est le NGS basé sur des PCR multiplexes (amplicon-based) à partir d'ADN du fait de sa rapidité et de son coût plus faible (31–33). Néanmoins, la présence d'introns au sein de l'ADN alourdit les séquences alors que les PCR ne peuvent amplifier que de courts fragments. De ce fait, cet outil n'est pas adapté à la recherche concomitante de mutations ponctuelles et de réarrangements.

Dans notre étude, qui visait à étudier les réarrangements du gène *ALK* par NGS, nous avons donc employé une méthode partant de l'ARN et basée sur une amplification par PCR multiplexes (amplicon-based) des séquences d'intérêt que l'on nomme RNA-sequencing ou RNA-seq. Après extraction de l'ARN et synthèse du double brin d'ADN, des PCR multiplexes sont effectuées, conduisant à la sélection et l'amplification des séquences d'intérêts, les zones de fusion, grâce à l'utilisation d'amorces spécifiques. Ces amorces ciblent différents variants de fusion connus, issus de divers gènes susceptibles de présenter un réarrangement. Dans notre étude, le panel testé était constitué d'une soixantaine de transcrits de fusion pouvant intervenir dans les CPNPC et provenant de quatre gènes : *ALK*, *ROS1*, *RET* et *NTRK1*. Après cette étape, les fragments obtenus, appelés « amplicons », subissent diverses modifications (réparation des extrémités ou « end repair », ligation d'adaptateurs) afin de

constituer une « librairie » qui sera amplifiée par clonage puis séquencée. Les données obtenues sont ensuite analysées et comparées à des séquences normales (alignement) (Figure 7).



Cette technique est capable de caractériser de multiples transcrits de fusion issus des réarrangements géniques (34). Elle permet de mettre en évidence rapidement le réarrangement, le partenaire ainsi que le variant de fusion si ces derniers ont déjà été décrits auparavant, du fait de l'emploi d'amorces spécifiques lors des étapes de PCR. Le NGS peut également mettre en évidence un réarrangement sans toutefois réussir à identifier la nature du transcrit de fusion. Dans ce cas, le résultat rendu est un déséquilibre 5'3' (« ALK 3'5' »).

imbalance »). En effet, en présence d'un réarrangement, la partie 3' du gène *ALK*, prise dans la fusion, est surexprimée contrairement à l'extrémité 5'.

h. PCR ancrée multiplexe

En 2014, Zheng et al ont mis en place une technique de PCR ancrée multiplexe (multiplex anchored PCR) (35). Elle correspond à 2 étapes supplémentaires d'amplification d'ADN complémentaires (ADNc) précédant un séquençage par NGS (Figure 8). L'intérêt de cet outil est de resserrer le cadre de lecture du séquençage sur la zone de fusion des deux gènes. Autre avantage, cette technique se passe d'amorces spécifiques des partenaires de fusion. De ce fait, l'association d'une PCR ancrée au RNA-seq pourrait aider à la détection des réarrangements du gène *ALK* mais surtout des partenaires et des variants, mêmes s'ils sont inconnus.

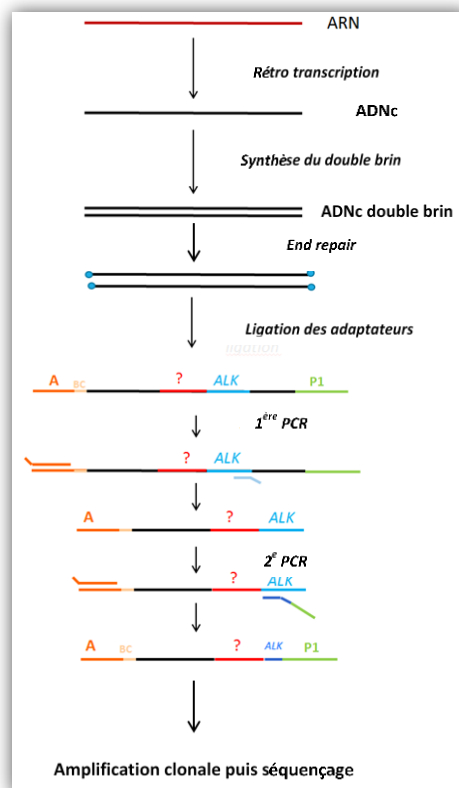


Figure 8. Représentation schématique des étapes de la PCR ancrée (Zheng et al, Nature Med)

i. Objectifs

Le premier objectif de ce travail était d'évaluer puis d'améliorer l'efficacité du RNA-seq dans la détection du réarrangement *ALK* et du transcrit de fusion au sein de CPNPC et de la comparer à celle de la FISH et de l'IHC. D'autre part, le but était de rechercher une éventuelle corrélation entre nature du variant de fusion et la réponse au crizotinib.

2. Articles

a. Article 1 (McLeer-Florin et al)

ALK fusion variants detection by targeted RNA-next generation sequencing and clinical responses to crizotinib in ALK-positive non-small cell lung cancer

Anne McLeer-Florin, PhD^{a,b,f,h}, Michael Duruisseaux, MD, PhD^{c,f}, Julian Pinsolle, MSc^{c,f}, Sylvian Dubourd, MSc^b, Julie Mondet, PharmD^{a,b,g,h}, Mathilde Phillips Houlbracq^{c,f}, Nelly Magnat, MSc^b, Julien Fauré, PhD^{d,h}, Amandine Chatagnon, PhD^d, Florence de Fraipont, PharmD, PhD^{b,f}, Matteo Giaj Levra, MD^{c,f}, Anne-Claire Toffart, MD, PhD^{c,f,h}, Gilbert Ferretti, MD, PhD^{e,f,h}, Pierre Hainaut, PhD^{b,f,h}, Elisabeth Brambilla, MD, PhD^{f,h}, Denis Moro-Sibilot, MD, PhD^{c,f,h}, Sylvie Lantuejoul, MD, PhD^{f,h,i}

^aDépartement d'Anatomie et Cytologie Pathologiques, Pôle de Biologie et Pathologie, CHU Grenoble Alpes, Grenoble

^bPlateforme de Génétique Moléculaire des Cancers, Pôle de Biologie et Pathologie, CHU Grenoble Alpes, Grenoble

^cClinique de Pneumologie, Unité d'Oncologie Thoracique, Pôle Thorax et Vaisseaux, CHU Grenoble Alpes, Grenoble

^dPlateforme de Biologie Moléculaire, Pôle de Biologie et Pathologie, CHU Grenoble Alpes, Grenoble

^eClinique Universitaire de Radiologie et Imagerie, CHU Grenoble Alpes, Grenoble,

^fUGA/INSERM U1209/CNRS 5309-Institute for Advanced Biosciences - Université Grenoble Alpes, Grenoble

^gTheRex TIMC-IMAG CNRS UMR 5525, Grenoble

^hUniversité Grenoble Alpes, Grenoble

ⁱDépartement de biopathologie – MESOPATH, Centre de Lutte Contre le Cancer Léon Bérard, Lyon FRANCE

Corresponding author:

Anne McLeer-Florin, UF Pathologie moléculaire, Plateforme hospitalière de Génétique Moléculaire des Cancers, Département d'anatomie et cytologie pathologiques, Institut de Biologie et de Pathologie, CHU A Michallon, CS 10217 38043 Grenoble Cedex 9 FRANCE
Tel: +33476766309, Fax: +33476765949. AMcleer@chu-grenoble.fr

Short title

RNA-seq for *ALK* variants detection in NSCLC

Grants and funding

MD was the recipient of the IFCT (Intergroupe Francophone de Cancérologie Thoracique) Alain Depierre Grant in 2014.

JP was the recipient of the ARISTOT (Association de Recherche, d'Information Scientifique et Thérapeutique en Oncologie Thoracique) grant in 2016.

This work received funding from the Grenoble-Alpes University Hospital (DRCI REALK project) and from the French *Institut National du Cancer* (INCa).

Abstract:

Introduction: The aim of the present study was to assess the yields of an amplicon-based parallel RNA sequencing (RNA-seq) assay for *ALK* fusion transcript variants detection in comparison with immunohistochemistry (IHC) and fluorescent in-situ hybridization (FISH) in a selected population of *ALK*-positive and *ALK*-negative non-small cell lung cancer (NSCLC) cases, and to evaluate the impact of the *ALK* variant on crizotinib efficacy.

Methods: The cohort used for the assessment of the RNA-seq assay comprised 53 IHC and/or FISH ALK-positive NSCLC samples, and 23 ALK-negative samples. For the ALK-positive samples, a distinction was made between ‘truly’ IHC/FISH positive or ‘truly’ IHC/FISH negative samples, and those for which the IHC and/or FISH were equivocal (IHC) or borderline-positive (FISH).

Results: On the overall population, RNA-seq sensitivity (Se) and specificity (Spe) were of 80% and 100%, respectively when IHC and FISH were combined. For the 31 ‘truly positive’ samples, Se and Spe of 100% were reached. An ALK status could be assigned by RNA-seq in 10/10 of the equivocal and/or borderline-positive IHC/FISH cases, 2/7 IHC/FISH discordant cases. When crizotinib efficacy was evaluated according to the type of *ALK* variant, better clinical outcomes were observed in crizotinib-treated patients with *EML4-ALK* v1/v2/others variants compared to v3a/b variants.

Conclusions: RNA-seq detects *ALK* rearrangements with a high sensitivity and specificity using only 10ng of RNA. It appears to be a promising rescue technique for non-clear-cut IHC/FISH cases and also offers a unique opportunity to identify *ALK* fusion variants and evaluate their predictive value for ALK inhibitors efficacy.

Key words: Lung; ALK; FISH; IHC; NGS; crizotinib; borderline-positive FISH

Abbreviations: ALK; Anaplastic Lymphoma Kinase, EGFR; Epidermal Growth Factor Receptor, KRAS; v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog, FISH; Fluorescent In Situ Hybridization, IHC; immunohistochemistry, NGS; next-generation sequencing, RNA-seq; RNA sequencing

INTRODUCTION:

Anaplastic lymphoma kinase (*ALK*) gene rearrangements are detected in approximately 5% of non-small cell lung cancers (NSCLCs) and lead to the expression of *ALK* fusion-proteins with strong oncogenic properties ^{1,2}. The *ALK*-inhibitors crizotinib and ceritinib have demonstrated their superiority to standard chemotherapy in *ALK*-positive NSCLCs and crizotinib is now the standard of care in this molecular subset of NSCLCs ³⁻⁶. Numerous effective next-generation *ALK*-inhibitors are in clinical development ⁷⁻¹¹. Ceritinib and alectinib have received accelerated approval by the US Food and Drug Administration and European Medicine Agency in crizotinib-refractory patients. These efficient and well tolerated inhibitors lead to a significant improvement of survival and quality of life in *ALK*-positive patients, supporting *ALK* testing for every newly diagnosed advanced NSCLC ^{3,8,12-15}.

For the time being, fluorescent *in situ* hybridization (FISH) remains the ‘gold standard’ for *ALK* rearrangements diagnosis but immunohistochemistry has become a widely used pre-screening tool and the FDA recently approved the Ventana *ALK* (D5F3) CDx Assay (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ) as a companion diagnostic assay for crizotinib. However the diagnosis of *ALK* rearrangements remains challenging ¹⁶⁻²¹. Moreover, neither IHC nor FISH allows the characterization of the *EML4-ALK* transcript variants produced by the gene fusion or the identification of other *ALK* fusion partners.

Direct detection of *ALK* rearrangements using RT-PCR or next-generation sequencing (NGS) could thus not only allow the identification of the transcript variants, but also help elucidate potential differential responses to crizotinib in IHC/FISH discordant cases, and ultimately to better select the patients able to respond to *ALK* inhibitors. Indeed, recent clinical data ²² suggest that IHC-positive/FISH-negative tumors may respond to crizotinib in almost 100% of the cases, whereas responses to crizotinib could be observed in less than 50% of the IHC

negative/FISH positive tumors. Moreover, four recent retrospective studies ^{23–26} using RT-PCR for the detection of *EML4-ALK* variants have suggested that the variability in the fusion variants generated by *ALK* rearrangements could potentially influence the response to *ALK* inhibitors, following an in-vitro study by Heuckman et al ²⁷. However, conflicting results emerge from these studies and the clinical impact of non-*EML4-ALK* variants was not evaluated. In the past few years, NGS technologies have allowed vast improvements in genomic research, as well as in clinical molecular diagnosis. These technologies can be used for cancer genotyping, and in-house or commercial panels have also been developed for the detection of clinically targetable fusion transcripts ^{28–34}.

The aim of the present study was to assess the yields of an amplicon-based parallel sequencing (RNA-seq) assay, more comprehensive than RT-PCR for fusion variants identification, for *ALK* fusion transcripts detection in comparison with IHC and FISH in formalin-fixed paraffin embedded (FFPE) specimens from a cohort of *ALK*-positive NSCLCs and to evaluate the impact of the *ALK* variant on crizotinib efficacy.

MATERIAL AND METHODS:

Patients and samples

Fifty-three *ALK*-positive samples from NSCLC patients were selected as part of routine molecular testing on the Grenoble University Hospital Molecular Genetics Platform from June 2012 to June 2015. Twenty-three *ALK*-negative samples from NSCLC with known *EGFR* and *KRAS* mutations diagnosed during the same period were selected as a control group to assess the sensitivity and specificity of the RNA-sequencing detection assay. All samples were obtained at diagnosis of advanced disease. All seventy-six specimens were reviewed and classified by a pathologist (SL) according to the WHO classification of lung tumors ^{35,36}. The type of samples (biopsy versus surgical specimen) and the percentage of tumor cells were recorded.

Clinical data collected included demographic characteristics, smoking habit, TNM staging according to the 7th TNM classification of lung tumors and treatments received. Efficacy of crizotinib was retrospectively evaluated. The objective tumor response to crizotinib and progression-free survival (PFS) were assessed according to Response Evaluation Criteria in Solid Tumor (RECIST 1.1). The objective response rate (ORR) was calculated as the percentage of patients with a complete response (CR) or partial response (PR). The disease control rate (DCR) was calculated as the percentage of patients with a CR or PR or stable disease (SD). The progression date was defined on the basis of routine surveillance imaging. Patient information was in accordance with French law by means of a non-opposition. Anonymity was ensured for all patient data. This study was approved by the Institutional Review Board of the Grenoble University Hospital.

Molecular testing and distribution of the samples into 5 groups

All samples were tested by pyrosequencing³⁷ for *EGFR* and *KRAS* mutations -and for *BRAF* and *HER2* mutations when *EGFR* and *KRAS* were wild type-, and screened for *ALK* rearrangement by IHC using the 5A4 antibody on a Ventana autostainer, with an amplification step (ultraView Universal DAB Detection Kit, Ventana). As previously described, the percentage of ALK-positive cells was evaluated, and staining intensity was scored as follows: 0; no staining, 1+; faint cytoplasmic staining; 2+; moderate cytoplasmic staining and 3+; intense granular cytoplasmic staining^{19,38}. An IHC score > 50% 1+ was considered as positive; > 0 to ≤ 50% 1+ as equivocal and no staining as negative.

Samples were further tested by *ALK* FISH using the *ALK* breakapart probes from Abbott Vysis and/or ZytoLight, as previously described³⁸. An average of 120 tumor nuclei was analyzed for each sample. All FISH scores > 15% were considered positive, but FISH scores between 15 and 20% were considered borderline-positive, as previously described¹⁸⁻²¹.

In order to better analyze the sensitivity and specificity of RNA-seq compared to IHC and FISH, the samples were divided into 5 groups, according to the results of the ALK IHC and FISH analyses, as shown in **Table 1**.

RNA extraction

Total RNA was extracted from three 5µm-sections of the FFPE samples using the Ambion RecoverAll kit (ThermoFisher), according to the manufacturer's instructions. Extracted RNAs were then quantified using a Qubit® RNA HS assay kit (ThermoFisher) and 10 ng were used for RNA-seq analyses.

Targeted next-generation sequencing and data analysis

Library preparation was performed using the RNA Fusion Lung Cancer Research Panel on an Ion PGM™ system (ThermoFisher), starting from 10ng of total RNA and following the manufacturer's instructions, and as previously described ³⁹. The Ion Reporter™ software (ThermoFisher) was used to identify fusion gene products.

Statistical analysis

The sensitivity (true positive rate; number of RNA-seq-positive cases among the IHC and/or FISH-positive cases) and specificity (true negative rate; number of RNA-seq-negative cases among the IHC and/or FISH-negative cases) of RNA-seq versus the IHC and/or FISH techniques were calculated.

The comparison test used was the Fisher exact test for the qualitative data.

Progression-free survival (PFS) and duration of treatment (DOT) were calculated from the first crizotinib dose to the date of RECIST-defined progressive disease or the date crizotinib was stopped, for PFS and DOT respectively. The Kaplan-Meier method was used to estimate all survival endpoints. Survival differences in patient groups were calculated using the log-rank test. The cut-off date for survival analysis was May 31st, 2016.

All statistical tests were two-sided, and a P value <0.05 was deemed statistically significant. All analyses were performed using SPSS 22.0 software (IBM corporation, New York, USA).

RESULTS:

Patients and samples characteristics

Clinical and histopathological data as well as *ALK* FISH and IHC results for the 76 samples of the cohort are summarized in **Table 2**. Additional histopathological data are presented in **supplementary Table S1**.

RNA-sequencing results

RNA-seq was successful for 75% of samples (40 *ALK*-positive and 17 *ALK*-negative samples) and could not be performed for 19 cases, either because of a too low RNA concentration (<0.02ng/μL, n=10) or because cDNA libraries were unquantifiable (no cDNA amplification, n=9) (**Figure 1A and supplementary Table S1**).

Figure 1B shows the results obtained with the 40 *ALK*-positive samples. No fusion transcripts were found for the 17 *ALK*-negative samples analyzed (**Figure 1C**). Overall, RNA sequencing yielded a sensitivity of 80% and a specificity of 100% versus IHC and FISH combined (**Figure 1C**). **Figure 2** shows the RNA-seq results obtained in the 4 *ALK*-positive groups described in **Table 1**.

Group 1: ‘truly positive’ samples (Figure 2A)

Six out of 31 (19%) samples could not be analyzed by RNA-seq due to insufficient RNA (n=4) or unquantifiable libraries (n=2). For the samples which were successfully analyzed, as expected *EML4-ALK* fusion transcripts were the most common fusion transcripts identified (17/25 samples). Two *KLC1(19)-ALK(20)* transcripts and one *HIP(28)-ALK(20)* transcript were also detected. For the remaining 5 samples, an *ALK* 3’5’ imbalance was detected, indicative of the presence of a fusion with an unknown partner or a fusion not included in the

panel, according to the manufacturer. In total, an *ALK*-rearrangement was found in 100% of the 25 analyzable samples, yielding a sensitivity of 100%.

Group 2: IHC/FISH equivocal or borderline-positive samples (Figure 2B)

All 10 samples in this group were successfully analyzed. An *EML4(13)-ALK(20)* fusion was found in 4 samples (40%): 2 cases with an equivocal IHC and a FISH >20%, and 2 cases with an IHC of 80% 2+ and a borderline-positive FISH. Surprisingly, a *KIF5B(15)-RET(12)* fusion was detected in another sample for which the IHC was negative, and the FISH was borderline-positive, with 19.8% positive tumor cells. In the 5 remaining samples (50%), no *ALK* fusions were detected. Among these 5 samples, one had a negative IHC and a borderline-positive FISH, 2 had an equivocal IHC and a borderline-positive FISH, and 2 showed an equivocal IHC and a positive FISH. Overall, an *ALK* fusion transcript was detected in 2/6 borderline-positive FISH samples and 2/6 equivocal IHC samples, and the sensitivity of RNA-seq compared to IHC and FISH combined was of 50%.

Group 3: IHC/FISH discordant samples (Figure 2C)

Out of the 7 IHC/FISH discordant cases, 5 (71%) could not be analyzed because of an RNA concentration <0.02 ng/μL (all were biopsies): 2/4 IHC+/FISH- samples, and 3/3 IHC-/FISH+ samples. For the 2 IHC+/FISH- samples successfully analyzed, one harbored an *EML4(20)-ALK(20)* fusion (the IHC intensity was of 90% 3+, and the FISH negative both with the Abbott (1.5%) and the Zytovision ALK BAP probes (1.0%)), and for the other one, no fusion was detected, but in this case the IHC intensity was 50% 1+ and the FISH negative, with no (0%) positive tumor cells.

Group 4: IHC-positive/FISH not interpretable samples (Figure 2D)

The IHC staining intensities for the 5 samples in this group were 50% 2/3+ (n=1), 80% 2+ (n=1), 90% 2+ (n=1) and 90% 3+ (n=2). Two of these samples could not be analyzed because of unquantifiable libraries; one of them was fixed in AFA (alcohol, formalin, acetic acid). Out

of the 3 cases analyzed, one case with an IHC of 90% 2+ harbored an *EML4(6)a-ALK(20)* fusion and one case (IHC 90% 3+) showed a 3'5' imbalance, whereas an *EML4(6)a/b-ALK(20)* fusion was detected by real-time RT-PCR, using the same RNA extraction (**data not shown**), but this sample was fixed in Bouin's fixative. No fusions were detected in the last sample which showed an IHC staining intensity of 90% 3+, but this result is probably falsely negative, as not enough tumor cells were present for FISH interpretation (<50).

Sensitivity and specificity of the RNA-seq technique vs IHC or FISH for ALK rearrangements detection (supplementary Figure S1)

For the 57 ALK-positive and -negative samples analyzed, the sensitivity and specificity of RNA-seq when compared to FISH alone with a positivity threshold >15% was of 82.9% and 94.7%, respectively. For a positivity threshold > 20%, the sensitivity of RNA-seq vs FISH was of 93.1% and the specificity of 88%.

When compared to IHC alone, RNA-seq had a sensitivity of 84.2% and a specificity of 100% for the cases with a positive IHC (IHC > 0) and a sensitivity of 93.8% and a specificity of 92% for the cases with a positivity threshold for IHC $\geq$ 50% 1+.

Correlation between ALK-rearrangement detection by IHC, FISH or RNA-seq and clinical response to crizotinib (Table 3, Figure 3 and supplementary Figure S2)

Crizotinib was given to 26 ALK-positive patients. The remaining patients either died before any treatment could be given, were treated with another anti-ALK, or did not receive any anti-ALK targeted therapy. Clinical characteristics, molecular ALK testing and clinical outcomes with crizotinib are shown in **Table 3**, and **supplementary Figure S2** for each individual patient. Four patients (15%) received the drug in first-line treatment, 10 patients (38%) in second-line, nine patients (35%) in third-line and three patients (12%) in fourth-line. All patients were evaluable according to RECIST 1.1. Eleven patients experienced a partial response (PR), eight a stable disease (SD) and seven a progressive disease (PD). The

objective response rate (ORR) was 39% and the disease control rate (DCR) was 73%. The median PFS was 155 days (range, 10-416) and the median DOT was 181 days (range, 10-1911).

Out of the 26 patients treated with crizotinib, the FISH result was positive (>15%) in 23 cases (two cases were borderline-positive), negative in one and not interpretable in two. Immunohistochemistry was positive (> 50% 1+) in 21 cases, equivocal in three and negative in two. RNA-sequencing was not performed in six samples because of an RNA concentration <0.02ng/μL (n=4) or unquantifiable cDNA libraries (n=2). One *EML4(6)a/b-ALK(20)* was identified with real-time RT-PCR in these six samples and the five remaining patients were RT-PCR-negative (**data not shown**). For the 20 remaining patients analyzed by RNA-seq, 13 harbored an *EML4-ALK* transcript, two a *KLC1(19)-ALK(20)* transcript, and a 3'5' *ALK* imbalance was detected in three patients. No fusion transcripts were detected in the remaining two patients.

Clinical outcomes with crizotinib according to the IHC and RNA-sequencing status are shown in **Figure 3**. ALK immunochemistry staining intensity (3+, 2+ or 0/1+) was correlated with crizotinib efficacy in term of response, PFS and DOT, but this was not the case for FISH patterns and percentage of positive cells (**data not shown**).

In *ALK*-positive patients according to RNA sequencing (n=18), the RR was 56% for a DCR of 83%. Median PFS was 182 days and median DOT was 230 days. In patients for whom the tumor sample was RNA-seq negative (no fusion, n=2), crizotinib was ineffective, with progressive disease as best responses in both cases and PFS of 10 and 30 days. The first case showed a negative IHC and a borderline-positive FISH (16.6%), and the other an equivocal IHC (20% 1+) and a positive FISH (57%), but with a poor hybridization quality, and only 70 tumor nuclei analyzed. For the three cases showing an *ALK* 3'5' imbalance treated with crizotinib, two showed a prolonged clinical benefit and one a progressive disease as best

response warranting further analysis of these cases by non-targeted techniques. In patients for whom the tumor sample was not analyzable by RNA-seq (n=6), the ORR was 17% (1/6) for a DCR of 67%. The median PFS was 138 days and the median DOT was 176 days. Only one response (1/6) was observed in a patient with an *EML4(6)a/b-ALK(20)* identified with RT-PCR; the five remaining patients were RT-PCR-negative (**data not shown**).

Median PFS was numerically longer in the *EML4-ALK* variants v1/v2 group (n=6) compared to the v3a/v3b group (n=8, including one case identified by RT-PCR following detection failure with RNA-seq) (314 vs 192 days) but did not reach statistical significance (p=0.1743), as well as median DOT (510 vs 215 days, p=0.1080) (**Figure 3**). No responses were observed in the two patients with the *KLC1(9)-ALK(20)* rearrangements.

DISCUSSION:

In this study, we assessed the use of an amplicon-based RNA parallel sequencing assay to detect *ALK* fusion transcripts in FFPE samples from a selected population of *ALK*-positive and *ALK*-negative cases. We found that RNA sequencing yielded a sensitivity of 80% and a specificity of 100% versus IHC and FISH combined and was a promising rescue technique in equivocal and/or borderline-positive IHC/FISH cases. Moreover, correlations between RNA-sequencing results and crizotinib efficacy suggest the potential of NGS as a diagnostic tool for the detection of *ALK*-rearranged NSCLCs.

Fifty-seven out of seventy-six samples (75%) of our cohort were of sufficient quantity/quality to be analyzed by RNA-seq. Comparable results have been obtained in other retrospective studies^{30,40} in which 34% and 30% of samples could not be analyzed by NGS because they were exhausted by previous multiple assays testing, even if in our study we only used three 5- μ m sections for each sample tested. Worse clinical outcomes than expected in *ALK*-positive samples were observed with crizotinib in the 6 patients with non-analyzable samples by RNA-seq, with two progressive diseases and only one response. It would thus have been very

interesting to characterize the fusion transcripts present in these tumors, and this highlights the importance of having sufficient FFPE material, and of sufficient quality, to perform successful (RNA)sequencing analyses. The development of more sensitive parallel sequencing techniques not requiring an amplification step therefore appears of critical importance for a rapid and efficient routine molecular diagnosis of small mutations as well as (sometimes complex) gene rearrangements ⁴¹.

In light of previous results obtained by our team and others ^{18-21,31}, the RNA-seq results of the samples for which the IHC and FISH were clearly positive (“truly positive” cases) were interpreted separately from those with equivocal/borderline-positive or discordant IHC and FISH. This also gave us the opportunity to evaluate the use of RNA-seq as a rescue technique, with the aim of improving patient selection for ALK inhibitor therapy.

An *ALK* rearrangement was found in all the analyzable “truly positive” IHC+/FISH+ samples, and the proportion of the various transcripts was in accordance with the literature ^{23,42-44}. In these samples, the RNA-seq technique was therefore 100% sensitive and specific. Additional non-targeted analyses are required in order to identify the fusion transcripts in the cases for which an *ALK* 3’5’ imbalance was detected. However, this additional information comes at a cost, as these techniques often require at least 5 times more RNA (50-200ng) than the targeted panel used (10ng) in the present study, and are more expensive.

RNA-seq proved to be an effective rescue technique for the equivocal and/or borderline-positive IHC/FISH cases as it allowed us to eventually qualify each of these samples as either being ALK-positive (4/10) or ALK-negative (6/10) on the basis of the presence or absence of an *ALK* fusion transcript. Moreover, in one case (negative IHC and borderline FISH), a *KIF5B-RET* fusion was found, pointing towards a false-positivity of the ALK FISH, and highlighting the importance of multiplex testing. However, the RNA-seq assay used in the present study was not as helpful in the analysis of the IHC/FISH discordant cases, as no

results could be obtained for the IHC-negative/FISH-positive samples tested, because of a too low RNA concentration. This could be because these samples were repetitively tested, or because of preanalytical issues, as highlighted in another study of such discordant cases ¹⁷, our samples coming from various pathology laboratories. For the two IHC-positive/FISH-negative samples analyzed, an *ALK* fusion transcript was detected in one case (IHC 90% 2/3+, FISH 1.5%), the other case (IHC 50% 1+, FISH 0%) was negative, leading us to conclude that the 50% 1+ IHC staining with the 5A4 antibody was probably not specific in this case, even though *ALK* fusion transcripts were found in 3 other cases with an IHC intensity of 30% 1+ and 50% 1+.

The overall concordance between the FISH technique and the RNA-seq results obtained with our cohort was of 96%, as 21/22 FISH-negative cases were RNA-seq negative. The FISH-negative case which was found to harbor an *ALK* fusion transcript was IHC positive, thus probably harboring a complex rearrangement not detected by FISH, or an alternative mechanism leading to an overexpression of the *ALK* protein ^{45,46}. For the ‘truly’ FISH-positive cases (>20%), an *ALK* rearrangement was found by RNA-seq in 27/29 (93%) cases, with the 2 RNA-seq negative cases showing a doubtful IHC staining. For the FISH borderline-positive samples (FISH 15-20%), an *ALK* fusion was found only in 2/6 (33%) samples; the only two samples for which the IHC was positive. These results, along with those obtained by other teams, highlight the challenges posed by borderline-positive FISH results for the molecular diagnosis of *ALK*, but also of *ROS1* and *RET* rearrangements ^{17–21,47,48}. In these cases, the use of techniques which allow the simultaneous detection of all targetable gene fusions, such as RNA-seq, can be very helpful.

Concerning the concordance between *ALK* IHC and RNA-seq results, an *ALK* fusion transcript was found in 3/8 (38%) cases with a low ($\leq$ 50% 1+) staining intensity, 29/30 (97%) cases with an intensity >50% 1+, and no *ALK* fusions were found in the IHC-negative cases.

These results confirm the importance of testing ALK IHC-positive cases for the presence of an *ALK*-rearrangement, especially for 1+ and 2+ scores, as recently highlighted by Marchetti et al²².

Finally, the real-time PCR results obtained on this cohort (all ALK-positive sample were analyzed, data not shown) gave limited information as only the 4 more frequent *EML4-ALK* transcripts were tested (v1, v2, v3a/b and v5). However, for the samples for which an *ALK* fusion transcript was detected by real-time PCR and by RNA-seq, there were no discordances between the fusion transcripts found by both techniques.

The correlations we found between the RNA-seq results and the clinical outcomes in the limited number of patients of our cohort who received crizotinib highlight the potential of this technique. Firstly, crizotinib was ineffective in the two cases with no *ALK* fusion according to RNA-seq. One case was IHC-negative/FISH-borderline and the other IHC-equivocal/FISH-positive. Secondly, no responses were observed in the two patients with the *KLC1(19)-ALK(20)* rearrangements, suggesting the lack of efficacy of crizotinib in these non-*EML4-ALK* variants. Thirdly, we found a trend for a better median PFS and DOT in v1/v2 *EML4-ALK* variants cases compared to v3a/b. These data should be carefully interpreted because of the small number of patients considered. However, these results are in line with the data recently published by Woo et al.⁴⁹, showing a longer PFS with crizotinib in patients with v1/v2/others *EML4-ALK* variants compared to v3a/b variants. An in-vitro study by Heuckman et al.²⁷ showed that the stability of the different *EML4-ALK* rearrangement products conditioned the sensitivity to crizotinib, with *EML4-ALK* v2 being the most sensitive, v1 and v3b having intermediate sensitivity and v3a being the less sensitive. Our results, together with those of Woo et al.²⁵ support this assumption. Further studies on larger cohorts are warranted in order to address this question, and RNA-seq techniques offer a unique opportunity to decipher the role of *EML4-ALK* and non-*EML4-ALK* variants as predictive biomarkers of

ALK inhibitors efficacy. As alectinib has recently proven its superiority to crizotinib in first-line treatment and could become the new standard of care ⁵⁰, data are needed about ALK variants impact on alectinib and other next-generation ALK inhibitors sensitivity.

CONCLUSION:

The use of accurate and highly informative tools for the detection of *ALK* and other gene fusions has become a necessity for the management of advanced NSCLCs. By using an RNA parallel-sequencing assay, we were able to detect *EML4-ALK* and non-*EML4-ALK* fusion variants in our cohort, and along with others, our study suggests the potential of ALK fusion variants as predictive biomarkers of crizotinib efficacy ²³⁻²⁶. Further studies on larger cohorts are warranted in order to address this question and NGS-based techniques offer a unique opportunity to decipher the role of *EML4-ALK* and non-*EML4-ALK* variants as predictive biomarkers of ALK inhibitors efficacy.

Overall, in light of the present results and those of other teams ²²⁻²⁶, we suggest that prescreening of advanced-stage lung tumor samples with a validated ALK IHC followed by a molecular testing technique, such as RNA-seq, to identify the nature of the fusion variant, would allow additional precision to the treatment of *ALK*-positive NSCLs, with the advantage of NGS-based techniques to test for other targetable molecular alterations in a single test.

Acknowledgements

The authors wish to thank Isabelle Putaud, Régine Bethier, Corine Cadet, Françoise Ceccaldi and Nicolas Lemaître for their excellent technical assistance.

Disclosure/Duality of interest

AMF has received research funding from Pfizer. She has been reimbursed for travel, accommodation, and/or other expenses by ThermoFisher, Clinisciences, Astra-Zeneca, Novartis, Pfizer and Roche and has served as a consultant (advisory board) for Novartis.

MD has received research funding from Novartis and Pfizer. He has been reimbursed for travel, accommodation, and/or other expenses by Novartis, Pfizer and Roche. He has served as a consultant (advisory board) for Pfizer.

DMS has received research funding from Pfizer. He has served as a consultant (advisory board) for Novartis, Pfizer and Roche.

SL has served as a consultant in advisory boards for BMS, MSD, Pfizer, Novartis, Astra-Zeneca, Roche, Boehringer Ingelheim.

All other authors declared no conflict of interest regarding the present work.

References

1. Barlesi, F. *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* **387**, 1415–26 (2016).
2. Soda, M. *et al.* Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature* **448**, 561–6 (2007).
3. Shaw, A. T. *et al.* Crizotinib versus chemotherapy in advanced ALK-positive lung cancer. *N Engl J Med* **368**, 2385–94 (2013).
4. Solomon, B. J. *et al.* First-line crizotinib versus chemotherapy in ALK-positive lung cancer. *N Engl J Med* **371**, 2167–77 (2014).
5. De Castro, G. J. *et al.* First-line Ceritinib Versus Chemotherapy in Patients With ALK-rearranged (ALK+) NSCLC: A Randomized, Phase 3 Study (ASCEND-4). in (2016).
6. Scagliotti, G. *et al.* Ceritinib vs chemotherapy (CT) in patients (pts) with advanced anaplastic lymphoma kinase (ALK)-rearranged (ALK+) non-small cell lung cancer (NSCLC) previously treated with CT and crizotinib (CRZ): results from the confirmatory phase 3 ASCEND-5 study. in (2016).
7. Gadgeel, S. M. *et al.* Safety and activity of alectinib against systemic disease and brain metastases in patients with crizotinib-resistant ALK-rearranged non-small-cell lung cancer (AF-

- 002JG): results from the dose-finding portion of a phase 1/2 study. *Lancet Oncol* **15**, 1119–28 (2014).
8. Zou, H. Y. *et al.* PF-06463922, an ALK/ROS1 Inhibitor, Overcomes Resistance to First and Second Generation ALK Inhibitors in Preclinical Models. *Cancer Cell* **28**, 70–81 (2015).
 9. Gettinger, S. N. *et al.* Activity and safety of brigatinib in ALK-rearranged non-small-cell lung cancer and other malignancies: a single-arm, open-label, phase 1/2 trial. *Lancet Oncol* **17**, 1683–1696 (2016).
 10. Ou, S. H. *et al.* Alectinib in Crizotinib-Refractory ALK-Rearranged Non-Small-Cell Lung Cancer: A Phase II Global Study. *J Clin Oncol* **34**, 661–8 (2016).
 11. Shaw, A. T. *et al.* Alectinib in ALK-positive, crizotinib-resistant, non-small-cell lung cancer: a single-group, multicentre, phase 2 trial. *Lancet Oncol* **17**, 234–42 (2016).
 12. Cameron, L. & Solomon, B. New Treatment Options for ALK-Rearranged Non-Small Cell Lung Cancer. *Curr. Treat. Options Oncol.* **16**, 49 (2015).
 13. Khozin, S. *et al.* FDA approval: ceritinib for the treatment of metastatic anaplastic lymphoma kinase-positive non-small cell lung cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **21**, 2436–2439 (2015).
 14. Santarpia, M., Altavilla, G. & Rosell, R. Alectinib: a selective, next-generation ALK inhibitor for treatment of ALK-rearranged non-small-cell lung cancer. *Expert Rev. Respir. Med.* **9**, 255–268 (2015).
 15. Duruisseaux, M. *et al.* Overall survival with crizotinib and next-generation ALK inhibitors in ALK-positive non-small-cell lung cancer (IFCT-1302 CLINALK): a French nationwide cohort retrospective study. *Oncotarget* (In Press).
 16. Lindeman, N. I. *et al.* Molecular testing guideline for selection of lung cancer patients for EGFR and ALK tyrosine kinase inhibitors: guideline from the College of American Pathologists, International Association for the Study of Lung Cancer, and Association for Molecular Pathology. *J. Thorac. Oncol. Off. Publ. Int. Assoc. Study Lung Cancer* **8**, 823–859 (2013).
 17. Cabillic, F. *et al.* Parallel FISH and immunohistochemical studies of ALK status in 3244 non-small-cell lung cancers reveal major discordances. *J Thorac Oncol* **9**, 295–306 (2014).
 18. Ilie, M. I. *et al.* Discrepancies between FISH and immunohistochemistry for assessment of the ALK status are associated with ALK 'borderline'-positive rearrangements or a high copy number: a potential major issue for anti-ALK therapeutic strategies. *Ann Oncol* **26**, 238–44 (2015).
 19. Lantuejoul, S. *et al.* French multicentric validation of ALK rearrangement diagnostic in 547 lung adenocarcinomas. *Eur. Respir. J.* **46**, 207–218 (2015).
 20. von Laffert, M. *et al.* ALK-FISH borderline cases in non-small cell lung cancer: Implications for diagnostics and clinical decision making. *Lung Cancer* **90**, 465–71 (2015).
 21. Uguen, A. *et al.* ALK ambiguous-positive non-small cell lung cancers are tumors challenged by diagnostic and therapeutic issues. *Oncol Rep* **36**, 1427–34 (2016).

22. Marchetti, A. *et al.* ALK Protein Analysis by IHC Staining after Recent Regulatory Changes: A Comparison of Two Widely Used Approaches, Revision of the Literature, and a New Testing Algorithm. *J Thorac Oncol* **11**, 487–95 (2016).
23. Cha, Y. J., Kim, H. R. & Shim, H. S. Clinical outcomes in ALK-rearranged lung adenocarcinomas according to ALK fusion variants. *J Transl Med* **14**, 296 (2016).
24. Lei, Y. Y. *et al.* Anaplastic Lymphoma Kinase Variants and the Percentage of ALK-Positive Tumor Cells and the Efficacy of Crizotinib in Advanced NSCLC. *Clin Lung Cancer* **17**, 223–31 (2016).
25. Woo, C. G. *et al.* Differential protein stability and clinical responses of *EML4-ALK* fusion variants to various ALK inhibitors in advanced *ALK* -rearranged non-small cell lung cancer. *Ann. Oncol.* mdw693 (2016). doi:10.1093/annonc/mdw693
26. Yoshida, T. *et al.* Differential Crizotinib Response Duration Among ALK Fusion Variants in ALK-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol* **34**, 3383–9 (2016).
27. Heuckmann, J. M. *et al.* Differential protein stability and ALK inhibitor sensitivity of *EML4-ALK* fusion variants. *Clin Cancer Res* **18**, 4682–90 (2012).
28. Wang, Q., Xia, J., Jia, P., Pao, W. & Zhao, Z. Application of next generation sequencing to human gene fusion detection: computational tools, features and perspectives. *Brief. Bioinform.* **14**, 506–519 (2013).
29. Zheng, Z. *et al.* Anchored multiplex PCR for targeted next-generation sequencing. *Nat Med* **20**, 1479–84 (2014).
30. Drilon, A. *et al.* Broad, Hybrid Capture-Based Next-Generation Sequencing Identifies Actionable Genomic Alterations in Lung Adenocarcinomas Otherwise Negative for Such Alterations by Other Genomic Testing Approaches. *Clin Cancer Res* **21**, 3631–9 (2015).
31. Pekar-Zlotin, M. *et al.* Fluorescence in situ hybridization, immunohistochemistry, and next-generation sequencing for detection of *EML4-ALK* rearrangement in lung cancer. *The Oncologist* **20**, 316–322 (2015).
32. Heydt, C., Kostenko, A., Merkelbach-Bruse, S., Wolf, J. & Büttner, R. ALK evaluation in the world of multiplex testing: Network Genomic Medicine (NGM): the Cologne model for implementing personalised oncology. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* **27 Suppl 3**, iii25–iii34 (2016).
33. Jang, J. S. *et al.* Custom Gene Capture and Next-Generation Sequencing to Resolve Discordant ALK Status by FISH and IHC in Lung Adenocarcinoma. *J. Thorac. Oncol. Off. Publ. Int. Assoc. Study Lung Cancer* **11**, 1891–1900 (2016).
34. König, K. *et al.* Implementation of Amplicon Parallel Sequencing Leads to Improvement of Diagnosis and Therapy of Lung Cancer Patients. *J. Thorac. Oncol. Off. Publ. Int. Assoc. Study Lung Cancer* **10**, 1049–1057 (2015).
35. Travis, W. D. *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* **6**, 244–85 (2011).

36. Travis, W. D. *et al.* The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors: Impact of Genetic, Clinical and Radiologic Advances Since the 2004 Classification. *J. Thorac. Oncol. Off. Publ. Int. Assoc. Study Lung Cancer* **10**, 1243–1260 (2015).
37. Dufort, S., Richard, M. J., Lantuejoul, S. & De Fraipont, F. Pyrosequencing, a method approved to detect the two major EGFR mutations for anti EGFR therapy in NSCLC. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* (2011).
38. McLeer-Florin, A. *et al.* Dual IHC and FISH testing for ALK gene rearrangement in lung adenocarcinomas in a routine practice: a French study. *J Thorac Oncol* **7**, 348–54 (2012).
39. Pfarr, N. *et al.* High-throughput diagnostic profiling of clinically actionable gene fusions in lung cancer. *Genes. Chromosomes Cancer* **55**, 30–44 (2016).
40. Hiley, C. T. *et al.* Challenges in molecular testing in non-small-cell lung cancer patients with advanced disease. *Lancet* **388**, 1002–11 (2016).
41. Goodwin, S., McPherson, J. D. & McCombie, W. R. Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nat. Rev. Genet.* **17**, 333–351 (2016).
42. Ali, S. M. *et al.* Comprehensive Genomic Profiling Identifies a Subset of Crizotinib-Responsive ALK-Rearranged Non-Small Cell Lung Cancer Not Detected by Fluorescence In Situ Hybridization. *Oncologist* **21**, 762–70 (2016).
43. Iyevleva, A. G. *et al.* Novel ALK fusion partners in lung cancer. *Cancer Lett.* **362**, 116–121 (2015).
44. Hallberg, B. & Palmer, R. H. The role of the ALK receptor in cancer biology. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* **27 Suppl 3**, iii4-iii15 (2016).
45. Togashi, Y. *et al.* An activating ALK gene mutation in ALK IHC-positive/FISH-negative nonsmall-cell lung cancer. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* **26**, 1800–1801 (2015).
46. Heuckmann, J. M., Pauwels, P. & Thunnissen, E. Comprehensive Hybrid Capture-Based Next-Generation Sequencing Identifies a Double ALK Gene Fusion in a Patient Previously Identified to Be False-Negative by FISH. *J. Thorac. Oncol. Off. Publ. Int. Assoc. Study Lung Cancer* **12**, e22–e24 (2017).
47. Shaw, A. T. *et al.* Crizotinib in ROS1-rearranged non-small-cell lung cancer. *N. Engl. J. Med.* **371**, 1963–1971 (2014).
48. Song, Z., Yu, X. & Zhang, Y. Clinicopathologic characteristics, genetic variability and therapeutic options of RET rearrangements patients in lung adenocarcinoma. *Lung Cancer Amst. Neth.* **101**, 16–21 (2016).
49. Woo, C. G. *et al.* Differential protein stability and clinical responses of EML4-ALKfusion variants to various ALK inhibitors in advanced ALK-rearranged non-small cell lung cancer. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* (2016). doi:10.1093/annonc/mdw693
50. Peters, S. *et al.* Alectinib versus Crizotinib in Untreated ALK-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer. *N. Engl. J. Med.* (2017). doi:10.1056/NEJMoa1704795

Figure 1

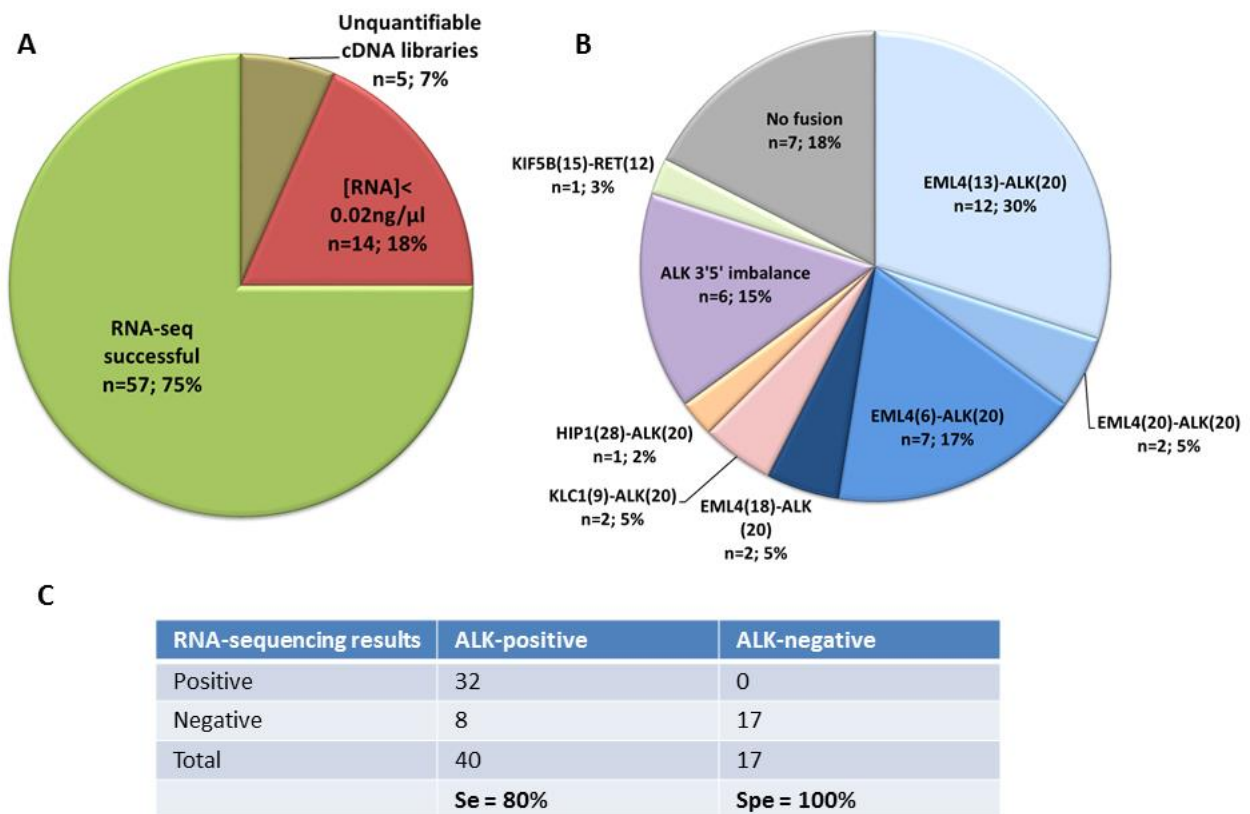


Figure 1: RNA-sequencing results and performance for *ALK* fusion transcripts detection.

A) Repartition of the successes and failures of the RNA-seq analyses on the 76 samples of the cohort. **B)** Results obtained on the 40 *ALK*-positive samples analyzed by RNA-seq. **C)** Sensitivity (Se) and specificity (Spe) of the RNA-seq technique in the *ALK*-positive and *ALK*-negative samples analyzed (n=57). The *KIF5B-RET* positive ample was considered as being *ALK*-fusion negative.

Figure 2

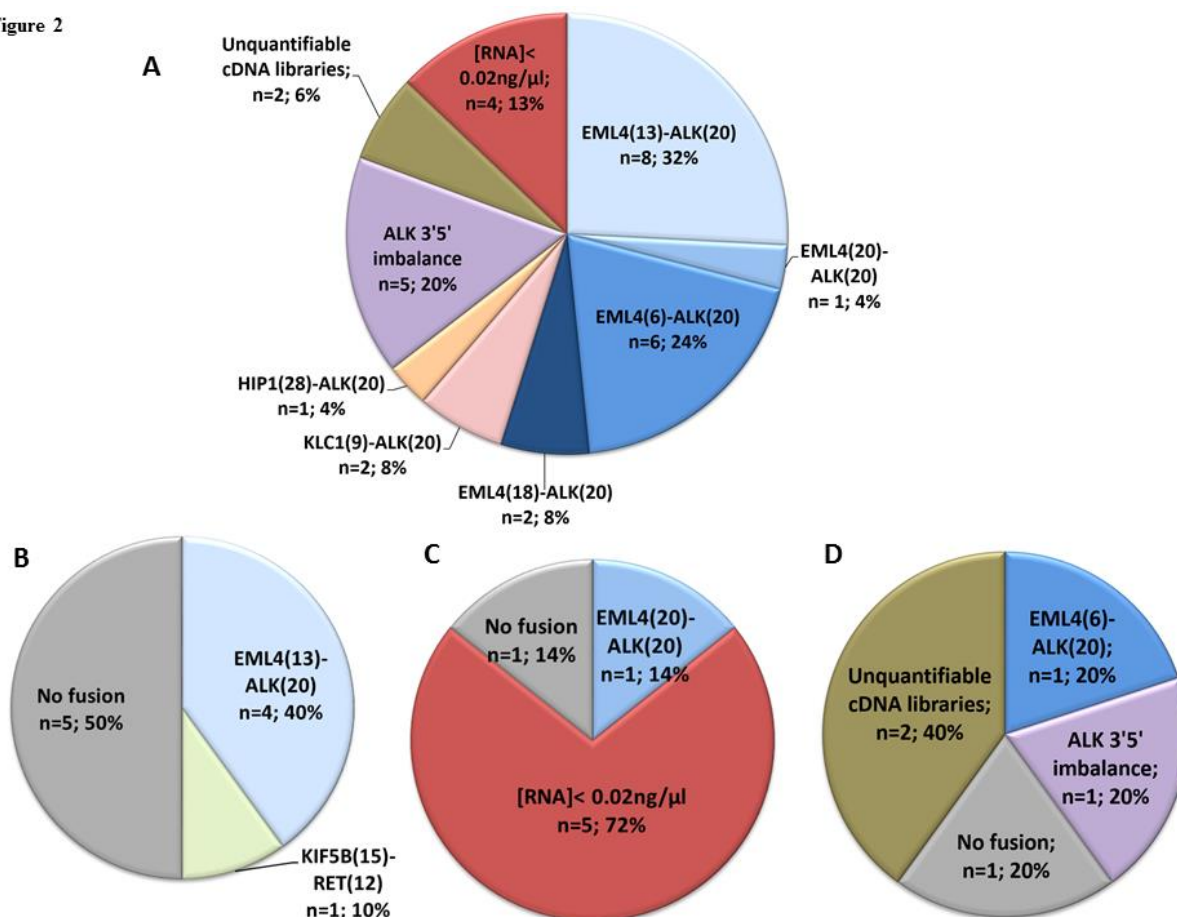


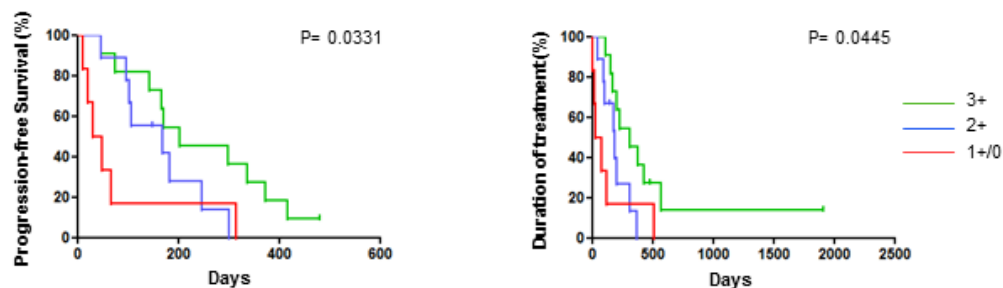
Figure 2: RNA-sequencing results in the 4 ALK-positive groups.

A) Group 1; ‘truly positive’ samples, **B)** Group 2; equivocal IHC and/or borderline positive FISH samples, **C)** Group 3; IHC/FISH discordant samples, and **D)** Group 4; ‘IHC-positive’ samples. See Table 1 for the details regarding each group.

Figure 3

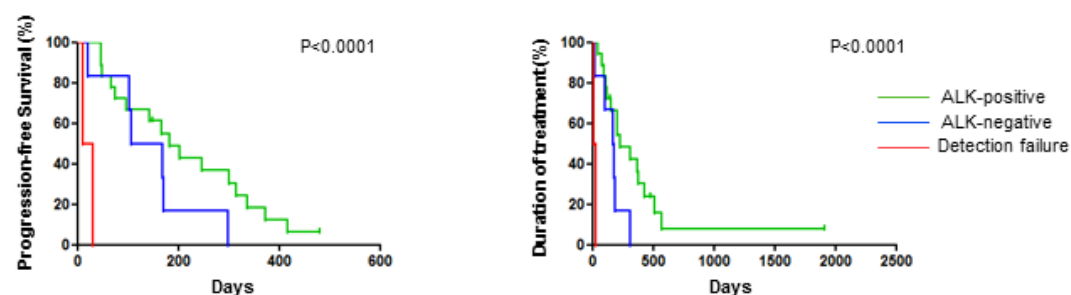
A

IHC status	Response rate, %	Median PFS, days	Median DOT, days
3+	73 (8/11)	202	316
2+	22 (2/9)	169	191
1+/0	12.5 (1/6)	39	75



B

RNA-seq status	Response rate, %	Median PFS, days	Median DOT, days
ALK-positive	56 (10/18)	182	230
Detection failure	17 (1/6)	138	176
ALK-negative	0 (0/2)	20	20



C

EML4-ALK variants	Response rate, %	Median PFS, days	Median DOT, days
v1/v2	60 (4/6)	314	510
v3a/b	62.5 (5/8)	192	215

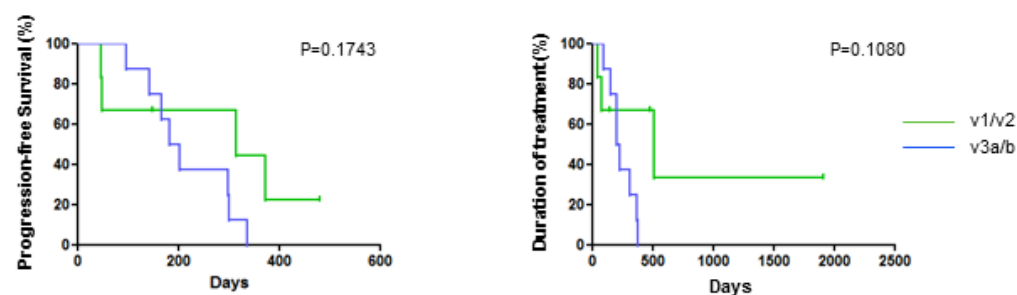


Figure 3: Clinical outcomes with crizotinib according to the result of immunohistochemistry, RNA-seq or the type of *EML4-ALK* variant detected with RNA-seq.

A) Response rate, median progression-free survival (PFS) and median duration of treatment (DOT) are displayed in the table according to the intensity of the immunohistochemistry staining (3+, n=11, 2+, n=9, 1/0+, n=6). Kaplan-Meier curves for the PFS and DOT are shown according to the intensity of the immunohistochemistry staining (log rank test). **B)** Response rate, median PFS and median DOT are displayed in the table according to the RNA-seq results (ALK-positive, n=18, detection failure, n=6, ALK-negative, n=2). Kaplan-Meier curves for the PFS and DOT are shown according to RNA-seq results (log rank test). **C)** Response rate, median PFS and median DOT are displayed in the table according to the *EML4-ALK* variants detected and expected protein products stability (v1/v2, n=6, V3a/b, n=8). Kaplan-Meier curves for the PFS and DOT are shown according to the *EML4-ALK* variants detected (log rank test).

Table 1: Distribution into 5 groups of the ALK-positive and ALK-negative samples according to IHC and FISH

Group 1: ‘truly positive’ samples: IHC > 50% 1+ and FISH > 20%	n = 31
Group 2: equivocal IHC and/or borderline FISH samples	n = 10
equivocal IHC (< 50% 1+) and FISH > 20%	4
positive IHC (> 50% 1+) and borderline FISH (> 15% and ≤ 20%)	2
equivocal IHC (< 50% 1+) and borderline FISH (> 15% and ≤ 20%)	2
negative IHC (no staining) and borderline FISH (> 15% and ≤ 20%)	2
Group 3: IHC/FISH discordant samples	n = 7
negative IHC (no staining) and positive FISH (> 20%)	3
positive IHC (> 50% 1+) and negative FISH (< 15%)	4
Group 4: ‘IHC-positive’ samples	n = 5
positive IHC (> 50% 1+) and no FISH signals	4
positive IHC (> 50% 1+) and not enough TCs (< 50) for FISH	1
Group 5: ALK-negative samples	n = 23

TC: tumor cells

Table 2: Clinical, histopathological and IHC and FISH data of the ALK-positive and ALK-negative NSCLC patients

n = 76	ALK-positive patients n = 53	ALK-negative patients n = 23*
Gender, n (%)		
M	22 (42)	12 (52)
F	31 (58)	11 (48)
Age mean (range)		
M	58 (23-83)	68 (56-81)
F	61 (37-86)	60 (35-77)
Smoking status n (%)		
Smokers (former and current)	21 (40)	15 (65)
Non-smokers	25 (47)	7 (30)
Missing data	7 (13)	1 (5)
Histology n (%)		
adenocarcinoma	47 (89)	19 (82)
sarcomatoid carcinoma	1 (2)	2 (9)
large cell carcinoma	3 (5)	2 (9)
large cell neuroendocrine carcinoma	1 (2)	0
NOS	1 (2)	0
Stage at diagnosis n (%)		
IA	0	0
IB	0	2 (9)
IIA	0	0
IIB	2 (4)	2 (9)
IIIA	1 (2)	3 (13)
IIIB	10 (19)	1 (4)

IV	37 (70)	15 (65)
Missing data	3 (5)	0
IHC n (%)		
Positive (>50% 1+)	42 (79)	0
Equivocal (>0 to ≤50% 1+)	6 (11.5)	0
Negative (no staining)	5 (9.5)	23 (100)
FISH n (%)		
Positive (>15%):	44 (83)	0
- positive (>20%)	38	0
- borderline (15-20%)	6	0
Negative (<15%)	4 (7.6)	23 (100)
Not interpretable:	5 (9.4)	0
- poor/no probe hybridization	4**	
- not enough tumor cells (<50)	1	

*9 samples were *EGFR*+/*KRAS*-, 10 samples were *EGFR*-/*KRAS*+ and 4 samples were *EGFR*-/*KRAS*-/*BRAF*-/*HER2*-

**1 AFA and 1 Bouin's fixative

Table 3: Clinical characteristics, results of ALK molecular testing and clinical outcomes with crizotinib in patients who received crizotinib

Patient	Age	Sex	Smoking	ALK molecular testing			Line of crizotinib treatment	Clinical outcomes with crizotinib		
				IHC ALK, % of positive cells/ staining intensity	FISH, % of positive nuclei	RNA-seq		Objective response	PFS, days	DoT, days
Case-06	56	F	Current	0%	59%	Detection failure	4	PD	21	21
Case-26	66	M	Former	80%/2+	23%	Detection failure	3	PD	102	102
Case-14	39	M	Never	50%/3+	NI	Detection failure	2	SD	171	171
Case-37	60	M	Former	80%/2+	72%	Detection failure	2	SD	169	181
Case-04	82	F	Never	80%/2+	51%	Detection failure	1	SD	107	191
Case-12	38	M	Former	100%/3+	57%	Detection failure *	3	PR	298	316
Case-07	81	M	Former	0%	17%	No fusion	1	PD	7	10
Case-43	54	F	Current	20%/1+	57%	No fusion	3	PD	30	30
Case-53	57	M	Former	80%/1+	32%	5'3' imbalance	2	PD	67	124
Case-42	71	F	Never	80%/3+	99%	5'3' imbalance	3	PR	416	429
Case-38	39	F	Never	80%/3+	71%	5'3' imbalance	2	PR	74	570

Case-23	59	F	Never	100%/3+	66%	KLC1-ALK	2	PD	57	113
Case-02	73	F	Former	80%/2+	57%	KLC1-ALK	2	SD	246	314
Case-10	60	F	Never	80%/3+	20%	EML4(6)-ALK(20)(v3a and v3b)	4	PR	202	230
Case-51	63	M	Never	80%/2+	76%	EML4(6)-ALK(20) (v3a)	3	SD	97	97
Case-34	51	M	Former	50%/3+	26%	EML4(6)-ALK(20) (v3a)	3	PR	143	152
Case-41	59	F	Never	80%/3+	79%	EML4(6)-ALK(20) (v3a)	3	SD	166	200
Case-05	75	F	Former	80%/2+	37%	EML4(6)-ALK(20) (v3a)	1	SD	182	201
Case-16	46	M	Never	90%/2+	NI	EML4(6)-ALK(20) (v3a)	2	PR	300	373
Case-08	33	F	Former	90%/3+	57%	EML4(6)-ALK(20) (v3a)	4	PR	337	378
Case-33	23	M	Never	90%/3+	1.5%	EML4(20)-ALK(20) (v2)	2	PR	481	481
Case-15	86	F	Never	80%/2+	19%	EML4(13)-ALK(20) (v1)	2	PD	47	47
Case-29	79	F	Never	30%/1+	37%	EML4(13)-ALK(20) (v1)	1	SD	48	80
Case-35	49	F	Never	90%/2+	93%	EML4(13)-ALK(20) (v1)	2	PR	148	148 (ongoing)
Case-45	61	F	Never	50%/1+	54%	EML4(13)-ALK(20) (v1)	2	PR	314	510
Case-19	41	M	Never	70%/3+	53%	EML4(13)-ALK(20) (v1)	3	PR	372	1911 (ongoing)

*: an *EML4(6)-ALK(20)* (v3a/b) transcript was detected by real-time RT-PCR

F; female, M; male, NI, not interpretable, IHC; immunohistochemistry, FISH; fluorescent in situ hybridization, PD; progressive disease, SD; stable disease, PR; partial response, PFS; progression-free survival, DoT; duration of treatment.

Figure S1: Sensitivity (Se) and specificity (Spe) of the RNA-seq technique vs FISH or IHC Se and Spe of RNA-seq for *ALK* rearrangements detection different positivity thresholds for ALK FISH (A and B) and ALK IHC (C and D)

A)

RNA-sequencing results	ALK FISH positive (FISH >15%)	ALK FISH negative (FISH <15%)
Positive	29	1
Negative	6	18
Total	35	19
	Se = 82.9%	Spe = 94.7%

B)

RNA-sequencing results	ALK FISH positive (FISH >20%)	ALK FISH negative (FISH <20%)
Positive	27	3
Negative	2	22
Total	29	25
	Se = 93.1%	Spe = 88%

C)

RNA-sequencing results	ALK IHC positive (IHC > 0)	ALK IHC negative (IHC = 0)
Positive	32	0
Negative	6	19
Total	38	19
	Se = 84.2%	Spe = 100%

D)

RNA-sequencing results	ALK IHC positive (IHC ≥ 50% 1+)	ALK IHC negative (IHC < 50% 1+)
Positive	30	2
Negative	2	23
Total	32	25
	Se = 93.8%	Spe = 92%

Figure S2

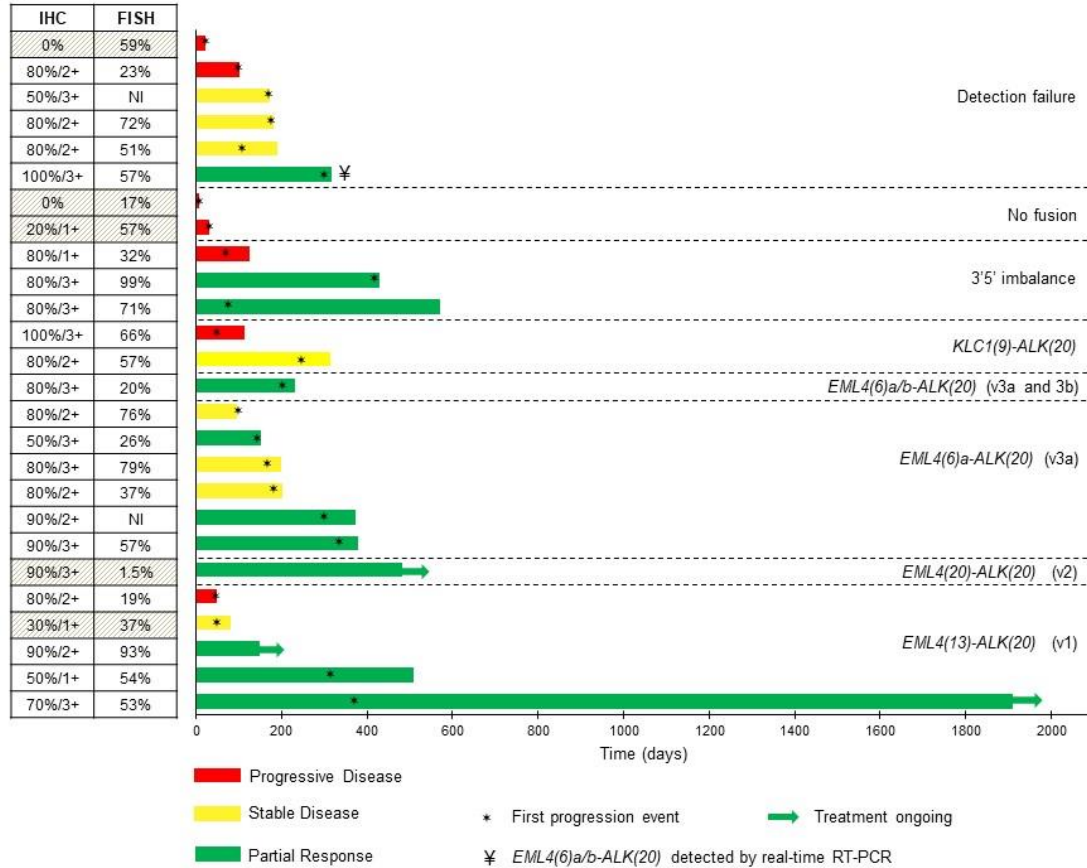


Figure S2: Individual duration of treatment and response to crizotinib according to RNA-sequencing results.

Details of ALK immunohistochemistry and FISH results are given for each case. Each plot corresponds to the duration of treatment with crizotinib and the * symbol represents the first progression event according to RECIST 1.1. The color of the plot represents the best response with crizotinib according to RECIST 1.1. The arrows indicate patients who were still receiving crizotinib at the time of data cutoff. The ‘detection failure’ group corresponds to cases with RNA concentration <0.02ng/μL (n=4) or unquantifiable cDNA libraries (n=2).

b. Article 2 (Duruiseaux et al)

Lack of effectiveness of crizotinib and ceritinib for the treatment of two cases of lung adenocarcinoma with KLC1-ALK rearrangement

Michaël Duruiseaux¹, Julian Pinsolle^{1,2}, Lidia Petit, Maximin Laetitia, Julie Mondet, Sylvie Lantuejoul⁴, Denis Moro-Sibilot^{1,3,4}, Anne McLeer-Florin^{2,3,4}

¹Thoracic Oncology Unit, Respiratory Medicine Department, CHU Grenoble Alpes, Grenoble, France

²Cancer Molecular Genetics Platform, Biology and Pathology Institute, CHU Grenoble Alpes, Grenoble, France

³UGA/INSERM U1209/CNRS 5309, Institute for Advanced Biosciences, Grenoble, France

⁴Grenoble Alpes University, Grenoble, France

Corresponding author:

Anne McLeer-Florin: UF Pathologie moléculaire, Plateforme hospitalière de Génétique Moléculaire des Cancers, Département d'anatomie et cytologie pathologiques, Institut de Biologie et de Pathologie, CHU A Michallon, CS 10217 38043 Grenoble Cedex 9 FRANCE

Tel: +33476766309, Fax: +33476765949. AMcleer@chu-grenoble.fr

Take-Home Message

We report shorter clinical benefit than expected with crizotinib and ceritinib in two *KLC1-ALK*-positive lung cancers.

To the Editor:

At least 22 non-*EML4* partner genes have been described in *ALK*-rearranged non-small cell lung cancer (NSCLC). Very few data about sensitivity to *ALK* tyrosine kinase inhibitors (*ALK*-TKI) in the clinic are available in non-*EML4-ALK*-positive NSCLC although partial responses to crizotinib are reported. We report for the first time clinical outcomes with crizotinib then ceritinib after chemotherapy failure in two cases of NSCLC with a *KLC1-ALK* rearrangement. The clinical course of these two cases is depicted in Figure 1.

Case 1 was a 59 year-old non-smoking woman with lung adenocarcinoma of the left upper lung, a metastatic right axillary mass and a metastasis of the cerebral falx. The tumor was *ALK*-positive according to IHC (3+/100% of positive cells) and FISH (66% of nuclei with isolated 3' signals), negative for *EGFR/KRAS/HER2/BRAF* mutations by pyrosequencing. A fusion between exon 9 of *KLC1* and exon 20 of *ALK* (*KLC1*(9)-*ALK*(20) transcript) was identified by mean of an amplicon-based parallel sequencing using the RNA Fusion Lung Cancer Research Panel on an Ion PGM system (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). After one platinum-pemetrexed cycle, she presented an oculomotor nerve palsy revealing a central nervous system (CNS) disease progression associated to the occurrence of a right pleural effusion. Crizotinib 250mg twice daily was started. The cerebral falx mass progressed at week 9 with worsening of surrounding edema whereas the extra-CNS disease improved.

She received whole brain radiotherapy achieving CNS disease stabilization. Crizotinib treatment was discontinued at week 17 because of thoracic progression. Ceritinib 750mg/day was started but she died of a respiratory failure due to thoracic progression after five days of treatment.

Case 2 was a 74 year-old non-smoking woman with *ALK*-positive lung adenocarcinoma (3+/80% *ALK* expression by IHC, 57% positive nuclei by FISH with isolated 3' signals) with bilateral lung metastasis, mediastinal involvement and metastatic right pleural effusion. The tumor was negative for *EGFR/KRAS/HER2/BRAF* mutations by pyrosequencing. A *KLC1(9)-ALK(20)* fusion was identified by the RNA Fusion Lung Cancer Research Panel. A partial response was obtained with four cycles of carboplatin-pemetrexed with significant tumor shrinkage. New micronodules eventually appeared in the right lung following four cycles of maintenance pemetrexed. She received crizotinib 250mg twice daily with disappearance of the new lesions and stability of other lesions resulting in stable disease. After eight months, a severe neuralgia in left D1-D2 territory associated to with neck pain rapidly occurred, corresponding to a nodule in D1-D2 left intervertebral foramen and a peri-vertebral and leptomeningeal tumor infiltration from C8 to D2 on spine MRI. A palliative irradiation was undertaken. Crizotinib was discontinued during radiotherapy and resume as non-CNS disease was still controlled. After ten months of crizotinib, the patient experienced a disease progression in the thorax. Crizotinib was discontinued and ceritinib 750mg/day started. Her general condition worsened despite ceritinib treatment and she died at home after 7 weeks of treatment before the first planned evaluation.

Crizotinib has demonstrated its efficacy in first- and second-line settings, with objective response rates ranging from 65% to 74% and median progression-free survival (PFS) of 7.7 to 10.9 months [1, 2]. Ceritinib is a second-generation ALK-TKI which provides response rates ranging from 39 to 56% and median PFS of 5.4 to 6.9 months after crizotinib failure [3–5]. A wide range of clinical benefit with ALK-TKI are observed and specific *ALK* fusion variants could drive this variability [6, 7].

We report the clinical efficacy of ALK-TKI in two *KLC1(9)-ALK(20)*-rearranged lung adenocarcinomas. We suggest that *KLC1-ALK*-positive NSCLC may have a shorter clinical benefit than expected with crizotinib followed by ceritinib. Gainor et al. reported a median combined PFS of 17.4 months and a median OS from diagnosis of 49.4 months with crizotinib then ceritinib sequential treatment, which are far better numbers than observed in our two cases (combined PFS of 2.2 and 10.25 months, OS of 5.25 and 17.75 months) [8].

The biological explanation of a putative lack of efficacy of crizotinib and ceritinib is unknown. No in vitro sensitivity assay to ALK-TKI has been reported to date in *KLC1-ALK*-positive models [9]. We were not able to rule out the emergence of resistance mutation to crizotinib predictive of ceritinib lack of efficacy as no rebiopsy was available at relapse.

We suggest that crizotinib followed by ceritinib may not be the best strategy to treat *KLC1-ALK*-positive NSCLC. The second-generation ALK-TKI alectinib has recently proven its superiority to crizotinib as front-line treatment, but 20 to 25% of the patients still experience a progression within the first 6 months of treatment [10]. It will be highly valuable to know if specific *ALK* variants are over-represented in this early progressor population, and especially *KLC1-ALK* variants. More pre-clinical

and clinical data are needed to elucidate the impact of *ALK* variants in *ALK*-positive NSCLC biology and response to *ALK*-TKI.

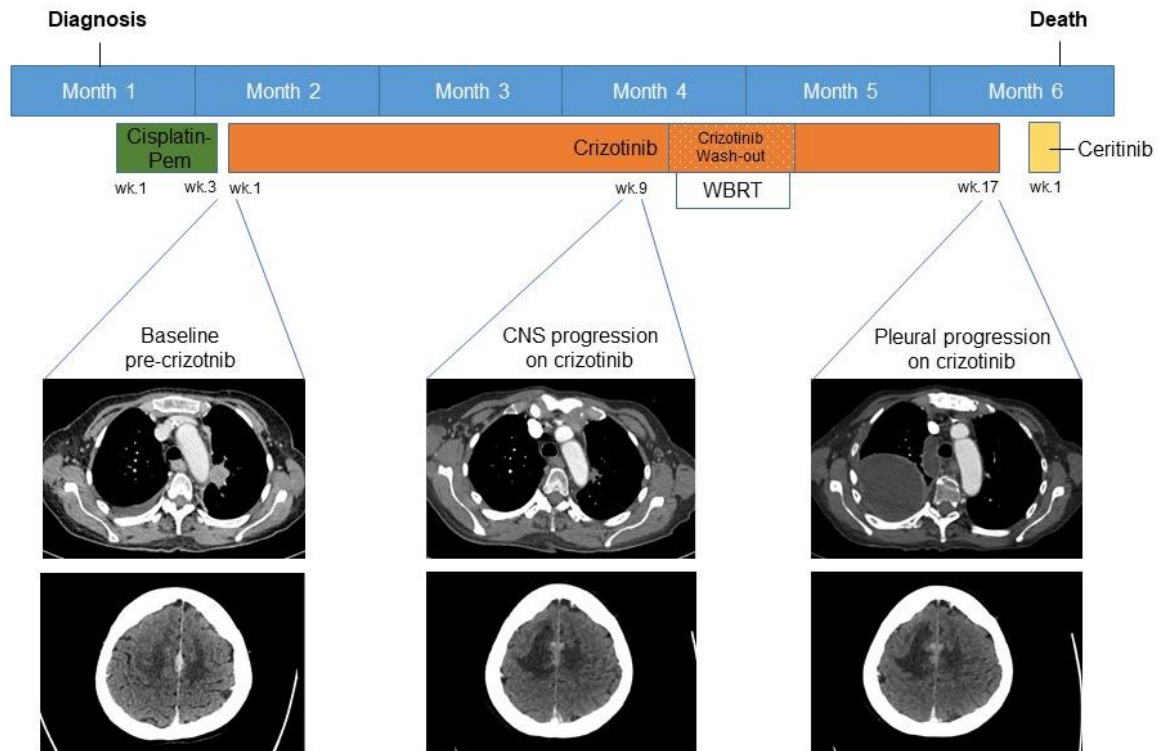
References

1. Shaw AT, Kim D-W, Nakagawa K, Seto T, Crinó L, Ahn M-J, De Pas T, Besse B, Solomon BJ, Blackhall F, Wu Y-L, Thomas M, O'Byrne KJ, Moro-Sibilot D, Camidge DR, Mok T, Hirsh V, Riely GJ, Iyer S, Tassell V, Polli A, Wilner KD, Jänne PA. Crizotinib versus chemotherapy in advanced *ALK*-positive lung cancer. *N. Engl. J. Med.* 2013; 368: 2385–2394.
2. Solomon BJ, Mok T, Kim D-W, Wu Y-L, Nakagawa K, Mekhail T, Felip E, Cappuzzo F, Paolini J, Usari T, Iyer S, Reisman A, Wilner KD, Tursi J, Blackhall F, PROFILE 1014 Investigators. First-line crizotinib versus chemotherapy in *ALK*-positive lung cancer. *N. Engl. J. Med.* 2014; 371: 2167–2177.
3. Crinò L, Ahn M-J, De Marinis F, Groen HJM, Wakelee H, Hida T, Mok T, Spigel D, Felip E, Nishio M, Scagliotti G, Branle F, Emeremni C, Quadrigli M, Zhang J, Shaw AT. Multicenter Phase II Study of Whole-Body and Intracranial Activity With Ceritinib in Patients With *ALK*-Rearranged Non-Small-Cell Lung Cancer Previously Treated With Chemotherapy and Crizotinib: Results From ASCEND-2. *J. Clin. Oncol.* 2016; 34: 2866–2873.
4. Kim D-W, Mehra R, Tan DSW, Felip E, Chow LQM, Camidge DR, Vansteenkiste J, Sharma S, De Pas T, Riely GJ, Solomon BJ, Wolf J, Thomas M, Schuler M, Liu G, Santoro A, Sutradhar S, Li S, Szczudlo T, Yovine A, Shaw AT. Activity and safety of ceritinib in patients with *ALK*-rearranged non-small-cell lung cancer (ASCEND-1): updated results from the multicentre, open-label, phase 1 trial. *Lancet Oncol.* 2016; 17: 452–463.
5. Shaw AT, Kim TM, Crinò L, Gridelli C, Kiura K, Liu G, Novello S, Bearz A, Gautschi O, Mok T, Nishio M, Scagliotti G, Spigel DR, Deudon S, Zheng C, Pantano S, Urban P, Massacesi C, Viraswami-Appanna K, Felip E. Ceritinib versus chemotherapy in patients with *ALK*-rearranged non-small-cell lung cancer previously given chemotherapy and crizotinib (ASCEND-5): a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2017; .
6. Woo CG, Seo S, Kim SW, Jang SJ, Park KS, Song JY, Lee B, Richards MW, Bayliss R, Lee DH, Choi J. Differential protein stability and clinical responses of *EML4-ALK* fusion variants to various *ALK* inhibitors in advanced *ALK*-rearranged non-small cell lung cancer. *Ann. Oncol.* 2016; .
7. Yoshida T, Oya Y, Tanaka K, Shimizu J, Horio Y, Kuroda H, Sakao Y, Hida T, Yatabe Y. Differential Crizotinib Response Duration Among *ALK* Fusion Variants in *ALK*-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer. *J. Clin. Oncol.* 2016; 34: 3383–3389.

8. Gainor JF, Tan DSW, De Pas T, Solomon BJ, Ahmad A, Lazzari C, de Marinis F, Spitaleri G, Schultz K, Friboulet L, Yeap BY, Engelman JA, Shaw AT. Progression-Free and Overall Survival in ALK-Positive NSCLC Patients Treated with Sequential Crizotinib and Ceritinib. *Clin. Cancer Res.* 2015; 21: 2745–2752.
9. Togashi Y, Soda M, Sakata S, Sugawara E, Hatano S, Asaka R, Nakajima T, Mano H, Takeuchi K. KLC1-ALK: a novel fusion in lung cancer identified using a formalin-fixed paraffin-embedded tissue only. *PLoS ONE* 2012; 7: e31323.
10. Peters S, Camidge DR, Shaw AT, Gadgeel S, Ahn JS, Kim D-W, Ou S-HI, Pérol M, Dziadziuszko R, Rosell R, Zeaiter A, Mitry E, Golding S, Balas B, Noe J, Morcos PN, Mok T, ALEX Trial Investigators. Alectinib versus Crizotinib in Untreated ALK-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer. *N. Engl. J. Med.* 2017; .

a)

CASE 1



b)

CASE 2

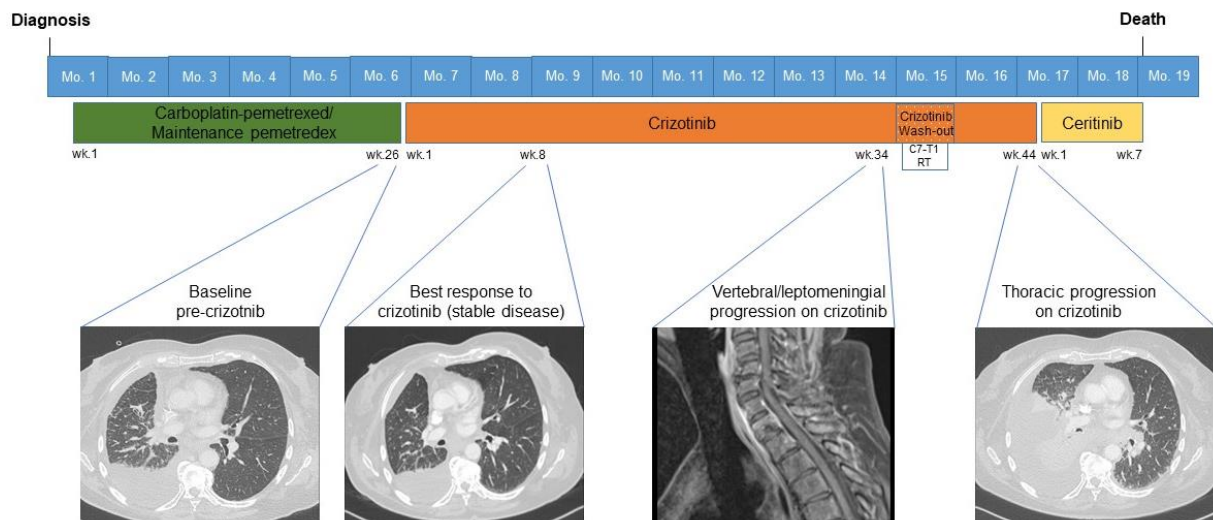


Figure 1: Clinical course of the two *KLC1-ALK* rearranged lung cancers. a) Clinical course of Case 1. b) Clinical course of Case 2.

Pem = pemetrexed; WBRT = whole brain radiotherapy ; RT = radiotherapy

c. Article 3 (Pinsolle et al)

A novel fusion of *CLIP1* and *ALK* in a case of a lung carcinoma with neuroendocrine features

Julian Pinsolle, MSc¹, Michael Duruisseaux, MD, PhD^{1,2}, Nelly Magnat, MSc³, Ségolène d'Alnoncourt, MD^{3,4}, Elisabeth Brambilla, MD, PhD^{2,5}, Anne McLeer-Florin, PhD^{2,3,4,5}

¹Clinique Universitaire de Pneumologie, Pôle Thorax et Vaisseaux, CHU Grenoble Alpes, CS 10217, 38043 Grenoble, France

²UGA/INSERM U1209/CNRS 5309-Institute for Advanced Biosciences - Université Grenoble Alpes, Grenoble

³Plateforme de Génétique Moléculaire des Cancers, Pôle de Biologie et Pathologie, CHU Grenoble Alpes, Grenoble

⁴Département d'Anatomie et Cytologie Pathologiques, Pôle de Biologie et Pathologie, CHU Grenoble Alpes, Grenoble

⁵Université Grenoble Alpes, Grenoble

Corresponding author: Julian PINSOLLE, Clinique de Pneumologie, Unité d'Oncologie Thoracique, Pôle Thorax et Vaisseaux, CHU Grenoble Alpes, Grenoble

E-mail: jpinsolle@chu-grenoble.fr

E-mail addresses:

Julian PINSOLLE: jpinsolle@chu-grenoble.fr

Michael DURUISSEAU: michaelduruisseaux@gmail.com

Nelly MAGNAT : nmagnat@chu-grenoble.fr

Ségolène D'ALNONCOURT : SDalnoncourt@chu-grenoble.fr

Elisabeth BRAMBILLA : EBrambilla@chu-grenoble.fr

Anne MCLEER-FLORIN: AMcLeer@chu-grenoble.fr

Grants and funding

MD was the recipient of the IFCT (Intergroupe Francophone de Cancérologie Thoracique) Alain Depierre Grant in 2014.

JP was the recipient of the ARISTOT (Association de Recherche, d'Information Scientifique et Thérapeutique en Oncologie Thoracique) grant in 2016.

This work received funding from the Grenoble-Alpes University Hospital (DRCI REALK project) and from the French *Institut National du Cancer* (INCa).

Conflicts of interest

AMF has received research funding from Pfizer. She has been reimbursed for travel, accommodation, and/or other expenses by ThermoFisher, ZytoVision/Clinisciences, Astra-Zeneca, Novartis, Pfizer and Roche and has served as a consultant (advisory board) for Novartis.

MD has received research funding from Novartis and Pfizer. He has been reimbursed for travel, accommodation, and/or other expenses by Novartis, Pfizer and Roche.

All other authors declared no conflict of interest regarding the present work.

Abstract

ALK rearrangements are found in 5% of lung adenocarcinomas but have been rarely described in pulmonary neuroendocrine carcinomas. A 71-year-old caucasian non-smoker woman presented a non-small cell lung cancer (NSCLC) with neuroendocrine features associated with node, adrenal and bone metastases. This tumor was negative for *EGFR*, *KRAS*, *BRAF*, *ERBB2* activating mutations but was positive for *ALK* immunohistochemistry (80% 2+) and fluorescent in situ hybridization-positive (86.1% positive cells). An amplicon-based RNA-parallel sequencing assay detected the presence of an *ALK* rearrangement without identifying the fusion transcript present. An anchored multiplex PCR associated to RNA-sequencing was performed and allowed the identification of a novel fusion transcript between exon 12 of *CLIP1* and exon 20 of *ALK*. Unfortunately, the clinical response to *ALK* inhibitors of this novel variant could not be assessed since the patient died before any treatment could be given.

Key words: lung cancer, neuroendocrine carcinoma, *ALK* rearrangement, *CLIP1*, fusion variants, RNA-sequencing, NGS

Abbreviations: *ALK*: Anaplastic Lymphoma Kinase, *BRAF*: B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase, *CLIP1*: CAP-Gly domain containing linker protein 1, CT: computed-tomography, *EGFR*: Epidermal Growth Factor Receptor, *ERBB2*: erb-b2 receptor tyrosine kinase 2, *KRAS*: v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog, FISH: Fluorescent In Situ Hybridization, IHC: immunohistochemistry, MIB1: mindbomb E3 ubiquitin protein ligase 1, NGS: next-generation sequencing, NSCLC: non-small cell lung cancer, RNA-seq: RNA sequencing, TTF1: thyroid transcription factor-1

Case presentation

A 71-year-old non-smoker woman, without comorbidity, was referred to our hospital for chronic S1 radiculopathy. Spine magnetic resonance imaging showed a nodular infiltration of all vertebrae. Body computed tomography (CT) showed a 16-mm nodule in the left upper lobe, multiple mediastinal and left hilar adenopathies, a tissue nodule in the right adrenal gland and several condensing bone lesions (left collarbone, sternum, ribs, right femur and vertebrae) suggesting diffuse bone metastases. CT-scan of the brain and positron emission tomography were not performed. Bronchial endoscopy showed a lesion in the apical segmental bronchus of the upper right lung. Bronchial biopsies demonstrated a non-small cell lung cancer (NSCLC) with neuroendocrine features. Indeed, this tumor was negative for TTF1 (thyroid transcription factor-1) and p40, MIB1 (mindbomb E3 ubiquitin protein ligase 1) was present in at 10% of tumor cells, eliminating a small cell carcinoma, synaptophysin and chromogranin were positive but CD56 was negative (Figure 1). Due to the very small size of the sample, a diagnosis of large cell neuroendocrine carcinoma could neither be confirmed nor overruled. The tumor was negative for *EGFR*, *KRAS*, *BRAF*, *ERBB2* activating mutations. *ALK* immunohistochemistry (5A4 clone) was positive in 80% of tumor cells with a staining intensity of 2+. *ALK* break-apart FISH (ALK Break-Apart Dual Color Probe, ZytoLight, Clinisciences, Nanterre, France) showed split 3' and 5' signals in 86.1% of the nuclei analyzed (Figure 2A). A 3'5' *ALK* imbalance was detected with RNA-next generation sequencing (NGS) using the Ion AmpliSeq™ RNA Lung Fusion Cancer Research Panel (ThermoFisher, France), indicating the presence of a fusion with an unknown partner or a fusion not included in the panel. An anchored PCR method (Archer™ FusionPlex *ALK*, *RET*, *ROS1* v2 for Ion Torrent™ kit, ArcherDx, USA) was therefore combined to the RNA-NGS to identify the *ALK* fusion partner¹. This method allows the identification of an unknown sequence (*ALK* fusion partner) adjacent to a known sequence (*ALK* kinase domain). Briefly,

after double stranded cDNA synthesis, a first PCR is performed, using an *ALK*-specific primer and a second primer complementary to a universal adapter ligated to the fusion partner. A second nested PCR is then performed with an *ALK*-specific primer closer to the fusion point, leading to target amplicons ready for clonal amplification and sequencing. The results were analyzed with the online software provided by Archer (Archer Analysis 5.0, ArcherDx, Boulder, CO, USA) and allowed us to identify a fusion involving the *CLIP1* (*CAP-Gly domain containing linker protein 1*) and *ALK* genes. More specifically, this fusion involved exon 12 of *CLIP1* and exon 20 of *ALK* (Figure 2B).

Discussion

A fusion between intron 13 of *CLIP1* and exon 20 of *ALK* has been previously described in cutaneous Spitz tumor², a subgroup of melanocytic neoplasms, but this is the first report of an *ALK* rearrangement with *CLIP1* in NSCLC. Among 120 samples that we tested by NGS, this is the only case harboring this *ALK* partner. Interestingly, this fusion includes the entire kinase domain of *ALK* which is essential for the constitutive activation of the fusion protein and therefore the acquisition of oncogenic properties by the tumor cells³. Similarly to EML4, CLIP1 is a microtubule-associated protein which links endocytic vesicles to microtubules⁴. A critical role of CLIP has also been shown in tumor angiogenesis⁵.

Pulmonary large-cell neuroendocrine carcinoma (PLCNC) is a part of pulmonary neuroendocrine carcinomas with small-cell lung cancer and carcinoid⁶. Molecular profiling of different PLCNC cohorts have shown a scarce rate of *ALK* rearrangements, lower than in lung adenocarcinomas⁷⁻¹¹. It seems that these particular histological subtypes could be associated with a lower efficacy of crizotinib. Indeed, Omachi et al¹² reported a case of lung large-cell neuroendocrine carcinoma harboring an *ALK* rearrangement, which progressed only after 6 weeks of crizotinib. Furthermore, two cases of transformation from *ALK*-positive lung

adenocarcinoma to ALK-positive sarcomatoid carcinoma or NSCLC with neuroendocrine phenotype suggested that these morphological modifications could be a resistance mechanism to ALK inhibitors^{13,14}. Similarly, in *EGFR*-mutated NSCLC, tumor transformation into non-small cell cancer was described as a resistance mechanism to EGFR inhibitors¹⁵ but it has never been reported for ALK-positive tumors. Unfortunately, in the present case, the patient died before any anti-ALK treatment could be initiated because of clinical worsening due to cancer progression.

Numerous *ALK* fusion transcripts have been described, corresponding to different gene breakpoints in different *ALK* fusion partners, and their identification could be significant for cancer treatment as demonstrated in vitro¹⁶ but also in a clinical setting. Indeed, two studies recently showed a trend towards a better crizotinib sensitivity for *EML4-ALK* variant 1 and 2 compared to *EML4-ALK* variant 3, but to date no statistically significant results have been obtained on the response to crizotinib of non-*EML4-ALK* variants^{17,18}.

Funding sources

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

References

1. Zheng, Z. *et al.* Anchored multiplex PCR for targeted next-generation sequencing. *Nat. Med.* **20**, 1479–1484 (2014).
2. Yeh, I. *et al.* Clinical, Histopathologic, and Genomic Features of Spitz Tumors With ALK Fusions: *Am. J. Surg. Pathol.* **39**, 581–591 (2015).
3. Lin, J. J., Riely, G. J. & Shaw, A. T. Targeting ALK: Precision Medicine Takes on Drug Resistance. *Cancer Discov.* **7**, 137–155 (2017).
4. Pierre, P., Scheel, J., Rickard, J. E. & Kreis, T. E. CLIP-170 links endocytic vesicles to microtubules. *Cell* **70**, 887–900 (1992).

5. Sun, X. *et al.* Regulation of tumor angiogenesis by the microtubule-binding protein CLIP-170. *Protein Cell* **4**, 266–276 (2013).
6. Travis, W. D. *et al.* The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors. *J. Thorac. Oncol.* **10**, 1243–1260 (2015).
7. Rekhtman, N. *et al.* Distinct profile of driver mutations and clinical features in immunomarker-defined subsets of pulmonary large-cell carcinoma. *Mod. Pathol.* **26**, 511–522 (2013).
8. Rossi, G. *et al.* Large cell carcinoma of the lung: clinically oriented classification integrating immunohistochemistry and molecular biology. *Virchows Arch.* **464**, 61–68 (2014).
9. Gainor, J. F. *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.* **19**, 4273–4281 (2013).
10. Karlsson, A. *et al.* Mutational and gene fusion analyses of primary large cell and large cell neuroendocrine lung cancer. *Oncotarget* **6**, 22028–22037 (2015).
11. Lou, G., Yu, X. & Song, Z. Molecular Profiling and Survival of Completely Resected Primary Pulmonary Neuroendocrine Carcinoma. *Clin. Lung Cancer* **18**, e197–e201 (2017).
12. Omachi, N. *et al.* A case of large-cell neuroendocrine carcinoma harboring an EML4-ALK rearrangement with resistance to the ALK inhibitor crizotinib. *J. Thorac. Oncol. Off. Publ. Int. Assoc. Study Lung Cancer* **9**, e40–42 (2014).
13. Kobayashi, Y. *et al.* Transformation to sarcomatoid carcinoma in ALK-rearranged adenocarcinoma, which developed acquired resistance to crizotinib and received subsequent chemotherapies. *J. Thorac. Oncol. Off. Publ. Int. Assoc. Study Lung Cancer* **8**, e75–78 (2013).
14. Caumont, C. *et al.* Neuroendocrine phenotype as an acquired resistance mechanism in ALK-rearranged lung adenocarcinoma. *Lung Cancer* **92**, 15–18 (2016).
15. Sequist, L. V. *et al.* Genotypic and Histological Evolution of Lung Cancers Acquiring Resistance to EGFR Inhibitors. *Sci. Transl. Med.* **3**, 75ra26–75ra26 (2011).
16. Heuckmann, J. M. *et al.* Differential Protein Stability and ALK Inhibitor Sensitivity of EML4-ALK Fusion Variants. *Clin. Cancer Res.* **18**, 4682–4690 (2012).
17. Yoshida, T. *et al.* Differential Crizotinib Response Duration Among ALK Fusion Variants in ALK-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer. *J. Clin. Oncol.* **34**, 3383–3389 (2016).
18. Woo, C. G. *et al.* Differential protein stability and clinical responses of *EML4-ALK* fusion variants to various ALK inhibitors in advanced *ALK* -rearranged non-small cell lung cancer. *Ann. Oncol.* mdw693 (2016). doi:10.1093/annonc/mdw693

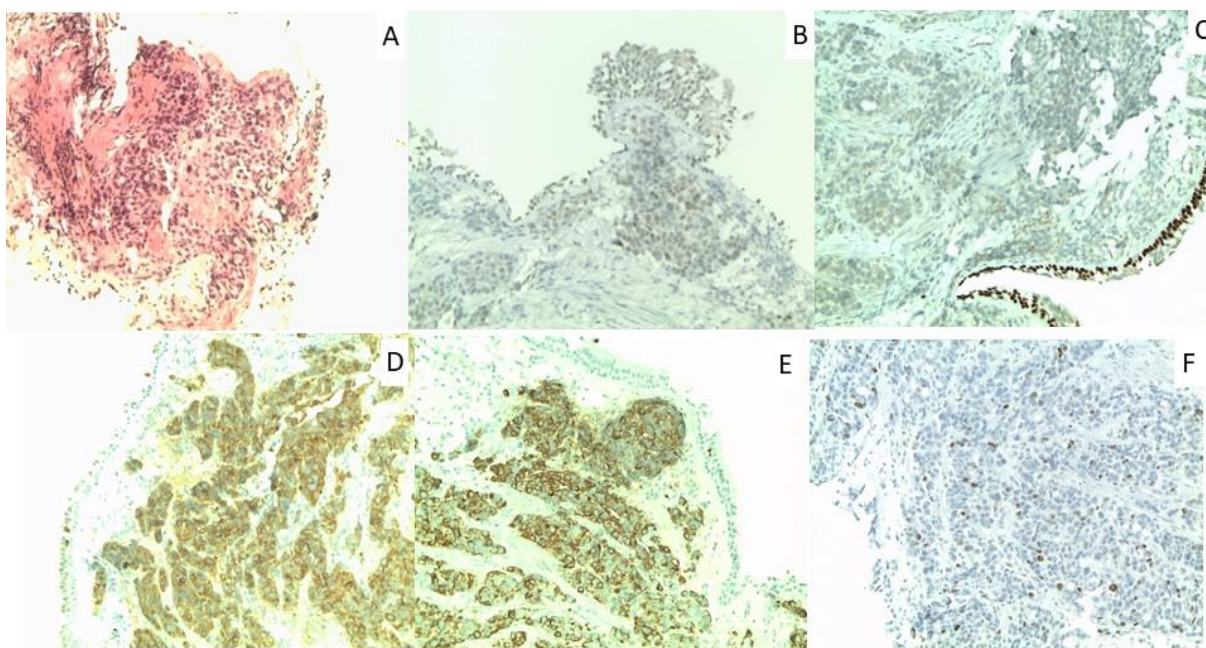


Figure 1. Tumor slides under a light microscope X20. (A) Hematoxylin, eosin and saffron stain. (B) Negative TTF1 immunohistochemistry. (C) Negative P40 immunohistochemistry. (D) Positive synaptophysin immunohistochemistry. (E) Positive chromogranin immunohistochemistry. (F) MIB1 immunostaining under 50%.

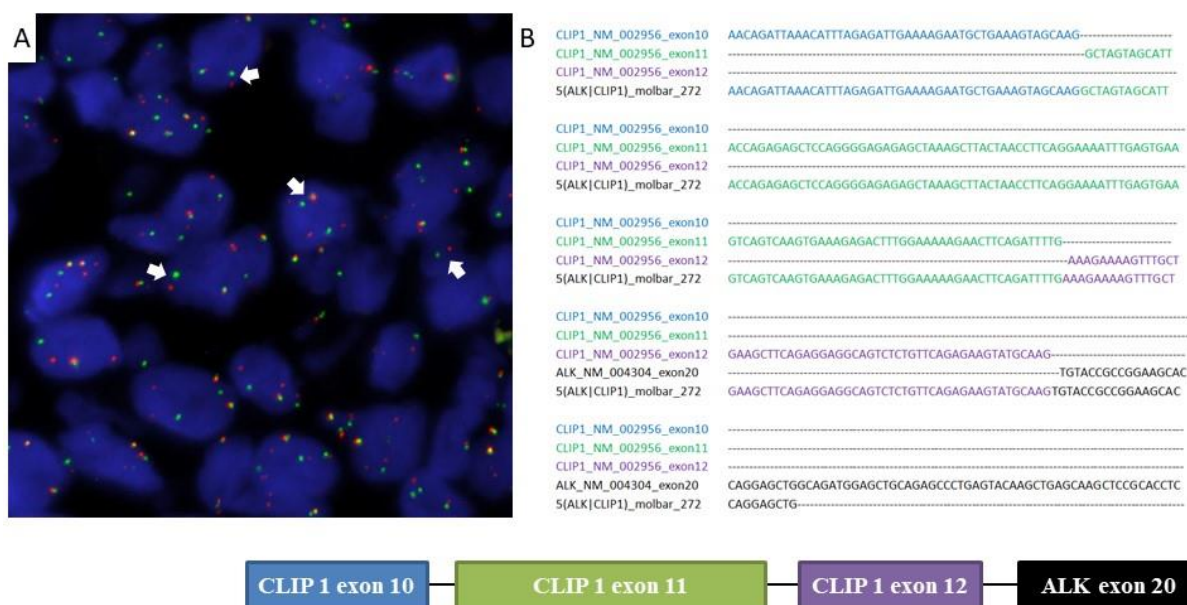


Figure 2. (A) *ALK* fluorescence *in situ* hybridisation (FISH) signals. Tumour nuclei hybridised with the ZytoLight® SPEC *ALK* Dual Color Break Apart Probe. Rearranged *ALK* is indicated by split 3' (green) and 5' (red) signals (white narrows). (B) Consensus sequence of *CLIP1-ALK* (C12;A20), *CLIP1* exon 10 in blue, exon 11 in green and exon 12 in purple. *ALK* exon 20 in black.

3. Résultats

Dans notre première étude (article 1, McLeer-Florin et al), l'objectif était d'évaluer l'efficacité du RNA-seq pour le diagnostic des réarrangements *ALK* par rapport à l'algorithme habituel utilisant l'IHC puis la FISH, au sein d'une cohorte de 76 échantillons de CPNPC. Le RNA-seq a été concluant dans 75% des cas et a démontré une sensibilité de 80% et une spécificité de 100% en comparaison à la combinaison diagnostique associant IHC et FISH. Parmi les échantillons positifs en IHC et en FISH qui étaient analysables, l'ensemble des résultats du RNA-seq concordait avec ceux de la FISH et de l'IHC. Le RNA-seq s'est avéré également être une très bonne technique de recours pour les échantillons considérés comme « douteux » ou « équivoques » en IHC et/ou en FISH (groupe 2) puisqu'il a permis de confirmer ou non la présence d'un réarrangement dans chaque cas. Concernant les cas discordants entre la FISH et l'IHC (groupe 3), 30% des échantillons ont pu être analysés en RNA-seq.

La majorité des variants de fusion décrits dans notre cohorte résultait d'un réarrangement entre *ALK* et *EML4*, en particulier le variant 1 (*EML4(13)-ALK(20)*). Sur les 76 patients de la cohorte, 26 patients ont été traités par crizotinib, et le lien entre la nature du variant et la réponse au traitement a pu être étudié. Ainsi, les patients arborant un variant 1 et 2 d'*EML4-ALK* ont présenté une survie sans progression médiane de 314 jours contre 192 jours pour ceux exprimant un variant *EML4-ALK* 3a/b ($p = 0,1743$).

Dans la seconde étude présentée (article 2, Duruisseaux et al), les résultats cliniques des deux patients présentant un réarrangement *KLC1(9)-ALK(20)* ont été détaillés. Ces deux patients ont été traités successivement par crizotinib puis ceritinib après une première ligne de chimiothérapie et ont présenté une survie sans progression de 2,2 et 10,25 mois ainsi qu'une survie globale de 5,25 et 17,75 mois.

Dans le dernier article (article 3, Pinsolle et al), le but était d'améliorer l'efficacité du RNA-seq en le couplant à une PCR ancrée multiplexe. Les deux intérêts de cette technique résident dans sa capacité à mieux cibler la zone de fusion au sein de nos échantillons et dans la possibilité de détecter des transcrits de fusion inconnus. Cette méthode a été testée sur 10 échantillons dont le résultat en RNA-seq n'était pas totalement concluant (déséquilibre 5'3' ou échec de la technique). Parmi ces 10 échantillons en échec après RNA-seq, l'ajout des étapes de PCR ancrée multiplexe a autorisé l'identification de 3 transcrits de fusion. L'un d'eux, correspondant à la fusion entre l'exon 12 du gène *CLIP1* et l'exon 20 d'*ALK*, n'a jamais été décrit dans les CPNPC.

4. Discussion et perspectives

a. Evaluation de l'efficacité du RNA-seq dans la détection du réarrangement ALK

L'un des principaux intérêts de notre projet reste l'emploi d'une méthode NGS partant du transcriptome et basée sur une amplification par PCR multiplexe pour la mise en évidence de réarrangements du gène *ALK* dans les CPNPC. Contrairement à la FISH ou à l'IHC, cette technique autorise la détection d'un panel de gènes impliqués dans des réarrangements chromosomiques tels que *ALK*, *ROS1* ou *RET* dans les CPNPC et son efficacité dans cette indication a déjà été établie par des études récentes (36–38). Comparativement aux autres méthodes NGS, le RNA-Seq est plus rapide, moins coûteux et requiert une plus faible quantité de matériel génétique (10 ng d'ARN). Toutefois, il ne permet pas de rechercher en parallèle au cours du même test d'autres types d'anomalies. Un 2^e outil est donc nécessaire afin de diagnostiquer par exemple les mutations ponctuelles (insertions, délétions) ou les changements de nombre de copies (39).

Notre travail a montré une efficacité prometteuse du RNA-seq (article 1, Mcleer-Florin et al, en cours de soumission à Lung Cancer). En effet, sur l'ensemble de la cohorte étudiée, notre technique a été efficace dans 75% des cas, concluant à la présence ou à l'absence d'un réarrangement *ALK*. Parmi ces échantillons, un transcrit de fusion a été identifié dans 85% des cas, les 15% restants correspondaient à des déséquilibres 5'3' (confirmation d'un réarrangement sans que le transcrit de fusion ne soit trouvé). La sensibilité et la spécificité du RNA-seq étaient respectivement de 80 et 100% comparativement aux résultats combinés de la FISH et de l'IHC. La sensibilité a dépassé les 90% quand la technique était confrontée à la FISH ou à l'IHC prises séparément. Des résultats proches ont été décrits dans d'autres études employant le RNA-seq (36,37).

Un réarrangement a été détecté en RNA-seq au sein de tous les échantillons analysables du groupe 1, c'est-à-dire *ALK*-positifs en FISH et en IHC, aboutissant à une sensibilité et une spécificité de 100% pour ces échantillons. Au cours de notre étude, le RNA-seq a aussi démontré son efficacité sur les cas FISH « borderlines » ou IHC « équivoques » (groupe 2) puisque les 10 échantillons ont pu être analysés avec un diagnostic de réarrangement *ALK* confirmé ou infirmé dans 100% des cas. Toutefois, la technique ne s'est pas avérée aussi discriminante avec les échantillons discordants (groupe 3). En effet, 5 de ces 7 cas n'ont pu aboutir à des résultats concluants en RNA-seq du fait d'une très faible quantité d'ARN extraite. Comme constaté dans l'étude de Cabillic traitant de cas discordants, ce problème peut être en lien avec la multiplication des test antérieurs qui aurait pu « épuiser » le prélèvement (24). Nos échantillons provenant de laboratoires d'anatomopathologie différents, la variabilité des étapes pré analytiques selon le laboratoire (des temps variables de fixation des échantillons par exemple) pourrait également être en cause.

Dans la littérature, l'équipe de Pekar-Zlotin a utilisé une autre méthode NGS (Hybrid-capture-based comprehensive genomic profiling) afin de départager des résultats discordants entre

IHC et FISH (40). Dans cette étude, la technique NGS s'est avérée efficace pour ces cas discordants et a majoritairement infirmé les résultats de la FISH, confirmant l'existence de faux négatifs en FISH. L'analyse des réarrangements du gène *ALK* à partir de l'ADN semble donc se révéler plus robuste qu'à partir de l'ARN, mais avec un coût et une quantité de matériel biologique de départ beaucoup plus élevés (41–43).

Nous avons également constaté une bonne corrélation entre les résultats du RNA-seq et l'évolution des patients sous crizotinib. En effet, la survie sans progression médiane des 18 cas traités positifs en RNA-seq s'élève à 6 mois. Deux cas équivoques/borderlines en FISH et/ou en IHC (groupe 2) se sont avérés négatifs, sans fusion détectable, en NGS et n'ont pas présenté de réponse au traitement. De la même manière, Ali et al ont révélé par du NGS des cas faussement négatifs en FISH chez qui une réponse au crizotinib partielle voire complète a été observée au cours du suivi (44). Ces données indiquent d'une part l'efficacité et l'utilité du NGS dans les cas discordants notamment IHC-positifs mais FISH-négatifs et pointent, d'autre part, un taux non négligeable de faux-négatifs pour la FISH qui reste à ce jour la technique de référence pour le diagnostic des réarrangements *ALK*.

En accord avec les données de la littérature, les variants les plus fréquemment constatés au cours de notre travail étaient les transcrits *EML4-ALK* pour lesquels une majorité de réponses au crizotinib a été observée (20). Concernant les deux réarrangements impliquant *KLC1*, nos résultats montrent une efficacité moindre des anti-*ALK* (crizotinib puis ceritinib) par rapport aux éléments de la littérature (article 2, Duruisseaux et al, en cours de reviewing à European Respiratory Journal) (45,46). A ce jour, aucune donnée n'existe concernant une différence de survie entre les patients arborant un réarrangement *KLC1-ALK* comparés aux autres variants de fusion.

Le RNA-seq a été mis en échec par 6 échantillons parmi lesquels une seule réponse au crizotinib a été constatée (article 1). Sur ces 6 cas, 4 étaient pourtant formellement positifs en

FISH et IHC. Afin de mieux appréhender les causes de l'échec du RNA-seq et du traitement dans la plupart de ces cas, il pourrait être utile de déterminer le variant de fusion en cause via d'autres méthodes.

b. Mise en place d'une PCR ancrée multiplexe pour l'amélioration de l'efficacité du RNA-seq dans la détection du réarrangement ALK

La technique de PCR ancrée multiplexe couplée au RNA-seq paraît une très bonne alternative dans les cas d'échec du RNA-seq seul (article 3, Pinsolle et al). En effet, les PCR multiplexes « simples », employées dans le RNA-seq afin de sélectionner les zones de fusion, peuvent échouer et ne pas amplifier ces séquences d'intérêt. Dans ce cas, la fusion ne peut pas être mise en évidence par le séquençage, rendant un résultat faussement négatif. Autre situation d'échec : le transcrit de fusion peut ne jamais avoir été décrit auparavant et ne sera donc pas « reconnu » par les amorces des PCR. Dans ce type de cas, la PCR ancrée multiplexe a de grandes chances d'augmenter la sensibilité du RNA-seq puisqu'elle permet de mieux cibler la zone de fusion lors des étapes d'amplification et de détecter des transcrits de fusion inconnus (35). Testant ce protocole sur 10 échantillons ayant présenté un déséquilibre 5'3' ou un échec en RNA-seq, nous avons découvert 3 transcrits de fusion, attestant de l'efficacité de cette méthode. Parmi ces 3 variants détectés, un nouveau transcrit de fusion issu de la fusion d'*ALK* avec le gène *CLIP1* a été identifié. Ce réarrangement n'a jamais été décrit dans les CPNPC mais a déjà été mis en évidence au sein des tumeurs cutanées de Spitz (47). Malheureusement, la sensibilité de ce nouveau variant au crizotinib n'a pas pu être testée car la patiente est décédée avant qu'un traitement n'ait pu être initié.

Les différents tests que nous avons réalisés à l'aide de la PCR ancrée multiplex ont conclu à l'efficacité de cette technique dans les cas de déséquilibre 5'3' en NGS seul, où le réarrangement est mis en évidence mais sans caractérisation du transcrit de fusion. Toutefois, le recours à cette technique semble moins concluant dans les situations d'échec du NGS liés à

un défaut de librairie. En effet, ces situations d'échec sont dues à un défaut de qualité des acides nucléiques du matériel de départ, entraînant des difficultés pour les analyses ultérieures.

c. Corrélation entre la nature du variant de fusion et la réponse au crizotinib

Notre étude n'a pas mis en évidence de lien statistiquement significatif entre la réponse au crizotinib et la nature du variant de fusion *ALK*, du fait, d'un trop faible nombre de patients inclus dans les analyses (article 1). Toutefois, nous avons constaté une tendance à une survie sans progression allongée chez les patients porteurs d'un variant 1 ou 2 d'*EML4-ALK* comparés à ceux exprimant un variant *EML4-ALK* 3a/b. D'autres auteurs ont observé des résultats similaires (Tableau 1). En effet, l'équipe de Yoshida et al a mis en évidence une survie sans progression significativement plus longue chez les patients porteurs d'un réarrangement *EML4-ALK* variant 1 par rapport à ceux ayant tout autre variant *EML4-ALK* avec une différence de plus de 6 mois (48). De même, Woo et al ont établi une meilleure survie sans progression des patients traités par crizotinib et arborant un variant 1 ou 2 d'*EML4-ALK* comparés au groupe des patients porteurs d'un variant *EML4-ALK* 3a/b (49). Les résultats obtenus par deux autres études n'ont pas confirmé ces données mais ils n'étaient pas statistiquement significatifs (50,51). D'autres études incluant plus de patients traités et suivis restent donc à réaliser afin de confirmer ces données. En effet, la nature du variant de fusion pourrait être un marqueur biologique pronostique de la réponse au traitement. De plus, plusieurs traitements anti-*ALK* sont en cours de développement et devront également être testés dans ces études.

Plusieurs données biologiques appuient cette hypothèse clinique. Initialement, une étude in vitro a mis en évidence une sensibilité accrue au crizotinib des cellules exprimant le variant 2 d'*EML4-ALK* en comparaison à celles exprimant le variant 3b (52). De plus, les auteurs ont

Traitements (% patients)	Analyse	Effectif (n patients)	Ligne de traitement 1/2/3 (n patients)	Méthode	Variants testés	Variant le plus fréquent (%)	Survie sans progression médiane ou à 2 ans	Survie sans progression médiane ou à 2 ans des patients traités par crizotinib	Taux de réponse objective
Yoshida et al	Rétrospective	35	10/18/7	FISH IHC RTPCR	EML4-ALK v1 vs EML4-ALK non v1	EML4-ALK v1 (54)	médiane : EML4-ALK v1 > non v1 (11 mois [95% IC, 6,5-43] vs 4,2 mois [95% IC, 1,6-10,2] respectivement ; p < 0,05)	idem	EML4-ALK v1 > non v1 (74% vs 63% respectivement [p = 0,716])
Lei et al	Rétrospective	61	-	FISH IHC RACE	EML4-ALK v1 vs v3a/b vs autres variants moins fréquents	EML4-ALK v1 (36,1)	médiane : EML4-ALK v1 > v3a/b > autres (11,0 mois [95% IC, 5,5-16,5] vs 10,9 mois [95% IC, 5,9-15,8] vs autres 7,4 mois [95% IC, 3,2-11,6] respectivement ; p = 0,795)	idem	autres > EML4-ALK v1 > v3a/b (81% > 72,7% > 55,6% respectivement [χ^2 = 3,088 ; p = 0,214])
Woo et al	Rétrospective	54	21/15/18	FISH qPCR	EML4-ALK v3a/b vs v1/2/autres	EML4-ALK v3a/b (44,4)	SSP à 2 ans = EML4-ALK v1/2/autres > v3 (69% [95% IC 49,9-95,4] vs 32,7% [95% IC 15,6-68,4] respectivement ; p = 0,108)	SSP à 2 ans : EML4-ALK v1/2/autres > v3a/b (76% [95% IC 56,8-100] vs 26,4% [95% IC 10,5-66,6] respectivement ; p = 0,034)	EML4-ALK v1/2/autres vs v3 (82,1% vs 70,1% respectivement [p = 0,31])
Cha et al	Rétrospective	52	8/44	FISH IHC qPCR	EML4-ALK v1 vs v2 vs v3 vs non EML4 et EML4 vs non EML4	EML4-ALK v1 (38,5)	Résultats non significatifs	idem	EML4-ALK v2 > variants non EML4-ALK > EML4-ALK v3a/b > v1 (100% vs 66,7% vs 58,3% vs 33,3% respectivement [p = 0,191])

Tableau 1. Comparaison des 4 études analysant la corrélation entre variants de fusion et réponse au traitement anti-ALK

suggéré que le variant d'*EML4-ALK*, déterminé par la localisation du point de cassure au sein d'*EML4*, impacte partiellement la stabilité globale de la protéine de fusion ainsi que sa sensibilité et sa dégradation par le traitement anti-ALK. Cette différence de stabilité serait notamment due à la présence ou à l'exclusion au sein de la protéine de fusion d'un domaine particulier du gène *EML4*, le domaine HELP (hydrophobic EML protein) (53,54). Enfin, Woo et al ont constaté, in vitro, une très forte augmentation de l'activité kinase de la protéine de fusion au sein des cellules exprimant les variants 3a ou 5 d'*EML4-ALK* par rapport à celles comportant les variants 1 ou 2 (49). Ces résultats indiquent que la structure protéique du variant de fusion semble influencer sur l'activité kinase de la protéine de fusion et sur la réponse au traitement anti-ALK.

En résumé, dans notre étude, le RNA-seq a été efficace dans 75% des cas. Parmi les résultats positifs, un transcrit de fusion a été obtenu dans plus de 80% des cas alors que les échantillons restants ont été rendus en déséquilibre 5'3'. Les deux causes d'échec du NGS demeurent le faible taux d'ARN extrait des échantillons et l'impossibilité du séquençage du fait d'un défaut qualitatif des bibliothèques préparées. Utilisant également le RNA-seq avec le même kit (Ion AmpliSeq RNA Fusion Lung Cancer Research Panel de Life Technologies), Takeda et al ont constaté des causes d'échec similaires (39). Ces défauts proviennent probablement de la qualité du matériel de base, à savoir les prélèvements tumoraux fixés au formol et inclus en paraffine (55) et de la petite taille des prélèvements de départ puisque la majorité de nos échantillons était issue de biopsies non chirurgicales. Néanmoins, différentes études ont décrit une bonne efficacité de plusieurs méthodes NGS à partir de biopsies fines à l'aiguille, notamment employées lors des écho-endoscopies bronchiques et des biopsies pulmonaires transthoraciques guidées par scanner (56–58). L'étape d'extraction d'ARN pourrait également être améliorée en testant d'autres protocoles. Enfin, le développement de nouvelles techniques

de prélèvements biologiques comme les biopsies liquides ouvre de nouvelles perspectives et constituera un challenge afin d'adapter les méthodes de détection des réarrangements géniques à ces prélèvements (59,60).

Ainsi, le RNA-seq tend à s'imposer dans le diagnostic des réarrangements *ALK* du cancer pulmonaire. En effet, cette technique est efficace et apporte des informations supplémentaires telles que la nature du variant de fusion, qui pourrait avoir un rôle pronostique déterminant ou encore la recherche associée d'un autre réarrangement (*ROS1*, *RET*, *NTRK1*) au cours du même essai. De ce fait, son utilisation pourrait compléter un premier test par IHC.

5. Bibliographie

1. INCa 2015 [Internet]. Available from: <http://www.e-cancer.fr/Professionnels-de-sante/Les-chiffres-du-cancer-en-France/Epidemiologie-des-cancers/Les-cancers-les-plus-frequents/Cancer-du-poumon>
2. 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). *The Lancet*. 2016 Apr;387(10026):1415–26.
3. Référentiel national de RCP - cancer bronchique non à petites cellules [Internet]. Available from: <http://www.e-cancer.fr/Expertises-et-publications/Catalogue-des-publications/Cancer-bronchique-non-a-petites-cellules-Referentiel-national-de-RCP>
4. Guan J, Umapathy G, Yamazaki Y, Wolfstetter G, Mendoza P, Pfeifer K, et al. FAM150A and FAM150B are activating ligands for anaplastic lymphoma kinase. *eLife* [Internet]. 2015 Sep 29 [cited 2017 Jul 17];4. Available from: <http://elifesciences.org/lookup/doi/10.7554/eLife.09811>
5. Reshetnyak AV, Murray PB, Shi X, Mo ES, Mohanty J, Tome F, et al. Augmentor α and β (FAM150) are ligands of the receptor tyrosine kinases ALK and LTK: Hierarchy and specificity of ligand–receptor interactions. *Proc Natl Acad Sci*. 2015 Dec 29;112(52):15862–7.
6. Soda M, Choi YL, Enomoto M, Takada S, Yamashita Y, Ishikawa S, et al. Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature*. 2007 Aug 2;448(7153):561–6.
7. 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*. 2010 Oct 28;363(18):1693–703.

8. Tabbó F. ALK signaling and target therapy in anaplastic large cell lymphoma. *Front Oncol* [Internet]. 2012 [cited 2016 Jun 20];2. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fonc.2012.00041/abstract>
9. Sasaki T, Janne PA. New Strategies for Treatment of ALK-Rearranged Non-Small Cell Lung Cancers. *Clin Cancer Res*. 2011 Dec 1;17(23):7213–8.
10. 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*. 2009 Sep 10;27(26):4247–53.
11. Rodig SJ, Mino-Kenudson M, Dacic S, Yeap BY, Shaw A, Barletta JA, et al. Unique clinicopathologic features characterize ALK-rearranged lung adenocarcinoma in the western population. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2009 Aug 15;15(16):5216–23.
12. Solomon BJ, Mok T, Kim D-W, Wu Y-L, Nakagawa K, Mekhail T, et al. First-line crizotinib versus chemotherapy in ALK-positive lung cancer. *N Engl J Med*. 2014 Dec 4;371(23):2167–77.
13. Shaw AT, Kim D-W, Nakagawa K, Seto T, Crinó L, Ahn M-J, et al. Crizotinib versus chemotherapy in advanced ALK-positive lung cancer. *N Engl J Med*. 2013 Jun 20;368(25):2385–94.
14. Gainor JF, Dardaei L, Yoda S, Friboulet L, Leshchiner I, Katayama R, et al. Molecular Mechanisms of Resistance to First- and Second-Generation ALK Inhibitors in ALK-Rearranged Lung Cancer. *Cancer Discov*. 2016 Oct 1;6(10):1118–33.
15. Shaw AT, Kim TM, Crinó L, Gridelli C, Kiura K, Liu G, et al. Ceritinib versus chemotherapy in patients with ALK -rearranged non-small-cell lung cancer previously given chemotherapy and crizotinib (ASCEND-5): a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2017 Jul;18(7):874–86.
16. Peters S, Camidge DR, Shaw AT, Gadgeel S, Ahn JS, Kim D-W, et al. Alectinib versus Crizotinib in Untreated ALK -Positive Non–Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med* [Internet]. 2017 Jun 6 [cited 2017 Aug 7]; Available from: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1704795>
17. Dagogo-Jack I, Shaw AT. Crizotinib resistance: implications for therapeutic strategies. *Ann Oncol*. 2016 Sep;27(suppl_3):iii42–iii50.
18. 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 Nov 1;17(11):1351–75.
19. Horn L, Pao W. EML4-ALK: honing in on a new target in non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2009 Sep 10;27(26):4232–5.
20. Sasaki T, Rodig SJ, Chirieac LR, Janne PA. The biology and treatment of EML4-ALK non-small cell lung cancer. *Eur J Cancer Oxf Engl 1990*. 2010 Jul;46(10):1773–80.
21. Lin JJ, Riely GJ, Shaw AT. Targeting ALK: Precision Medicine Takes on Drug Resistance. *Cancer Discov*. 2017 Feb;7(2):137–55.
22. 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*. 2015 Jul;46(1):207–18.

23. Department of Health and Human Services. Letter to Ventana Medical Systems on approval of premarket authorization application for the VENTANA ALK (D5F3) CDx Assay. https://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/pdf14/P140025a.pdf. Accessed June 1, 2015.
24. Cabillic F, Gros A, Dugay F, Begueret H, Mesturoux L, Chiforeanu DC, et al. Parallel FISH and Immunohistochemical Studies of ALK Status in 3244 Non–Small-Cell Lung Cancers Reveal Major Discordances. *J Thorac Oncol*. 2014 Mar;9(3):295–306.
25. Marchetti A, Di Lorito A, Pace MV, Iezzi M, Felicioni L, D’Antuono T, et al. ALK Protein Analysis by IHC Staining after Recent Regulatory Changes: A Comparison of Two Widely Used Approaches, Revision of the Literature, and a New Testing Algorithm. *J Thorac Oncol*. 2016 Apr;11(4):487–95.
26. Wang J, Cai Y, Dong Y, Nong J, Zhou L, Liu G, et al. Clinical Characteristics and Outcomes of Patients with Primary Lung Adenocarcinoma Harboring ALK Rearrangements Detected by FISH, IHC, and RT-PCR. Trackman PC, editor. *PLoS ONE*. 2014 Jul 3;9(7):e101551.
27. Marchetti A, Pace MV, Di Lorito A, Canarecci S, Felicioni L, D’Antuono T, et al. Validation of a new algorithm for a quick and easy RT-PCR-based ALK test in a large series of lung adenocarcinomas: Comparison with FISH, immunohistochemistry and next generation sequencing assays. *Lung Cancer*. 2016 Sep;99:11–6.
28. Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*. 2001 Feb 15;409(6822):860–921.
29. Hamblin A, Wordsworth S, Fermont JM, Page S, Kaur K, Camps C, et al. Clinical applicability and cost of a 46-gene panel for genomic analysis of solid tumours: Retrospective validation and prospective audit in the UK National Health Service. Ladanyi M, editor. *PLOS Med*. 2017 Feb 14;14(2):e1002230.
30. Kandoth C, McLellan MD, Vandin F, Ye K, Niu B, Lu C, et al. Mutational landscape and significance across 12 major cancer types. *Nature*. 2013 Oct 16;502(7471):333–9.
31. König K, Peifer M, Fassunke J, Ihle MA, Künstlinger H, Heydt C, et al. Implementation of Amplicon Parallel Sequencing Leads to Improvement of Diagnosis and Therapy of Lung Cancer Patients. *J Thorac Oncol*. 2015 Jul;10(7):1049–57.
32. Zugazagoitia J, Rueda D, Carrizo N, Enguita AB, Gómez-Sánchez D, Díaz-Serrano A, et al. Prospective Clinical Integration of an Amplicon-Based Next-Generation Sequencing Method to Select Advanced Non–Small-Cell Lung Cancer Patients for Genotype-Tailored Treatments. *Clin Lung Cancer* [Internet]. 2017 Jun [cited 2017 Aug 20]; Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S152573041730181X>
33. Martín Martorell P, Huerta M, Compañ Quilis A, Abellán R, Seda E, Blesa S, et al. Coexistence of EGFR , KRAS , BRAF , and PIK3CA Mutations and ALK Rearrangement in a Comprehensive Cohort of 326 Consecutive Spanish Nonsquamous NSCLC Patients. *Clin Lung Cancer* [Internet]. 2017 Apr [cited 2017 Aug 20]; Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1525730417301110>
34. Maher CA, Kumar-Sinha C, Cao X, Kalyana-Sundaram S, Han B, Jing X, et al. Transcriptome sequencing to detect gene fusions in cancer. *Nature*. 2009 Mar 5;458(7234):97–101.

35. Zheng Z, Liebers M, Zhelyazkova B, Cao Y, Panditi D, Lynch KD, et al. Anchored multiplex PCR for targeted next-generation sequencing. *Nat Med*. 2014 Nov 10;20(12):1479–84.
36. Moskalev EA, Frohnauer J, Merkelbach-Bruse S, Schildhaus H-U, Dimmler A, Schubert T, et al. Sensitive and specific detection of EML4-ALK rearrangements in non-small cell lung cancer (NSCLC) specimens by multiplex amplicon RNA massive parallel sequencing. *Lung Cancer*. 2014 Jun;84(3):215–21.
37. Pfarr N, Stenzinger A, Penzel R, Warth A, Dienemann H, Schirmacher P, et al. High-throughput diagnostic profiling of clinically actionable gene fusions in lung cancer: GENE FUSION DETECTION BY MPS. *Genes Chromosomes Cancer*. 2016 Jan;55(1):30–44.
38. Rogers T-M, Arnau GM, Ryland GL, Huang S, Lira ME, Emmanuel Y, et al. Multiplexed transcriptome analysis to detect ALK, ROS1 and RET rearrangements in lung cancer. *Sci Rep*. 2017 Feb 9;7:42259.
39. Takeda M, Sakai K, Terashima M, Kaneda H, Hayashi H, Tanaka K, et al. Clinical application of amplicon-based next-generation sequencing to therapeutic decision making in lung cancer. *Ann Oncol*. 2015 Sep 29;mdv475.
40. Pekar-Zlotin M, Hirsch FR, Soussan-Gutman L, Ilouze M, Dvir A, Boyle T, et al. Fluorescence In Situ Hybridization, Immunohistochemistry, and Next-Generation Sequencing for Detection of EML4-ALK Rearrangement in Lung Cancer. *The Oncologist*. 2015 Mar 1;20(3):316–22.
41. Frampton GM, Fichtenholtz A, Otto GA, Wang K, Downing SR, He J, et al. Development and validation of a clinical cancer genomic profiling test based on massively parallel DNA sequencing. *Nat Biotechnol*. 2013 Oct 20;31(11):1023–31.
42. Drilon A, Wang L, Arcila ME, Balasubramanian S, Greenbowe JR, Ross JS, et al. Broad, Hybrid Capture-Based Next-Generation Sequencing Identifies Actionable Genomic Alterations in Lung Adenocarcinomas Otherwise Negative for Such Alterations by Other Genomic Testing Approaches. *Clin Cancer Res*. 2015 Aug 15;21(16):3631–9.
43. Heydt C, Kostenko A, Merkelbach-Bruse S, Wolf J, Büttner R. ALK evaluation in the world of multiplex testing: Network Genomic Medicine (NGM): the Cologne model for implementing personalised oncology. *Ann Oncol*. 2016 Sep;27(suppl_3):iii25-iii34.
44. Ali SM, Hensing T, Schrock AB, Allen J, Sanford E, Gowen K, et al. Comprehensive Genomic Profiling Identifies a Subset of Crizotinib-Responsive ALK -Rearranged Non-Small Cell Lung Cancer Not Detected by Fluorescence In Situ Hybridization. *The Oncologist*. 2016 Jun;21(6):762–70.
45. Gainor JF, Tan DSW, De Pas T, Solomon BJ, Ahmad A, Lazzari C, et al. Progression-Free and Overall Survival in ALK-Positive NSCLC Patients Treated with Sequential Crizotinib and Ceritinib. *Clin Cancer Res*. 2015 Jun 15;21(12):2745–52.
46. Chiari R, Metro G, Iacono D, Bellezza G, Rebonato A, Dubini A, et al. Clinical impact of sequential treatment with ALK-TKIs in patients with advanced ALK-positive non-small cell lung cancer: Results of a multicenter analysis. *Lung Cancer*. 2015 Nov;90(2):255–60.
47. Yeh I, de la Fouchardiere A, Pissaloux D, Mully TW, Garrido MC, Vemula SS, et al. Clinical, Histopathologic, and Genomic Features of Spitz Tumors With ALK Fusions: *Am J Surg Pathol*. 2015 May;39(5):581–91.

48. Yoshida T, Oya Y, Tanaka K, Shimizu J, Horio Y, Kuroda H, et al. Differential Crizotinib Response Duration Among ALK Fusion Variants in ALK-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol*. 2016 Oct 1;34(28):3383–9.
49. Woo CG, Seo S, Kim SW, Jang SJ, Park KS, Song JY, et al. Differential protein stability and clinical responses of *EML4-ALK* fusion variants to various ALK inhibitors in advanced *ALK* -rearranged non–small cell lung cancer. *Ann Oncol*. 2016 Dec 29;mdw693.
50. Lei Y-Y, Yang J-J, Zhang X-C, Zhong W-Z, Zhou Q, Tu H-Y, et al. Anaplastic Lymphoma Kinase Variants and the Percentage of ALK-Positive Tumor Cells and the Efficacy of Crizotinib in Advanced NSCLC. *Clin Lung Cancer*. 2016 May;17(3):223–31.
51. Cha YJ, Kim HR, Shim HS. Clinical outcomes in ALK-rearranged lung adenocarcinomas according to ALK fusion variants. *J Transl Med [Internet]*. 2016 Dec [cited 2017 Apr 9];14(1). Available from: <http://translational-medicine.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12967-016-1061-z>
52. 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*. 2012 Sep 1;18(17):4682–90.
53. Richards MW, Law EWP, Rennalls LP, Busacca S, O'Regan L, Fry AM, et al. Crystal structure of EML1 reveals the basis for Hsp90 dependence of oncogenic EML4-ALK by disruption of an atypical -propeller domain. *Proc Natl Acad Sci*. 2014 Apr 8;111(14):5195–200.
54. Hrustanovic G, Olivas V, Pazarentzos E, Tulpule A, Asthana S, Blakely CM, et al. RAS-MAPK dependence underlies a rational polytherapy strategy in EML4-ALK–positive lung cancer. *Nat Med*. 2015 Aug 24;21(9):1038–47.
55. Hadd AG, Houghton J, Choudhary A, Sah S, Chen L, Marko AC, et al. Targeted, High-Depth, Next-Generation Sequencing of Cancer Genes in Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded and Fine-Needle Aspiration Tumor Specimens. *J Mol Diagn*. 2013 Mar;15(2):234–47.
56. Young G, Wang K, He J, Otto G, Hawryluk M, Zwirco Z, et al. Clinical next-generation sequencing successfully applied to fine-needle aspirations of pulmonary and pancreatic neoplasms: NGS for Pulmonary and Pancreatic FNAs. *Cancer Cytopathol*. 2013 Dec;121(12):688–94.
57. Karnes HE, Duncavage EJ, Bernadt CT. Targeted next-generation sequencing using fine-needle aspirates from adenocarcinomas of the lung: Next-Generation Sequencing of FNAs. *Cancer Cytopathol*. 2014 Feb;122(2):104–13.
58. Qiu T, Guo H, Zhao H, Wang L, Zhang Z. Next-generation sequencing for molecular diagnosis of lung adenocarcinoma specimens obtained by fine needle aspiration cytology. *Sci Rep [Internet]*. 2015 Sep [cited 2017 Aug 26];5(1). Available from: <http://www.nature.com/articles/srep11317>
59. Lanman RB, Mortimer SA, Zill OA, Sebisano D, Lopez R, Blau S, et al. Analytical and Clinical Validation of a Digital Sequencing Panel for Quantitative, Highly Accurate Evaluation of Cell-Free Circulating Tumor DNA. Hoheisel JD, editor. *PLOS ONE*. 2015 Oct 16;10(10):e0140712.
60. Schwaederle M, Husain H, Fanta PT, Piccioni DE, Kesari S, Schwab RB, et al. Detection rate of actionable mutations in diverse cancers using a biopsy-free (blood) circulating tumor cell DNA assay. *Oncotarget*. 2016 Mar 1;7(9):9707–17.

6. Conclusion

CONCLUSION

Thèse soutenue par : Julian PINSOLLE

Détection des variants de fusion du gène *ALK* par séquençage massif parallèle ciblé à partir d'ARN et réponse au crizotinib dans les cancers pulmonaires non à petites cellules

Dans les cancers pulmonaires non à petites cellules (CPNPC), le réarrangement du gène *ALK* constitue une cible pour des thérapies spécifiques efficaces et bien tolérées comme le crizotinib. Différents variants de fusion coexistent selon le site du point de cassure au niveau du gène partenaire et constitueraient de possibles biomarqueurs pronostiques. Actuellement, l'immunohistochimie (IHC) et l'hybridation in situ en fluorescence (FISH) demeurent les deux tests diagnostiques de routine mais ne permettent pas la détection des différents variants de fusion. De plus, des cas faux-négatifs subsistent en FISH qui reste la méthode de référence. Le séquençage massif parallèle ou next generation sequencing (NGS) à partir d'ARN (RNA-seq) autorise, au cours d'un même test et sur un même échantillon, l'analyse multiplexe de différents gènes impliqués dans les réarrangements des CPNPC, *ALK*, *ROS1*, *RET* et *NTRK1*. Cet outil est moins coûteux, plus rapide et nécessite moins de matériel génétique que des tests moléculaires individuels successifs.

Notre étude a consisté à comparer la sensibilité et la spécificité du RNA-seq par rapport aux deux techniques habituelles (IHC et FISH) sur une cohorte de 76 patients porteurs d'un CPNPC. Le second objectif a porté sur l'étude du lien entre la nature du variant de fusion détecté par RNA-seq et la réponse au crizotinib. Nos résultats montrent une très bonne efficacité du RNA-seq dans la détection du réarrangement *ALK* ainsi que des variants de fusion au sein de notre cohorte, avec une sensibilité et spécificité de 80% et 100%, respectivement, par comparaison aux résultats obtenus avec l'IHC et la FISH. De plus, le RNA-seq s'est révélé être une bonne méthode de recours dans les cas où l'IHC et/ou la FISH étaient douteuses, permettant de conclure à la présence ou non d'un réarrangement dans 100% de ces échantillons. Enfin, nos données vont dans le sens d'une meilleure efficacité du crizotinib pour les patients exprimant un réarrangement *EML4-ALK* variants 1 et 2 comparés à ceux arborant un variant *EML4-ALK* 3a/b. Ce résultat pourrait avoir des conséquences thérapeutiques majeures.

Notre étude a placé le RNA-seq comme un outil diagnostique prometteur pour la détection des réarrangements *ALK* dans les CPNPC. La prochaine étape de notre étude consistera à valider nos résultats sur une vaste cohorte nationale (cohorte BIO-CLINALK de l'Intergroupe Francophone de Cancérologie Thoracique). La confirmation d'un lien entre variants de fusion et réponse au traitement ciblé aurait un réel impact thérapeutique et pronostic pour ces patients et constituerait un argument supplémentaire pour l'utilisation courante du RNA-seq dans cette indication.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER

Grenoble, le 31/08/2017

LE DOYEN
DE L'UFR DE MÉDECINE

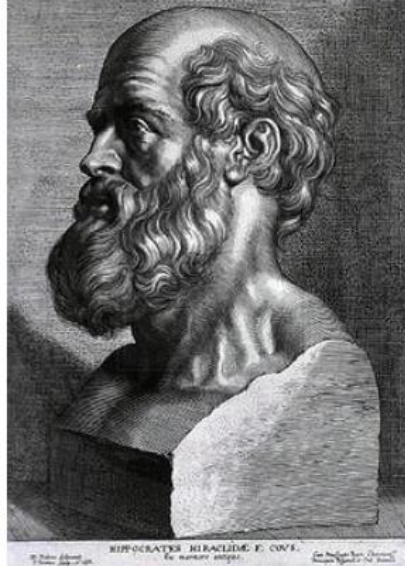
Pr. Jean-Paul ROMANET

Pour la Présidente
et par délégation
Le Doyen de Médecine
Pr. Jean-Paul ROMANET

LE PRÉSIDENT DE LA THÈSE
JURY DE MÉDECINE

Pr. Denis MORO-SIBILOT

7. Serment d'Hippocrate



SERMENT D'HIPPOCRATE

En présence des Maîtres de cette Faculté, de mes chers condisciples et devant l'effigie d'HIPPOCRATE,

Je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la Médecine.

Je donnerais mes soins gratuitement à l'indigent et n'exigerais jamais un salaire au dessus de mon travail. Je ne participerai à aucun partage clandestin d'honoraires.

Admis dans l'intimité des maisons, mes yeux n'y verront pas ce qui s'y passe ; ma langue taira les secrets qui me seront confiés et mon état ne servira pas à corrompre les mœurs, ni à favoriser le crime.

Je ne permettrai pas que des considérations de religion, de nation, de race, de parti ou de classe sociale viennent s'interposer entre mon devoir et mon patient.

Je garderai le respect absolu de la vie humaine.

Même sous la menace, je n'admettrai pas de faire usage de mes connaissances médicales contre les lois de l'humanité.

Respectueux et reconnaissant envers mes Maîtres, je rendrai à leurs enfants l'instruction que j'ai reçue de leurs pères.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.

8. Résumés

ALK fusion variants detection by targeted RNA-next generation sequencing and clinical responses to crizotinib in ALK-positive non-small cell lung cancer

Introduction: the aim of the study was to test and improve the efficacy of an amplicon-based parallel RNA sequencing (RNA-seq) assay for *ALK* fusion transcript variants detection in comparison with immunochemistry (IHC) and fluorescent in-situ hybridization (FISH) in a cohort of non-small cell lung cancer (NSCLC) samples.

Material and methods: 53 formalin-fixed paraffin-embedded ALK-positive samples by FISH and/or IHC and 23 ALK-negative cases were tested by RNA-seq. Subsequently, a protocol combining RNA-seq and an anchored multiplex PCR was evaluated in 10 samples unsuccessfully analyzed with RNA-seq alone.

Results: 75% of the tested samples were successfully analyzed by RNA-seq. RNA-seq sensitivity and specificity were of 80% and 100% respectively compared to IHC and FISH. In IHC- and FISH-positive samples, RNA-seq detected an *ALK* rearrangement in all cases. RNA-seq showed to be a promising rescue technique, especially for the equivocal and/or borderline-positive IHC/FISH cases (an *ALK* status could be assigned in 10/10 cases), less for IHC/FISH discordant cases (2/7 cases). Among 10 cases unsuccessfully tested by RNA-seq alone, anchored multiplex PCR allowed the detection of 3 fusion transcripts, one of which was never described (*CLIP1(12)-ALK(20)*). Median progression free survival was longer in crizotinib-treated patients harboring *EML4-ALK* variants 1 or 2 compared to variants 3a/b (314 vs 192 days, $p = 0.17$).

Conclusion: RNA-seq appears to be effective for *ALK* rearrangement diagnostic in NSCLC and to be a promising rescue technique for equivocal and/or borderline cases. It also allows transcript variants identification which could be a pronostic biomarker in these patients.

Détection des variants de fusion du gène *ALK* par séquençage massif parallèle ciblé à partir d'ARN et réponse au crizotinib dans les cancers bronchiques non à petites cellules

Introduction : le but de l'étude était de tester et d'améliorer l'efficacité du séquençage massif parallèle (NGS) à partir d'ARN basé sur des PCR multiplexes (RNA-seq) dans la détection des variants de fusion *ALK* par rapport à l'immunohistochimie (IHC) et l'hybridation in situ en fluorescence (FISH) dans des échantillons de cancer pulmonaire non à petites cellules (CPNPC).

Matériels et méthodes : 53 échantillons fixés au formol et inclus en paraffine *ALK*-positifs en FISH et/ou IHC et 23 échantillons *ALK*-négatifs ont été testés par RNA-seq. Dans un 2^e temps, un protocole associant le RNA-seq à une PCR ancree multiplexe a été évalué sur 10 échantillons en échec après RNA-seq.

Résultats : un résultat concluant par RNA-seq a été obtenu dans 75% des échantillons. Comparées à l'association IHC/FISH, la sensibilité et la spécificité du RNA-seq étaient respectivement de 80 et 100%. Dans les cas *ALK*-positifs en IHC et en FISH, le RNA-seq a détecté un réarrangement *ALK* dans 100% des cas. Le RNA-seq a été plus efficace pour les cas équivoques et/ou borderlines en FISH et IHC que pour les cas discordants. Parmi les 10 cas considérés en échec après RNA-seq seul, l'ajout de la PCR ancree a permis de détecter 3 transcrits de fusion dont un variant *CLIP1(12)-ALK(20)* jamais décrit auparavant. Au sein des patient traités par crizotinib, la survie sans progression médiane était allongée pour ceux présentant un variant 1 et 2 d'*EML4-ALK* par rapport à ceux arborant un variant 3a/b (314 vs 192 jours, $p = 0,17$).

Conclusion : le RNA-seq est efficace au diagnostic des réarrangements *ALK* des CPNPC et permet l'identification des transcrits de fusion qui pourraient constituer un marqueur pronostique chez ces patients.

Laboratoire : UF Pathologie Moléculaire de l'Institut de Biologie et Pathologie du Centre Hospitalier Universitaire de Grenoble Alpes. UGA/INSERM U1209/CNRS 5309-Institute for Advanced Biosciences – Université Grenoble Alpes, Grenoble.