



Données préliminaires de l'étude MATCH R

Linda Mahjoubi

► To cite this version:

| Linda Mahjoubi. Données préliminaires de l'étude MATCH R. Cancer. 2017. dumas-01745898

HAL Id: dumas-01745898

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01745898>

Submitted on 28 Mar 2018

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.

DONNEES PRELIMINAIRES DE L'ETUDE MATCH R

THESE

Présentée et soutenue publiquement à la Faculté de Médecine
Kremlin Bicêtre
Et examinée par les Enseignants de la dite Faculté et
de la Faculté de Médecine Hyacinthe Bastaraud

Le 4 Octobre 2017

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR EN MEDECINE

Par

MAHJOUBI LINDA

Examineurs de la thèse:

Monsieur le Docteur Christophe Massard, Directeur de Thèse
Monsieur le Professeur Jean-Charles Soria, Président du Jury
Monsieur le Professeur Michel Ducreux
Monsieur le Professeur Benjamin Besse
Monsieur le Docteur Patrick Escarmant
Monsieur le Docteur Luc Friboulet

AVANT PROPOS ET REMERCIEMENTS

C'est avec joie et reconnaissance que je présente ce travail qui est le fruit de conseils et riches collaborations avec de nombreuses personnes, à qui j'exprime ma plus grande gratitude.

A Monsieur le **Professeur Jean-Charles Soria**, qui m'a ouvert les portes de l'Institut Gustave Roussy. Je le remercie de m'avoir fait découvrir ce nouveau monde de l'innovation et de la recherche clinique, de m'avoir fait « vivre le futur aujourd'hui ». Je suis fière d'avoir été son élève et de pouvoir lui témoigner par cette thèse mon plus profond respect.

A Monsieur le **Docteur Christophe Massard**, qui m'a fait l'honneur d'accepter la direction de cette thèse. Je le remercie pour sa confiance, ses précieux conseils, son enthousiasme et sa disponibilité. Je suis très heureuse et honorée de savoir la poursuite de mon épanouissement professionnel dans la recherche clinique au sein de son département.

Je remercie Monsieur le **Professeur Michel Ducreux** qui m'a tant appris lors de mes débuts au sein de l'Institut Gustave Roussy. Je le remercie de me faire l'honneur de siéger à mon jury de thèse.

Je remercie Monsieur le **Professeur Benjamin Besse** d'avoir accepté de juger mon travail en participant au jury de thèse et d'apporter son expertise dans le domaine de l'oncologie thoracique.

Je remercie Monsieur le **Docteur Patrick Escarmant** de m'avoir soutenue tout au long

de mon internat et d'avoir accepté de juger cette thèse.

Je remercie Monsieur le **Docteur Luc Friboulet** de me faire l'honneur de siéger à mon jury de thèse. Je le remercie pour le partage de son brillant savoir scientifique et ses remarques pertinentes qui ont appuyé ma curiosité scientifique.

Je tiens particulièrement à remercier **Anas Gazzah**, mon chef, mon mentor et mon ami. Je le remercie pour son investissement, sa rigueur, sa patience et sa générosité.

Je remercie vivement toute **l'équipe MATCH R** : Claudio Nicotra pour sa productivité, son énergie et notre harmonie professionnelle ; Rastilav Bahleda pour sa confiance absolue et sa constante gentillesse ; Lambros Tselikas et Didier Deschamps pour leur efficacité et leur enthousiasme ; Thierry DeBaere, Ludovic Lacroix, Francesco Facchinetti, Ludovic Bigot, Catherine Richon, Adeline Perez, Helene Rocheteau, Zsofia Balogh, Charlotte Kerlau, Teddy Turinay, Jawad Imam, Maud Ngo, Silia Bellahoues et Etienne Rouleau pour leur bienveillance.

Je remercie **Nathalie Grossat** qui m'a initiée à l'oncologie dès mon premier semestre d'internat. Je la remercie pour tout ce qu'elle m'a offert tant sur le plan professionnel par la transmission de ses connaissances et la relation avec les patients, que sur le plan personnel par sa présence et sa réassurance lors de mes années en Martinique.

A mes cointernes qui m'ont accompagnée pendant tous ces semestres et à mes amis de Master 2 pour leur présence.

A mes amis de toujours pour leur soutien et les fous rires récurrents: Ophélie Bougault, Ahlem Imekraz, Rebecca Sabban, Sarah Habes, Sara Mahgoub, Sarah Dhundass, Michel

Gennaoui et Mickael Majer.

A mes parents et à Lilia, pour tout.

A **ma famille**, ceux que j'ai pensé et ceux toujours présents, pour leur amour.

TABLE DES MATIERES

Liste des tableaux	7
Liste des figures.....	8
Liste des abréviations	9
I. Introduction	11
A. La médecine de précision	
B. Résistance aux thérapies ciblées	
II. Matériels et Méthodes.....	15
A. Description de l'étude MATCH R.	
B. Objectifs	
C. Méthodes	
D. Analyses génomiques	
E. Etude translationnelle	
III. Résultats.....	20
A. Organigramme de l'étude MATCH R	
B. Caractéristiques des patients	
C. Analyses par thérapies ciblées	
1. Résistance aux inhibiteurs de tyrosine kinase anti-EGFR	
2. Résistance aux inhibiteurs de tyrosine kinase anti-ALK	
3. Résistance aux inhibiteurs de tyrosine kinase anti-MET	
D. Résultats des cas individuels	
E. Cas cliniques	
1. Patient MR 20 : émergence de deux nouvelles mutations de résistance ROS1 S1986 Y / F au crizotinib	
2. Patient MR 15 : activation de l'EGFR et des voies de signalisation associées dans la résistance à l'erdafitinib	
3. Patient MR 03 : apport de l'épigénétique par la mutation IDH1 R132C dans la résistance au dabrafenib	
IV. Discussion	40
A. Mécanismes de résistance dépendants de la cible	
1. Mutations secondaires	
a. T790M : mutation de résistance aux inhibiteurs de tyrosine kinase anti-EGFR de première génération	
b. C797S : mutation de résistance aux inhibiteurs de tyrosine kinase anti-EGFR de troisième génération	
c. Mutations de résistance acquise aux inhibiteurs de tyrosine kinase anti-ALK	
d. Mutations de résistance acquise aux inhibiteurs de tyrosine kinase	

	anti-FGFR	
	2. Amplification du gène cible	
B.	Mécanismes de résistance indépendants de la cible	
	1. Activation des voies de signalisation alternatives	
	2. Autres mécanismes	
	a. Transformation histologique	
	b. Résistance à l'apoptose	
	c. Modifications épigénétiques	
C.	Limites de l'étude MATCH R	
V.	Perspectives.....	56
	A. Amendements pour l'ouverture de sous-études	
	B. Analyse prospective de la résistance aux immunothérapies ciblant les points de restriction	
VI.	Références	60
	A. Références bibliographiques	
	B. Bibliographie	
	1. Annexe 1 : Planchard et al. Annals of Oncol 2015	
	2. Annexe 2 : Facchinetti et al. Clin Cancer Research 2016	
	3. Annexe 3 : Benderra et al. JTO 2015	
	Serment d'Hippocrate	90

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Caractéristiques des patients

Tableau 2. Résultats moléculaires des cas individuels

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Principaux mécanismes de résistance aux thérapies ciblées

Figure 2. Présentation de l'étude MATCH R

Figure 3. Représentation des analyses génomiques réalisées en fonction de la cellularité

Figure 4. Panel des gènes du séquençage ciblé

Figure 5. Organigramme de l'étude MATCH R sur l'année 2015

Figure 6. Cas clinique MR 20 : Structure des gènes ROS1 et ALK et mutations de résistance (adapté de Facchinetti et al. 2016)

Figure 7. Cas clinique MR 15 : Evaluation clinique incluant l'historique des traitements reçus et les analyses moléculaires

Figure 8. Cas clinique MR 03 : Evaluation clinique incluant l'historique des traitements reçus et évaluations radiologiques

Figure 9. Cas clinique MR 03 : Imageries radiologiques (TDM thoracique) réalisées avant (Avril 2014), à 4 mois (Aout 2014) et à 8 mois (Décembre 2014) de traitement par dabrafenib / trametinib

Figure 10. Evolution de la résistance acquise aux thérapies ciblées (Oxnard et al. 2016)

Figure 11. Représentation des mutations EGFR T790M et C797S en cis et en trans, et stratégie thérapeutique adaptée (Remon et al. 2016)

Figure 12. Représentation des mutations du gène ALK de résistance aux inhibiteurs de tyrosine kinase anti-ALK (Lovly et al. 2012)

Figure 13. Voies de signalisation associées à l'EGFR (Ji et al. 2010)

LISTE DES ABBREVIATIONS

2HG	2-hydroxyglutarate
ABL	Abelson murine Leukemia viral oncogene homolog
ALK	Anaplastic lymphoma kinase
Bcl2	B cell lymphoma 2
BCR	Breackpoint Cluster Region protein
BRAF	B Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B
CBNPC	Cancer Bronchique Non à Petites Cellules
CPPC	Cancer du Poumon à Petites Cellules
CTNNB1	Catenin Beta 1
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
EMT	EpithelioMesenchymal Transition
EZH2	Enhancer of Zeste Homolog 2
FA	Fréquence Allélique
FDA	Food and Drug Administration
FFPE	Formalin Fixed Paraffin Embedded
FGFR	Fibroblast Growth Factor Receptor
HDAC	Histone déacétylase
HER2	Human Epidermal Growth Factor Receptor-2
HMT	Histone méthyl-transférase
IDH	Isocitrate déhydrogenase
IGF1R	Insulin like Growth Factor 1 Receptor
ITK	Inhibiteur de Tyrosine Kinase
KMD	Histone Lysine Déméthylase
KRAS	Kirsten rat sarcoma
MDM2	Mouse double minute 2 homolog
MDSC	Myeloid Derived Suppressor Cells
MR	Match R numéro patient
mTOR	mammalian Target Of Rapamycin
ORL	Oro-Rhino-Larynx
PCR	Polymerase Chain Reaction
PD	Progressive Disease
PDX	Patient Derived tumor Xenograft
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PTEN	Phosphatase And Tensin Homolog
RB	Retinoblastome
SD	Stable Disease
SMARC	SWI/SNF Related Matrix Associated Actin Dependent Regulator Of Chromatin
STAG	Stromal Antigen gene
SWI/SNF	SWItch/Sucrose Non-Fermentable
TC	Thérapie ciblée

TDM
Treg
 α KG

Tomodensitométrie
Lymphocyte T régulateur
 α ketoglutarate

I. Introduction

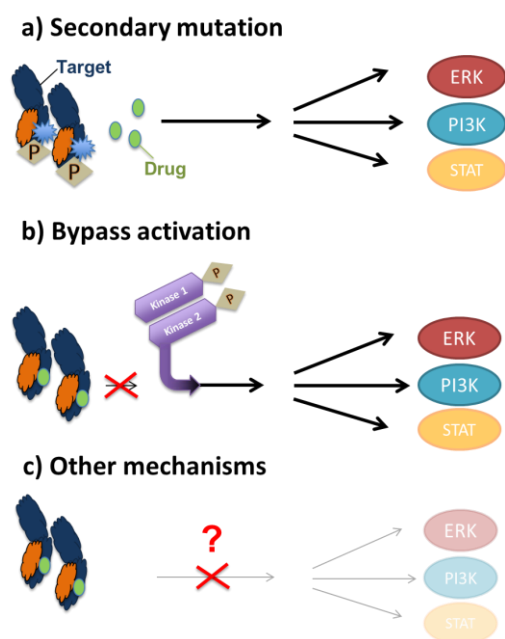
A. La médecine de précision

Le développement des thérapies ciblées a ouvert une nouvelle ère thérapeutique en oncologie au début des années 2000, la médecine de précision. Le mécanisme d'action tout à fait différent de celui des chimiothérapies conventionnelles est d'inhiber de manière sélective l'anomalie moléculaire en cause dans la progression tumorale. De ce fait, la notion d'addiction oncogénique est définie par la dépendance tumorale à une anomalie moléculaire d'un oncogène à l'origine de la prolifération et de l'invasion tumorale (1–3). L'oncogène responsable de l'initiation tumorale devient le pilote oncogénique responsable de la progression tumorale. La description de plusieurs anomalies moléculaires récurrentes dans différents types histologiques a permis une nouvelle classification des cancers par pilote oncogénique, et *in fine* une nouvelle stratégie thérapeutique. Les inhibiteurs de tyrosine kinase (ITK) comme l'imatinib ciblant la translocation BCR-ABL, l'erlotinib et le gefinitib anti-EGFR de première génération, le vemurafenib anti-BRAF, ou le crizotinib ciblant les réarrangements ALK et ROS1 ont tous démontré une efficacité clinique évidente dans les cancers présentant l'altération moléculaire cible (4–8). L'analyse génomique est devenu un outil clef dans la stratégie thérapeutique actuelle et différents programmes de séquençage sont réalisés afin de cartographier les anomalies moléculaires au sein d'un type tumoral comme l'essai SAFIR 01 dans le cancer du sein (9). D'autres essais comme MOSCATO 01 (10), SHIVA (11) et NCI MATCH (NCT02465060) évaluent l'impact clinique de l'orientation thérapeutique des patients en fonction de l'anomalie moléculaire identifiée par séquençage génomique à haut débit.

B. Résistance aux thérapies ciblées

Malgré des taux de réponses élevés et des durées de réponses prolongées, les ITK ont une efficacité limitée par l'apparition d'une résistance moléculaire acquise à l'origine de la progression de la maladie. Il s'agit d'une résistance acquise ou secondaire. Cette résistance se distingue de la résistance primaire ou intrinsèque qui est définie par l'absence de réponse et une progression immédiate de la maladie (12). Les principaux mécanismes de résistance acquise aux thérapies ciblées décrits sont soit dépendants (mutations secondaires ou amplifications du gène cible) soit indépendants de la cible. Parmi les mécanismes de résistance indépendants de la cible, figurent l'activation de voies alternatives de transduction du signal et les mécanismes divers tels que la transformation histologique, la résistance à l'apoptose, les modifications épigénétiques, etc. (figure 1).

Figure 1. Principaux mécanismes de résistance aux thérapies ciblées



La recherche de mutations secondaires de résistance a permis le développement de nouvelles thérapies ciblées dites de nouvelle génération. Dans le cancer du poumon métastatique muté EGFR traité par anti-EGFR de première génération, EGFR T790M est la mutation secondaire de résistance la plus fréquente, présente dans environ 60% des cas (13–16). L'anomalie moléculaire identifiée est la substitution d'une thréonine par une méthionine en position 790 de l'exon 20 du gène EGFR. L'osimertinib est un anti-EGFR de troisième génération dont le développement a permis de mettre en évidence des taux de réponse de 61% en phase I et 71% en phase III, ayant permis son autorisation de mise sur le marché dans la prise en charge thérapeutique du cancer du poumon métastatique muté EGFR prétraité par un anti-EGFR de première génération et présentant la mutation T790M (17,18). Plusieurs mécanismes de résistance à l'osimertinib ont été identifiés, dont la mutation secondaire EGFR C797S (19). D'autres mécanismes de résistance ont aussi été rapportés comme l'amplification des gènes cibles (20,21) et les voies de contournement par l'amplification du gène MET activant les voies de signalisation associées à l'EGFR (21–25) dans les cancers du poumons métastatiques mutés EGFR traités par un anti-EGFR de première génération, ou présentant un réarrangement du gène ALK traités par crizotinib. L'identification de ces mécanismes de résistance est majeure pour permettre de mieux guider la stratégie thérapeutique. Dans certains cas, le recours à une nouvelle classe de thérapie ciblée agissant sur la même voie de signalisation a été démontré comme une des stratégies thérapeutiques à adapter. En effet, dans les cancers du sein métastatiques surexprimant HER2 ayant progressé sous trastuzumab, anticorps monoclonal anti-HER2, l'association du lapatinib, ITK anti-HER2, à la capecitabine a démontré une amélioration significative du temps jusqu'à progression de la maladie (26).

Lorsque le mécanisme de résistance à une thérapie ciblée est déjà connu, l'association de deux thérapies ciblées agissant sur des voies de signalisation complémentaires s'est avérée être plus efficace que la monothérapie. Dans la prise en charge des mélanomes métastatiques présentant une mutation BRAF V600E traités par un ITK anti-BRAF, l'hyperactivation de la voie des MAP Kinases a été identifiée comme un des mécanismes de résistance aux ITK anti-BRAF (27,28). Ce mécanisme de résistance a permis d'adapter et d'anticiper la prise en charge par l'association d'un ITK anti-BRAF et d'un ITK anti-MEK. Cette combinaison de thérapies ciblées a démontré une amélioration significative de la survie globale et de la survie sans progression par rapport à un ITK anti-BRAF seul (29,30).

Les analyses génomiques à haut débit sont essentielles pour cartographier les cancers sur le plan moléculaire et adapter la prise en charge thérapeutique des patients (10,31–33). La technique d'hybridation génomique comparative a permis d'identifier l'amplification de MET comme un des mécanismes de résistance au gefitinib (22,23). De plus, la mutation de résistance, EGFR C797S, aux ITK anti-EGFR de troisième génération, a été pour la première fois identifiée par l'analyse du séquençage ciblé réalisé à partir d'ADN tumoral circulant (19). Enfin, le séquençage de l'exome entier a permis de mettre en évidence l'émergence d'une nouvelle mutation ALK L1198F aux ITK anti-ALK (34,35).

Ces nouveaux mécanismes de résistance identifiés à l'aide d'analyses génomiques ont aussi été validés par des analyses *in vitro* sur des lignées cellulaires et *in vivo* à partir de xénogreffes dérivées de patients (PDX) ou dérivées de lignées cellulaires. Cette approche translationnelle complémentaire à l'analyse génomique réalisée directement à partir du patient, apparaît indispensable pour affiner les mécanismes de résistance et valider les

solutions thérapeutiques.

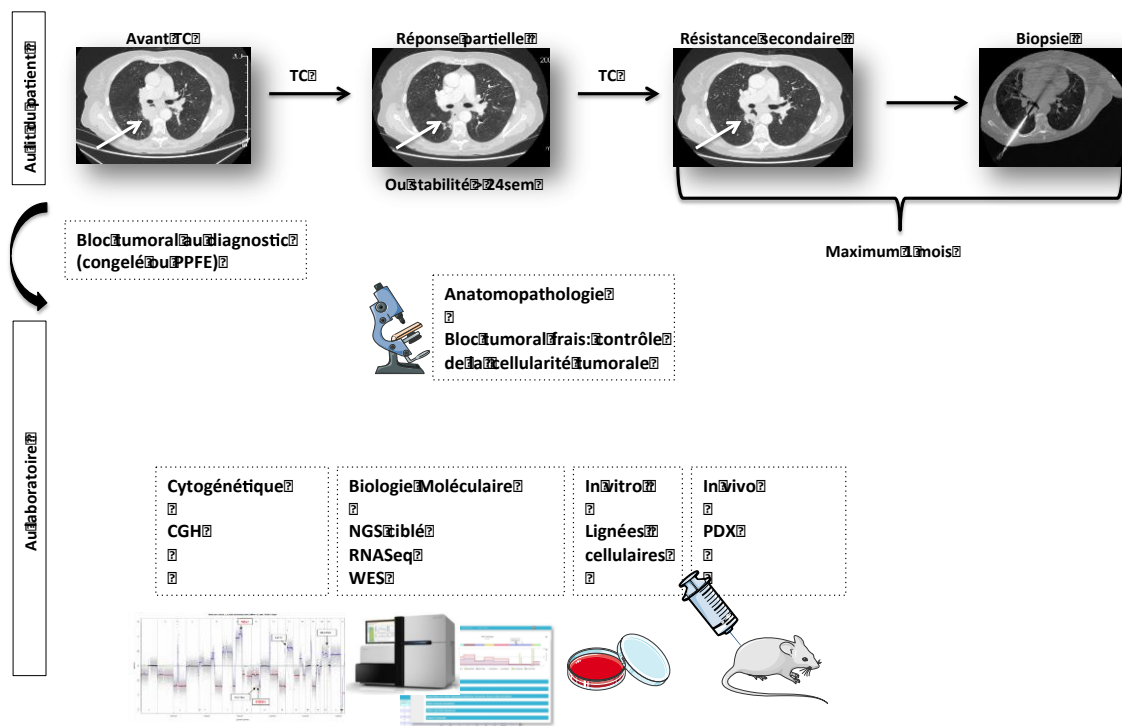
II. Matériels et Méthodes

A. Description de l'étude MATCH R

L'étude MATCH R était une étude prospective monocentrique avec pour but d'étudier les mécanismes de résistance secondaires aux traitements anti-cancéreux dont les thérapies ciblées, chez des patients atteints de tumeurs, avec la réalisation d'analyses génomiques à haut débit réalisées à partir de tissus frais obtenus au moment de la progression de la maladie (figure 2).

Une étude de sous-groupe regroupant les cancers de la prostate, MATCH R Prostate, impliquait la réalisation d'une biopsie obligatoire avant de débiter la thérapie ciblée.

Figure 2. Présentation de l'étude MATCH R



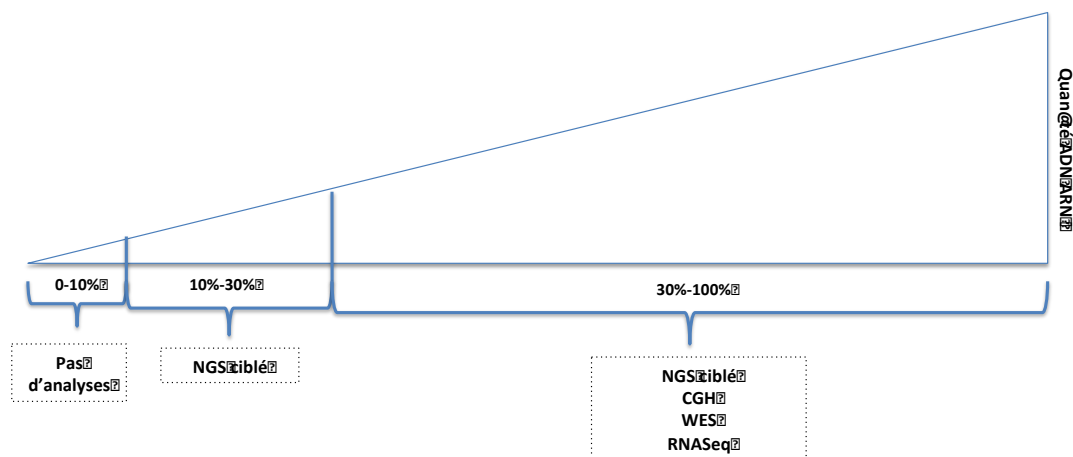
B. Objectifs

L'étude MATCH R avait pour objectif principal l'étude de l'évolution clonale de l'architecture tumorale de patients traités par thérapies ciblées. Les objectifs secondaires de cette étude étaient la réalisation d'analyses génomiques haut débit à partir d'échantillons tumoraux de patients traités par thérapies ciblées afin d'identifier de nouveaux mécanismes de résistance secondaire, de développer de nouveaux modèles de résistance au laboratoire par la réalisation de lignées cellulaires et de PDX, et d'étudier l'ADN tumoral circulant.

C. Méthodes

La biopsie tumorale devait être réalisée dans le mois qui suivait la progression de la maladie sous thérapie ciblée. La lésion tumorale en progression (primitive ou métastatique) devait être accessible à une biopsie à l'aiguille sous scanner ou sous échographie. La biopsie était obligatoire au niveau de la lésion en progression et recommandée dans le même temps au niveau d'une lésion stable pour permettre la comparaison des analyses et suivre l'évolution spatiale de l'architecture clonale. Le prélèvement tumoral ayant permis le diagnostic initial ou le prélèvement le plus récent avant le début de la thérapie ciblée était rétrospectivement rapatrié dans les services d'anatomopathologie, de cytogénétique et de biologie moléculaire pour permettre à partir des analyses génomiques le suivi temporel de l'architecture clonale. Lorsque la biopsie était réalisée, un contrôle de la cellularité tumorale était obligatoire pour réaliser en fonction de celle-ci une analyse par séquençage ciblé (à partir de 10% de cellularité), et les analyses suivantes : l'hybridation génomique comparative, le séquençage de l'exome entier et le séquençage de l'ARN (à partir de 30% de cellularité), à partir d'ADN et d'ARN de bonne qualité une fois extraits (figure 3). Une biopsie liquide à partir d'un échantillon de sang était réalisée dans le même temps que la biopsie de la lésion tumorale pour permettre l'analyse génomique de l'ADN tumoral circulant.

Figure 3. Représentation des analyses génomiques réalisées en fonction de la cellularité



D. Analyses génomiques

L'hybridation génomique comparative est une analyse cytogénétique qui consiste à partir d'ADN tumoral et normal fragmentés de les hybrider pour mettre en évidence les anomalies de nombres de copies d'ADN. Etaient détectés les amplifications ($\log \text{ratio} > x0.7$), gains ($\log \text{ratio } x0.3 \text{ à } x0.7$), pertes ($\log \text{ratio } x0 \text{ à } x0.5$) délétions ($\log \text{ratio} < x0.5$) de gènes et perte d'hétérozygotie. La technologie utilisée était initialement le scanner de puces à ADN Agilent 180k en 2015 puis Affymetrix.

Le séquençage ciblé consiste en un séquençage de l'ADN à haut débit à partir d'une

librairie de copies d'ADN. L'analyse était réalisée initialement sur un panel de 74 gènes (figure 4) en 2015 puis élargi à 82 gènes, avec la technologie IonTorrent PGM. Après analyse bioinformatique, une liste de variants pathogènes, non pathogènes ou de pathogénicité inconnue était établie. Le séquençage ciblé permettait de détecter les délétions, amplifications, mutations et polymorphismes géniques.

Les techniques de séquençage de l'ARN et de l'exome entier étaient réalisées par la technologie Illumina à partir d'ARN et d'ADN extraits, sur un panel d'au moins 121 gènes (31). L'analyse bioinformatique était établie par IntegraGen Genomics. Les transcrits de fusions étaient détectés par séquençage de l'ARN. Le séquençage de l'exome entier permettait d'identifier les délétions, amplifications, mutations de gènes et de calculer la charge mutationnelle.

Sur la biopsie liquide (au moins 500 μ L de plasma), le séquençage ciblé de l'ADN tumoral circulant était réalisé avec la technologie IonTorrent PGM sur un panel de 50 gènes.

E. Etude translationnelle

L'étude MATCH R était aussi translationnelle puisqu'un des objectifs était d'établir de nouveaux modèles de résistance acquise aux thérapies ciblées. Au sein de l'unité de recherche INSERM UMR981, des analyses ont été réalisées *in vitro* avec le développement de lignées cellulaires à partir d'échantillons tumoraux de patients et *in vivo* par la réalisation de PDX. Ces modèles étaient développés afin d'étudier la réponse aux thérapies ciblées, identifier la résistance et adapter la stratégie thérapeutique.

Figure 4. Panel des gènes du séquençage ciblé

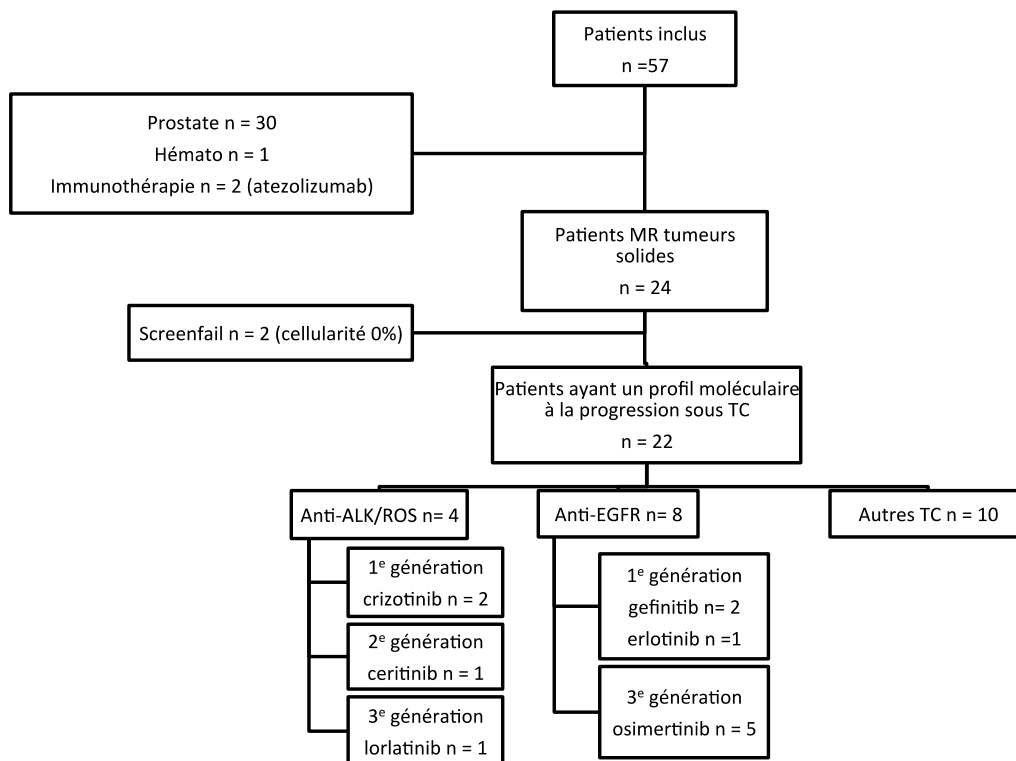
Gene	RefSeq	Exons	Panel	Gene	RefSeq	Exons	Panel	Gene	RefSeq	Exons	Panel
ABL1	NM_007313	4 à 7	CHP2	FGFR4	NM_002011	2 to 18	SAF02	NF1	NM_001042	1 to 58	SAF02
AKT1	NM_005163	3&6	SAF02 + CHP2	FLT1	NM_002019	1 to 30	SAF02	NFE2L2	NM_006164	2	SAF02
AKT2	NM_001626	3	SAF02	FLT3	NM_004119	11-14-16-20	CHP2	NOTCH1	NM_017617	24-27&34	SAF02 + CHP2
AKT3	NM_005465	3	SAF02	GNA11	NM_002067	5	CHP2	NOTCH2	NM_024408	34	SAF02
ALK	NM_004304	20 to 26	SAF02 + CHP2	GNAQ	NM_002072	5&8	CHP2	NOTCH4	NM_004557	1 to 30	SAF02
APC	NM_000038	16 (partiel)	CHP2	GNAS	NM_000516	8&9	CHP2	NPM1	NM_002520	12	CHP2
ATM	NM_000053	3-34&36-39-50	CHP2	HNF1A	NM_000545	3&4	CHP2	NRAS	NM_002524	2 to 4	SAF02 + CHP2
BRAF	NM_004333	11&15	SAF02 + CHP2	HRAS	NM_005343	2 to 4	SAF02 + CHP2	PDGFRA	NM_006206	12-14-15&18	SAF02 + CHP2
BRCA1	NM_007294	2 to 23	SAF02	IDH1	NM_005896	4	CHP2	PIK3CA	NM_006218	7-8-10-14-19	SAF02 + CHP2
BRCA2	NM_000059	2 to 27	SAF02	IDH2	NM_002168	4	CHP2	PIK3R1	NM_181523	10-12-14&15	SAF02
CDH1	NM_004360	3-8-9	CHP2	INPP4B	NM_003866	5 to 27	SAF02	PPP2R1A	NM_014225	5&6	SAF02
CDKN2A	NM_000774	2	CHP2	JAK2	NM_004972	14	CHP2	PTEN	NM_000314	1 to 9	SAF02 + CHP2
CSF1R	NM_005211	7&22	CHP2	JAK3	NM_000215	4-13-16	CHP2	PTPN11	NM_002834	3&13	SAF02 + CHP2
CTNNB1	NM_N	3	SAF02 + CHP2	KDR	NM_002253	1 to 30	SAF02 + CHP2	RB1	NM_000321	11-14-17-18	CHP2
DDR2	NM_0010147	4 to 19	SAF02	KEAP1	NM_203500	2 to 6	SAF02	RET	NM_020975	0-11-13-15-1	SAF02 + CHP2
EGFR	NM_005228	7-12-15-18to	SAF02 + CHP2	KIT	NM_000222	11-13-15-17	SAF02 + CHP2	ROS1	NM_002944	38	SAF02
ERBB2	NM_004448	8-19to21	SAF02 + CHP2	KRAS	NM_033360	2 to 4	SAF02 + CHP2	SMAD4	NM_005359	3&6-8&12	CHP2
ERBB3	NM_001982	1 to 28	SAF02	MAP2K1	NM_002755	2&3	SAF02	SMARCB1	NM_003073	2-4-5-9	CHP2
ERBB4	NM_005235	3 to 9-15&23	SAF02 + CHP2	MAP2K4	NM_003010	1 to 11	SAF02	SMO	NM_005631	3-5-6-9-11	CHP2
EZH2	NM_004456	16	CHP2	MAP3K1	NM_005921	1 to 20	SAF02	SRC	NM_005417	14	CHP2
FBXW7	NM_033632	2 to 12	SAF02	MET	NM_0011275	11-14-16	SAF02 + CHP2	STK11	NM_000455	1 to 9	SAF02 + CHP2
FGFR1	NM_023110	4-7-12-14&15	SAF02 + CHP2	MLH1	NM_000249	12	CHP2	TP53	NM_000546	1 to 11	SAF02 + CHP2
FGFR2	NM_000141	7-9-12&14	SAF02 + CHP2	MLL3	NM_170606	8-9&43	SAF02	TSC1	NM_000368	1 to 23	SAF02
FGFR3	NM_000142	7-9-14-16&18	SAF02 + CHP2	MPL	NM_005373	1	CHP2	TSC2	NM_000548	2 to 42	SAF02
				MTOR	NM_004958	1 to 58	SAF02	VHL	NM_000551	1 to 3	SAF02 + CHP2

III. Résultats

A. Organigramme de l'étude MATCH R

Un total de 199 patients ont été inclus de Janvier 2015 à Mai 2017 dans l'étude MATCH R. Les données préliminaires concernaient les patients inclus la première année (de Janvier 2015 à Décembre 2015), atteints de tumeurs solides, traités par thérapies ciblées, pour qui un profil moléculaire a été réalisé à partir de la biopsie MATCH R (figure 5). Sur cette période, un total de 57 patients ont été inclus dont 30 patients dans la sous-étude MATCH R Prostate. Parmi tous les patients atteints de tumeurs solides ayant eu une biopsie sous thérapie ciblée, 83% avaient une cellularité supérieure à 30%. Un profil moléculaire a été réalisé chez 22 patients (anti-ALK : n = 4, anti-EGFR : n = 8, autres thérapies ciblées (TC) : n = 10).

Figure 5. Organigramme de l'étude MATCH R sur l'année 2015



B. Caractéristiques des patients

Les caractéristiques cliniques, histologiques et moléculaires des patients sont représentées dans le tableau 1. Le type histologique le plus fréquent était le cancer bronchique non à petites cellules (CBNPC) (n = 16). Les biopsies sous osimertinib (n = 5) et crizotinib (n = 4) étaient celles pour lesquelles les effectifs étaient les plus élevés. Les patients étaient traités par les thérapies ciblées suivantes : erlotinib, gefitinib, osimertinib, crizotinib (ITK anti-ALK/ROS1 de première génération avec une activité anti-MET), céritinib (ITK anti-ALK/ROS1 de seconde génération), lorlatinib (ITK anti-ALK/ROS1 de troisième

génération), évérolimus (dérivé de la rapamycine et inhibiteur de la serine thréonine kinase mTOR), erdafitinib (ITK anti-FGFR), ivosidenib (inhibiteur d'IDH1), tazemetostat (inhibiteur d'EZH2), LY3039478 (inhibiteur de NOTCH) et les combinaisons thérapeutiques suivantes : dabrafenib (ITK anti-BRAF) / trametinib (ITK anti-MEK), pimasertib (ITK anti-MEK) / SAR505838 (inhibiteur de MDM2), et LY2783101 (inhibiteur de PI3K) / gemcitabine. 55% des patients ont reçu ces thérapies ciblées dans le cadre d'un essai clinique de phase I au sein du Département d'Innovation Thérapeutique et des Essais précoces à l'Institut Gustave Roussy.

Dix-sept patients ont eu une biopsie unique d'une lésion en progression, trois patients ont eu une double biopsie au niveau d'une lésion stable et d'une lésion en progression ; et deux patients ont eu une double biopsie de deux lésions en progression. Les analyses génomiques réalisées sur le tissu étaient : le séquençage ciblé (n = 27), l'hybridation génomique comparative (n = 20), le séquençage de l'exome entier (n= 25) et le séquençage de l'ARN (n = 20). Sur l'ADN tumoral circulant, le séquençage ciblé était réalisé chez 16 patients. Les trois patients ayant eu une double biopsie en lésions stable et progressive présentaient les caractéristiques suivantes : (MR 16) adénocarcinome bronchique muté EGFR avec une délétion au niveau de l'exon 19, traité par erlotinib; (MR 15) carcinome urothélial de l'uretère muté FGFR3 S249C traité par erdafitinib; et (MR 14) adénocarcinome bronchique muté CTNNB1 S37F traité par évérolimus. L'échantillon tumoral au diagnostic, ou à partir d'une biopsie dans le cadre de l'essai MOSCATO 01 avant mise en route de la thérapie ciblée, était disponible chez 10 patients. Un total de 8 patients avaient été inclus au préalable dans l'essai MOSCATO 01. Le bloc tumoral MOSCATO 01 a été récupéré (n = 6) et mis en lames (n = 3) lorsque la

quantité de matériel était suffisante, pour réalisation de séquençage de l'exome entier. Le séquençage ciblé à partir de l'ADN tumoral circulant ne retrouvait pas de mutations dans 63% des cas (n = 10). Parmi les six autres analyses de biopsie liquide, des résultats similaires au séquençage ciblé sur tissu ont été retrouvés pour trois patients (MR 07 : mutation EGFR L858R connue avant au diagnostic, MR10 : mutation NOTCH connue avant le début du LY3039478, et MR15 : mutation FGFR3 connue avant le début de l'erdafitinib). Deux analyses de biopsie liquide ont retrouvé des résultats différents de celles réalisées sur le tissu (MR 08 : mutation KRAS Q61R avec une fréquence allélique à 0.9% apparue sous gefitinib non connue au diagnostic par l'analyse de séquençage direct, et MR 57 : mutation PI3K E542K avec une fréquence allélique à 9% apparue sous lorlatinib en deuxième ligne, non retrouvée à posteriori sur l'analyse par séquençage de l'exome entier du bloc au diagnostic avant la mise en route du crizotinib en première ligne).

Tableau 1. Caractéristiques des patients

Caractéristiques		
Age		
Médiane (ans)	65.5	
Intervalle interquartile (ans)	33 - 81	
	Effectif (Fréquence %)	
Sexe		
Male	12 (55%)	
Femme	10 (45%)	
Types histologiques		
CBNPC	16 (73%)	
Carcinome urothélial	2 (9%)	
Cholangiocarcinome	1 (4.5%)	
Carcinome adénoïde kystique	1 (4.5%)	
Carcinome de l’ovaire à petites cellules	1 (4.5%)	
Carcinome endométrial	1 (4.5%)	
Thérapies ciblées	Pilote oncogénique	Effectif
Erlotinib	EGFR	1
Gefinitib	EGFR	2
Osimertinib	EGFR	5
Crizotinib	ROS1, ALK, MET	4
Céritinib	ALK	1
Lorlatinib	ALK	1
Evérolimus	CTNNB1	1
Erdafitinib	FGFR3	1
Dabrafenib / trametinib	BRAF	1
Pimasertib / SAR505838	KRAS	1

Ivosidenib	IDH1	1
LY2783101 / gemcitabine	PIK3CA	1
Tazemetostat	SMARCA4	1
LY3039478	NOTCH1	1

C. Analyses par thérapie ciblée

1. Résistance aux inhibiteurs de tyrosine kinase anti-EGFR

Parmi les 8 patients traités par ITK anti-EGFR, trois étaient traités par erlotinib (n = 1) et gefitinib (n = 2), et 5 par osimertinib. Sur les trois patients traités par ITK anti-EGFR de première génération, deux avaient une mutation du gène EGFR : L858R au niveau de l'exon 21 et I744M au niveau de l'exon 19. La sensibilité de la mutation I744M à un anti-EGFR de première génération a été pour la première fois décrite chez le patient MR 08 (36). Comme attendu, la mutation de résistance T790M a été retrouvée chez deux patients (MR 08 et MR16) sur trois, sur les analyses de séquençage ciblé et de séquençage de l'exome entier.

Concernant les patients traités par osimertinib, différents mécanismes de résistance ont été rapportés. Nous avons détecté sur le séquençage de l'exome entier (MR 54) la mutation de résistance C797S (19). Il s'agissait d'un patient de 70 ans, non fumeur strict, atteint d'un adénocarcinome lépidique métastatique diagnostiqué en 2009, pour qui un profil moléculaire réalisé en 2013 a permis de mettre en évidence après trois lignes de traitement (sels de platine / navelbine, docetaxel, erlotinib pendant trois mois, et reprise de docetaxel) une délétion de l'exon 19 du gène EGFR associé à la mutation EGFR T790M. Le patient a été traité par osimertinib dans le cadre d'un essai de phase I avec

une réponse partielle à -76% selon les critères RECIST 1.1 et un contrôle de la maladie pendant vingt-quatre mois. Lors de la progression, le patient a été inclus dans l'essai MATCH R et une biopsie au niveau d'une lésion en progression a été réalisée. Le séquençage ciblé et le séquençage de l'exome entier ont montré la mutation de résistance EGFR C797S (fréquence allélique à 12% et 13 % respectivement) et la persistance de la mutation EGFR T790M (fréquence allélique à 31% et 23 % respectivement). Le séquençage ciblé sur l'ADN tumoral circulant n'a pas retrouvé de mutations. La mutation secondaire EGFR C797S a été décrite comme un mécanisme de résistance à l'osimertinib (19) et son mécanisme d'action sera décrit dans le paragraphe IV.A.1.b. . Les résultats de deux autres patients (MR 01 et MR 07) ont été publiés dans le journal *Annals of Oncology* en 2015 (37) (Annexe 1). Ces analyses ont permis de mettre en évidence la perte de la mutation T790M sur le séquençage ciblé lors de la progression sous osimertinib avec l'apparition d'une amplification des gènes HER2 (MR 01) et MET (MR 07) par hybridation génomique comparative. Le séquençage ciblé de l'ADN tumoral circulant réalisé pour MR 07 a mis en évidence la mutation connue au diagnostic, EGFR L858R, et l'absence de la mutation EGFR T790M. L'émergence des pilotes oncogéniques, HER2 et MET, par amplification, tous deux indépendants de la cible EGFR, ont été décrits comme de potentiels mécanismes de résistance à l'osimertinib. Ces résultats complémentaires à la littérature (38,39) ont aussi permis de démontrer l'existence d'une hétérogénéité intra tumorale par la présence de sous clones exprimant la mutation T790M avec une évolution spatiale et temporelle différente. Une patiente (MR 48) de 57 ans, non fumeuse stricte, présentant un adénocarcinome bronchique métastatique muté EGFR avec une délétion de l'exon 19 a eu une biopsie dans le cadre de

l'essai MOSCATO 01 après 5 lignes de traitement (carboplatine / paclitaxel, erlotinib, pemetrexed (un cycle avec mauvaise tolérance cutané), reprise de l'erlotinib, rociletinib (ITK anti-EGFR de troisième génération) dans le cadre d'un essai de phase I, et afatinib (ITK anti-EGFR de deuxième génération)). Cette biopsie MOSCATO 01 a permis de mettre en évidence la mutation EGFR T790M sur le séquençage ciblé et le séquençage de l'ARN, raison pour laquelle la patiente a été traitée par osimertinib dans le cadre de l'Autorisation Temporaire d'Utilisation après deux cycles de paclitaxel / bevacizumab. Avec une réponse partielle comme meilleure réponse et un contrôle de la maladie pendant une durée de neuf mois, une biopsie dans le cadre de l'essai MATCH R a identifié un transcrit de fusion KIF5B/RET, la délétion de l'exon 19 du gène EGFR et l'absence de mutation EGFR T790M sur le séquençage de l'ARN. L'analyse de la biopsie liquide n'a pas mis en évidence de mutations. Des modèles de lignées cellulaires et PDX ont été initiés afin de déterminer sur le plan moléculaire le mécanisme de résistance exact par KIF5B/RET, sans succès. La patiente a ensuite été traitée par la combinaison necitumumab (anticorps monoclonal anti-EGFR) / pembrolizumab (anticorps monoclonal anti-PD1) dans le cadre d'un essai de phase I. Après un cycle, la patiente a développé une pneumopathie immuno-allergique d'origine médicamenteuse et l'erlotinib a été repris avec une stabilité comme meilleure réponse pendant trois mois. Devant une progression de la maladie, la présence du transcrit KIF5B/RET et la délétion de l'exon 19 du gène EGFR, l'erlotinib a été associé au ponatinib, ITK anti-RET (40–42), avec un contrôle de la maladie pendant 12 mois et une stabilité comme meilleure réponse. Ce transcrit KIF5B/RET pourrait être un mécanisme de résistance potentiel à l'osimertinib chez cette patiente.

2. Résistance aux inhibiteurs de tyrosine kinase anti-ALK

Un total de quatre patients étaient traités par un ITK anti-ALK, de première génération (crizotinib, n =2), de deuxième génération (ceritinib, n =1) et de troisième génération (lorlatinib, n=1). A partir du séquençage de l'exome entier d'un patient présentant un adénocarcinome bronchique métastatique transloqué ALK traité par lorlatinib en deuxième ligne (MR 57) et initialement pré traité par crizotinib, nous avons détecté la mutation ALK C1156Y de résistance au crizotinib (34). Cependant cette mutation C1156Y n'était pas à l'origine de la résistance au lorlatinib reçu après le crizotinib. Le séquençage ciblé de l'ADN tumoral circulant a mis en évidence une mutation PI3K E542K avec une fréquence allélique à 9%, non retrouvée sur l'analyse par séquençage de l'exome entier réalisé a posteriori sur le bloc au diagnostic crizotinib naïf. Chez une autre patiente (MR 53) traitée par crizotinib pour un adénocarcinome bronchique métastatique transloqué ALK, nous avons retrouvé trois mutations à partir du séquençage de l'exome entier: KMT2D Q3929H, NTRK2 H377D / H364. Il n'y a pas eu de tentative de lignées ni de PDX pour cette patiente. L'analyse sur biopsie liquide n'a pas mis en évidence de mutations. Enfin, à partir des résultats d'un patient (MR 20) présentant un adénocarcinome bronchique métastatique avec une translocation EZR/ROS1 traité par crizotinib, nous avons découvert deux nouvelles mutations de résistance du gène ROS1 S1986Y/F, non retrouvées sur le séquençage ciblé sur l'ADN tumoral circulant. Ces résultats ont été publiés dans le journal Clinical Cancer Research en 2016 (Annexe 2) et seront décrits dans le paragraphe III.c.2.d. .

3. Résistance aux inhibiteurs de tyrosine kinase anti-MET

Deux patients présentant une altération du gène MET (MR11 : amplification, MR 12 : mutation D1028H) ont été traité par crizotinib (43–46). La mutation D1028H située au niveau de l'exon 14 du site donneur d'épissage du gène MET est une cible thérapeutique du crizotinib (47). Le patient MR12 suivi pour un adénocarcinome bronchique métastatique était inclus dans l'essai MOSCATO 01 et a été traité par crizotinib suite à la découverte de la mutation MET D1028H sur les résultats du séquençage ciblé et du séquençage de l'ARN. Après une réponse partielle à -56% sous crizotinib, le patient a développé une progression pulmonaire et a été biopsié dans le cadre de l'essai MATCH R. Le séquençage ciblé et le séquençage de l'ARN ont permis de mettre en évidence la persistance de la mutation MET D1028H avec une diminution de la fréquence allélique (6 % post crizotinib versus 18% pré crizotinib) et l'apparition d'une nouvelle mutation EGFR L861R. L'hybridation génomique comparative a montré l'apparition d'une amplification EGFR, initialement absente sur l'hybridation génomique comparative de la biopsie MOSCATO 01. Aucune mutation n'a été mise en évidence sur le séquençage ciblé de l'ADN tumoral circulant. Ces résultats ont été publiés dans le Journal of Thoracic Oncology en 2015 (Annexe 3) (48). D'autre part, le patient MR 11 suivi pour un adénocarcinome bronchique métastatique, a été biopsié une première fois dans le cadre de l'essai MOSCATO 01 après deux lignes de traitement par cisplatine / pemetrexed / bevacizumab, et erlotinib. Suite à la présence d'une amplification MET retrouvée sur l'hybridation génomique comparative, le patient a été traité pendant douze mois par un premier inhibiteur de MET, SAR124844, dans le cadre d'un essai de phase I,

avec une réponse partielle initiale à -46% selon les critères RECIST 1.1. Lors de la progression de la maladie sous SAR124844, le patient a été biopsié une seconde fois dans le cadre de l'essai MOSCATO 01. La biopsie a été réalisée au niveau d'une lésion en progression. Le séquençage ciblé a permis de mettre en évidence un variant ERBB3 de pathogénicité inconnu, et le séquençage de l'exome entier a montré la persistance de l'amplification MET. Il n'y a pas eu d'hybridation génomique comparative réalisée. Le patient a ensuite été traité par un second inhibiteur de MET, le crizotinib, avec un contrôle de la maladie pendant douze mois et une réponse partielle à -25% selon les critères RECIST 1.1 comme meilleure réponse. Le patient a été inclus dans l'essai MATCH R lors de la progression sous crizotinib. Les analyses moléculaires de la biopsie d'une lésion en progression ont montré la persistance du variant ERBB3, sur le séquençage ciblé et le séquençage de l'ARN, sans signification dans la résistance au crizotinib dans ce cas. Nous avons pu mettre en évidence la perte de l'amplification de MET sur l'hybridation génomique comparative lors de la progression sous crizotinib. L'analyse de la biopsie liquide n'a pas retrouvé de mutations.

D. Résultats des cas individuels

Les cas individuels par thérapie ciblée ont été rapportés dans le tableau 2. Ces cas représentent un total de huit patients avec une histologie variée. Une double biopsie sur la lésion progressive et la lésion stable a été réalisée chez deux patients. Ces résultats ont montré une hétérogénéité des analyses réalisées pré et post thérapie ciblée. Les fréquences alléliques (FA) ont été rapportées lorsque les analyses pré et post thérapie ciblée étaient comparables.

Tableau 2. Résultats moléculaires des cas individuels

Patient	Histologie	Mutations pré TC	Analyse pré TC	TC	Mutations post TC (variants pathogènes)		Analyse post TC
MR 03	Adénocarcinome bronchique	BRAF V600E	Séquençage direct	Dabrafenib/ Trametinib	BRAF V600E, IDH1 R132C, TP53		Séquençage ciblé
					BRAF V600E, IDH1 R132C, TP53		Séquençage de l'exome entier
MR 05	Carcinome de l'endomètre	KRAS G12D (FA 62%)	Séquençage ciblé MOSCATO (M388)	Pimasertib/ MDM2 i	KRAS G12D (FA 62%), CTNNB1, délétion PTEN		Séquençage ciblé
					KRAS G12D (FA 59%), CTNNB1, délétion PTEN		Séquençage de l'exome entier
MR 10	Carcinome adénoïde kystique	NOTCH1	Présélection phase I	Notch i	NOTCH 1		Séquençage ciblé
MR14	Adénocarcinome bronchique	CTNNB1	Séquençage direct	Évérolimus	SD	CTNNB1	Séquençage ciblé
						CTNNB1, BRAF délétion exon 12	Séquençage de l'exome entier
					PD	CTNNB1	Séquençage ciblé
						Pas de mutations	Séquençage de l'exome entier
MR15	Carcinome urothélial de l'uretère	FGFR3 S249C, PI3KCA E745A	Présélection phase I	Erdafitinib	SD	FGFR3 S249C, TP53	Séquençage ciblé
						FGFR3 S249C, PI3KCA E745A KDMD6A, STAG2	Séquençage de l'exome entier
					PD	FGFR3 S249C	Séquençage ciblé

					FGFR3 S249C, PI3KCA E745A, KDMD6A, STAG2	Séquençage de l'exome entier
MR 25	Cholangio-carcinome	IDH1 R132C (FA 27%)	Séquençage ciblé MOSCATO 01 (M642)	Ivosidenib	IDH1 R132C (FA 22%)	Séquençage ciblé
MR 30	Carcinome urothélial de vessie à composante sarcomatoïde	PI3KCA E542K (FA 8%) (Séquençage ciblé), VPI (Séquençage de l'ARN)	Séquençage ciblé et séquençage de l'ARN MOSCATO 01 (M797)	PI3K i/ Gemcita-bine	PI3KCA E542K (FA 26%), TP53, NEF2L2	Séquençage ciblé
					PI3KCA E542K (FA 27%), TP53, NEF2L2	Séquençage de l'exome entier, séquençage de l'ARN
MR 51	Carcinome de l'ovaire à petites cellules	SMARCA4	Présélection phase I	Tazemeto-stat	Pas de mutations	Séquençage ciblé

E. Cas cliniques

1. MR 20 : émergence de deux nouvelles mutations de résistance

ROS1 S1986 Y / F au crizotinib

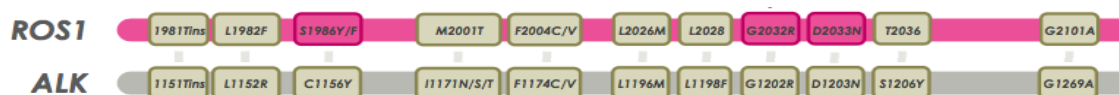
Le cas clinique du patient MR 20 a été publié dans le journal Clinical Cancer Research en 2016 (Annexe 2) (49).

Différentes fusions du gène ROS1 ont été identifiées dans les CBNPC (50,51). Environ 2% des CBNPC présentent un réarrangement du gène ROS1 (52). Le traitement standard de ces CBNPC ALK réarrangés est le crizotinib avec un taux de réponse de 72% et une survie sans progression de 19.2 mois (53). Plusieurs mutations de résistance au crizotinib ont été identifiées sur le gène ROS1 comme G2032R et D2033N (54,55). Nous décrivons ici le cas d'un patient non fumeur strict, de 63 ans, suivi pour un adénocarcinome bronchique métastatique pleural avec atteinte ganglionnaire, non muté EGFR, KRAS,

PI3K, BRAF ni HER2, sans translocation ALK, traité en première ligne dans le cadre d'un essai clinique de phase I évaluant un inhibiteur de PARP en association au cisplatine / gemcitabine. Une biopsie pleurale dans le cadre de l'essai MOSCATO 01 a été réalisée lors de la progression après une deuxième ligne par pemetrexed. Le séquençage ciblé n'a pas mis en évidence de mutation ; une délétion du gène ROS1 a été détectée sur l'hybridation génomique comparative ainsi qu'un transcrit de fusion EZR / ROS1 sur le séquençage de l'ARN. La présence de ce transcrit de fusion est la raison pour laquelle le patient a été traité par crizotinib ayant permis une réponse partielle comme meilleure réponse, avec un contrôle de la maladie pendant vingt-deux mois. Une biopsie pulmonaire a été réalisée au moment de la progression sous crizotinib dans le cadre de l'essai MATCH R. Le séquençage de l'exome entier a mis en évidence l'apparition de deux nouvelles mutations du gène ROS1 S1986Y et S1986F (18% et 17% de fréquence allélique respectivement) (figure 6), non retrouvées sur le séquençage ciblé réalisée sur l'ADN tumoral circulant. Ces résultats ont permis *in vitro* le développement de nouveaux modèles de lignées cellulaires sauvages pour EZR-ROS1, et exprimant les mutations de résistance ROS1 G2032R (54), et S1986Y / S1986F à partir des cellules du patient. Les tests de viabilité cellulaires sous crizotinib, céritinib et lorlatinib ainsi que les western blots des protéines impliquées dans la voie de signalisation induite par ROS1 ont montré la résistance des clones S1986F, S1986Y au crizotinib et leur sensibilité au lorlatinib. Nous avons ainsi mis en évidence deux nouvelles mutations secondaires de résistance au crizotinib dont le mécanisme est l'empêchement de la fixation du crizotinib dans le domaine kinase de ROS1. Suite à ces résultats, le lorlatinib a été prescrit dans le cadre d'un essai de phase II (NCT 01970865) avec une réponse complète comme meilleure

réponse, maintenue jusqu'à présent (de Décembre 2015 à Juillet 2017).

Figure 6. Cas clinique MR 20 : Structure des gènes ROS1 et ALK et mutations de résistance (49)



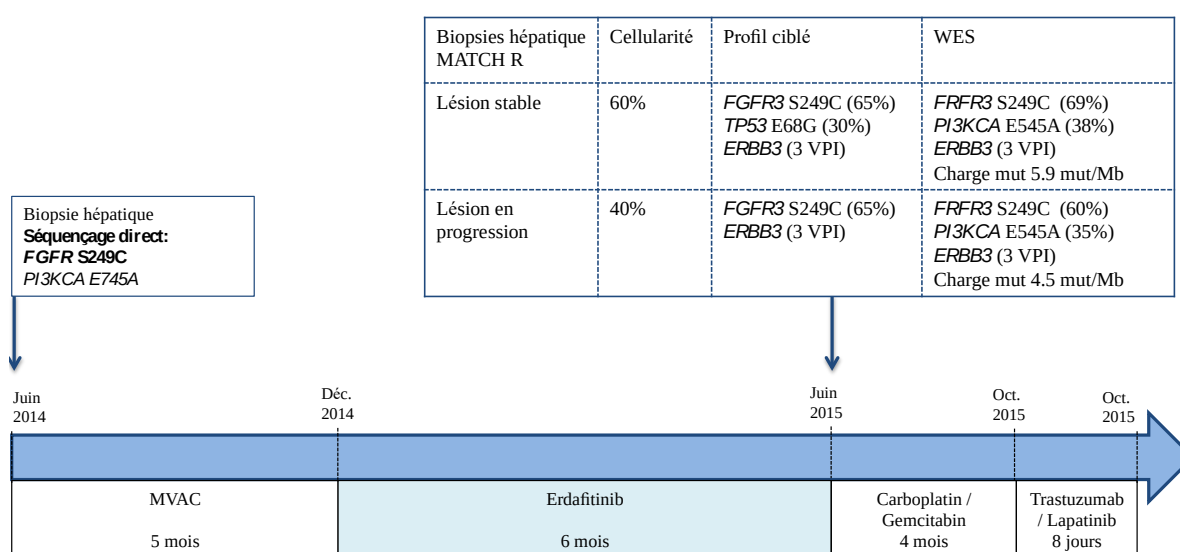
2. MR15 : activation de l'EGFR et des voies de signalisation associées dans la résistance à l'erdafitinib

Les altérations moléculaires du gène FGFR surviennent dans environ 7% des cancers dont 66% sont des amplifications et 26% des mutations (56). Ces altérations sont le plus fréquemment retrouvées dans les carcinomes urothéliaux (anomalie du gène FGFR3) (56,57). Nous rapportons le cas d'une patiente (MR 15) âgée de 56 ans, non fumeuse, atteinte d'un carcinome urothélial de l'uretère métastatique. Dans le cadre d'une présélection protocolaire d'un essai clinique de phase I, un séquençage direct réalisé sur la pièce tumorale au diagnostic a mis en évidence les mutations des gènes FGFR S249C

et PI3KCA E545A (figure 7). La patiente a été traitée en première ligne par MVAC (méthotrexate, vinorelbine, adriamycine et cisplatine) pendant cinq mois. Lors de la progression, la patiente a été incluse dans un essai de phase I évaluant l'erdafitinib, ayant permis une stabilité comme meilleure réponse. A six mois de traitement par erdafitinib, la patiente a progressé au niveau hépatique et a été incluse dans l'essai MATCH R avant de débiter une nouvelle ligne de traitement. Une double biopsie a été réalisée sous échographie au niveau d'une lésion hépatique stable et d'une lésion hépatique en progression. Le séquençage ciblé et le séquençage de l'exome entier n'ont pas mis en évidence de différences moléculaires entre la lésion stable et la lésion progressive. Le séquençage ciblé sur l'ADN tumoral circulant a permis de retrouver la mutation FGFR S249C avec une fréquence allélique à 69%. Afin d'explorer un mécanisme de résistance aux ITK anti-FGFR par activation de l'EGFR décrit *in vitro* par ARN interférence (58), nous avons réalisé des analyses sur les lignées cellulaires cultivées en présence d'erdafitinib à partir des échantillons tumoraux de la patiente. Nous avons développé une lignée cellulaire à partir de la lésion en progression, résistante à l'erdafitinib et à un autre ITK anti-FGFR en développement clinique, le BGJ398. La combinaison de l'erdafitinib au gefitinib a permis de restaurer la sensibilité des cellules résistantes à l'erdafitinib seul ou au gefitinib seul. L'activation de la voie EGFR a été confirmée sur des analyses de western blot. Nous avons observé l'expression de la protéine EGFR phosphorylée en présence d'erdafitinib seul et des protéines AKT et ERK phosphorylées en présence d'erdafitinib ou de gefitinib. Lorsque les cellules étaient traitées par la combinaison erdafitinib / gefitinib, les western blots réalisés après extraction protéique ont montré une diminution de l'expression des protéines EGFR, AKT et ERK phosphorylées. Nous

avons, par cet exemple, validé *in vitro* à partir de cellules dérivées de patients et en présence d'ITK anti-FGFR utilisés en clinique, le mécanisme des voies de contournement par activation de la voie EGFR.

Figure 7. Cas clinique MR 15 : Evaluation clinique incluant l'historique des traitements reçus et les analyses moléculaires



3. MR 03 : apport de l'épigénétique par la mutation IDH1 R132C dans la résistance au dabrafenib

Les mutations BRAF surviennent dans environ 3% des CBNPC dont plus de 50% sont des mutations BRAF V600E (59–62) . Le traitement recommandé est l'association du dabrafenib et du trametinib dont l'étude de phase II a permis de montrer un taux de réponse de 63% (63). Nous décrivons ici le cas d'un patient âgé de 75 ans, non fumeur, atteint en 2012 d'un adénocarcinome bronchique pT3N3M0 traité en première ligne par carboplatine / pemetrexed avec une stabilité de la maladie comme meilleure réponse ; suivi d'un traitement par erlotinib de maintenance (figure 8). Lors de la progression de la maladie, le patient a ensuite été traité par deux lignes de chimiothérapies (docetaxel et gemcitabine). Une biopsie pulmonaire, pour réalisation d'un profil moléculaire, a permis de mettre en évidence par séquençage direct une mutation BRAF V600E et l'absence de mutations EGFR, KRAS, HER2, PI3KCA, ainsi que l'absence de translocation ALK. Le patient a alors été inclus dans un essai de phase I et traité par dabrafenib / trametinib en combinaison, avec une réponse complète des lésions cibles comme meilleure réponse et un contrôle de la maladie pendant un total de quatorze mois. Lors de la progression sous dabrafenib / trametinib, le patient a été inclus dans l'essai MATCH R et biopsié au niveau d'une lésion en progression (figure 9). Le séquençage ciblé a montré la persistance de la mutation BRAF V600E à 22% de fréquence allélique, la présence d'une mutation TP 53 H179R, avec une fréquence allélique à 26%, et d'une mutation IDH1 R132C, avec une fréquence allélique à 22%. Le séquençage de l'ARN a confirmé ces résultats. Rétrospectivement le séquençage direct IDH1 a été réalisé sur l'échantillon disponible avant dabrafenib / trametinib et n'a pas mis en évidence de mutations.

IDH1 est une enzyme isocitrate déshydrogénase. Mutée, IDH1 modifie son activité catalytique et entraîne une accumulation de 2-hydroxyglutarate (2HG) au lieu de alpha-ketoglutarate (α KG). Le 2HG inhibe les histones lysine déméthylases (KMD) et maintient l'ADN hyperméthylé, impliquant son rôle dans la tumorigenèse (64). Des modifications épigénétiques pourraient être une des hypothèses de résistance aux thérapies ciblées chez ce patient. Un autre cas similaire a été identifié parmi les patients inclus dans l'essai MOSCATO 01. Il s'agissait d'une patiente (M750) de 72 ans, fumeuse à 10 paquet-année, présentant un adénocarcinome bronchique métastatique muté BRAF V600E au diagnostic, sans mutations EGFR ni KRAS, ni de réarrangements ALK. La patiente a été traitée en première ligne par carboplatine / pemetrexed avec une progression de la maladie comme meilleure réponse et a reçu une deuxième ligne de traitement par dabrafenib en monothérapie ayant permis un contrôle de la maladie pendant 27 mois. Une biopsie réalisée dans le cadre de l'essai MOSCATO 01 lors de la progression sous dabrafenib a mis en évidence la présence d'une mutation IDH1 R132C sur le séquençage ciblé et le séquençage de l'exome entier. En raison d'une faible cellularité sur le bloc au diagnostic, aucune analyse n'a pu être réalisée rétrospectivement pour vérifier le statut IDH1 initial.

Figure 8. Cas clinique MR 03 : Evaluation clinique incluant l'historique des traitements reçus et évaluations radiologiques

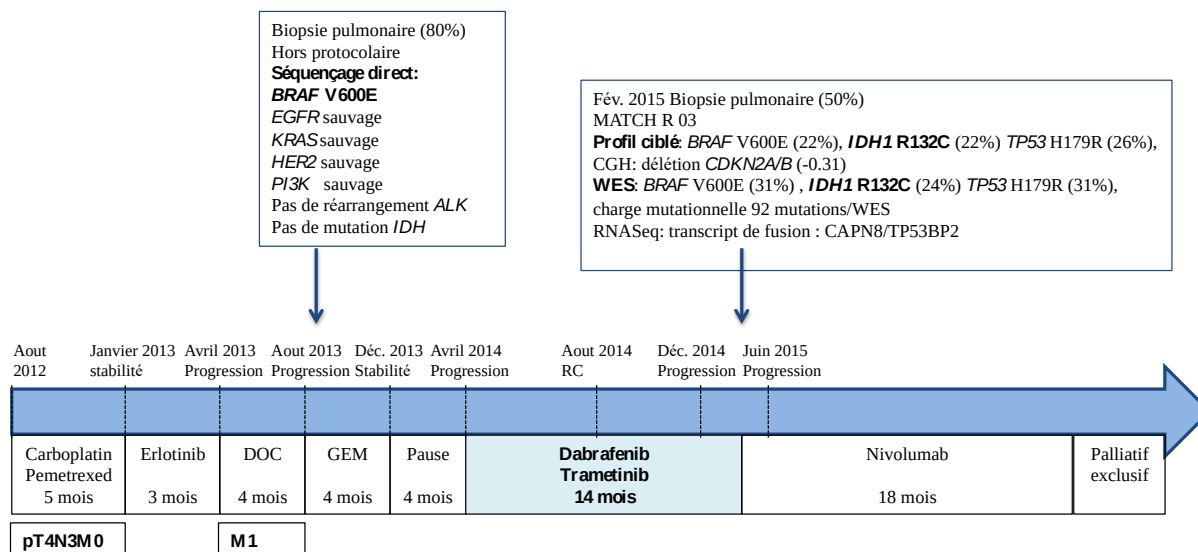
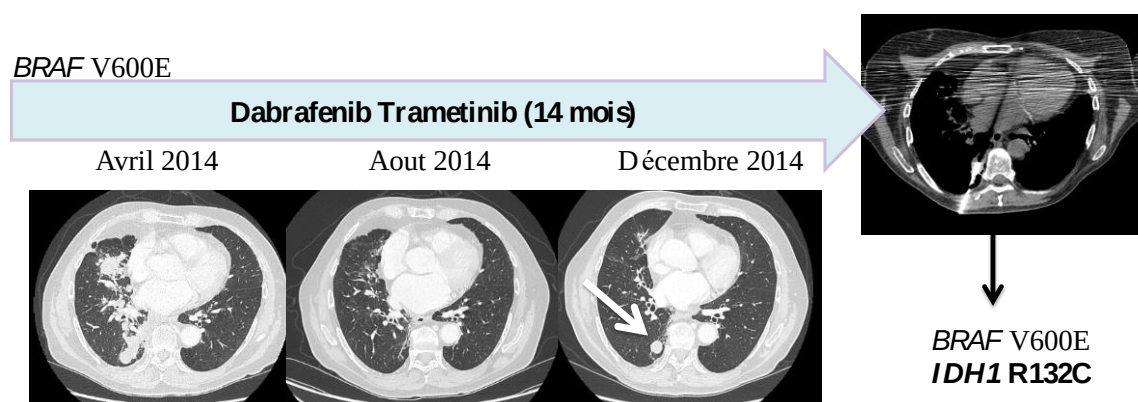


Figure 9. Cas clinique MR 03 : Imageries radiologiques (TDM thoracique) réalisées avant (Avril 2014), à 4 mois (Aout 2014) et à 8 mois (Décembre 2014) de traitement par dabrafenib / trametinib



IV. Discussion

Ces résultats préliminaires de l'étude MATCH R ont permis de mettre en évidence en différents mécanismes de résistance par l'apport d'analyses moléculaires et d'études translationnelles *in vitro*. Cette étude suggère que l'utilisation d'outils génomiques haut débit est clef pour identifier de nouvelles anomalies moléculaires et déterminer leur rôle dans l'évolution de l'addiction oncogénique. De plus, l'apport translationnel par la réalisation de lignées *in vitro* a montré l'importance de la validation scientifique d'un

nouveau mécanisme de résistance par la réalisation de nouveaux modèles afin d'anticiper la réflexion à une nouvelle stratégie thérapeutique.

A. Mécanismes de résistance dépendants de la cible

Malgré des durées de réponses supérieures à celles avec les chimiothérapies, les thérapies ciblées ont une efficacité limitée par le développement d'une résistance acquise à l'origine de la progression de la maladie. Cette résistance peut affecter plusieurs voies moléculaires par l'émergence de nouvelles altérations spécifiques à la résistance aux thérapies ciblées.

1. Mutations secondaires

Les mutations de résistance interviennent au niveau du gène cible et empêchent l'action des thérapies ciblées sur ce dernier.

a. T790M : mutation de résistance aux inhibiteurs de tyrosine kinase anti-EGFR de première génération

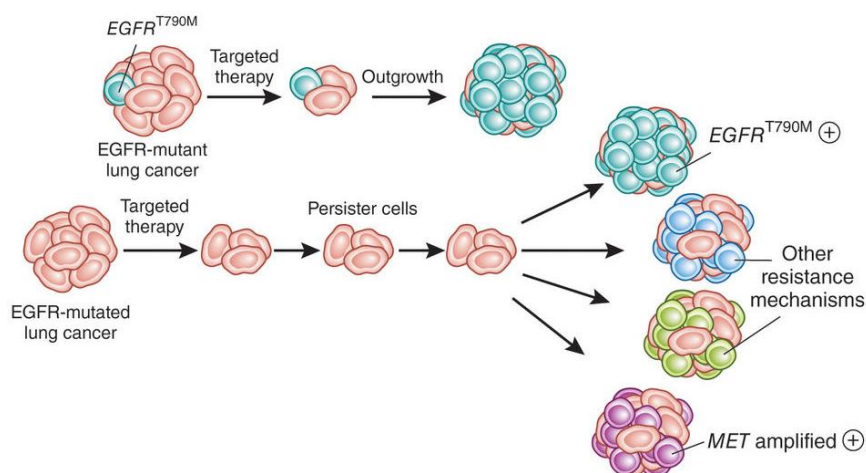
La mutation T790M est la mutation la plus fréquente (environ 60%) de résistance aux ITK anti-EGFR de première génération dans les CBNPC métastatiques (14–16). Cette mutation consiste en une substitution de la thréonine en méthionine au niveau de la position 790 du gène EGFR. En raison de sa forte affinité à l'ATP, la mutation T790M empêche l'interaction des ITK anti-EGFR de première génération au niveau de la poche à ATP du récepteur EGFR (13,65). Sous afatinib, un ITK anti-EGFR de deuxième génération, les taux de réponse post erlotinib ou gefinitib sont entre 8.2% et 13.2% seulement (66,67). L'osimertinib est un ITK anti-EGFR irréversible et sélectif pour les

mutations de sensibilité aux ITK anti-EGFR de première génération et pour la mutation de résistance T790M (68) a été approuvé en seconde ligne après erlotinib ou gefitinib dans les CBNPC métastatiques, avec un taux de réponse de 71% (17,18).

Dans cette étude MATCH R, nous avons mis en évidence la présence de la mutation T790M chez deux patients sur trois ayant progressés sous erlotinib ou gefitinib.

Développées à partir du mécanisme de résistance par la mutation secondaire a l'osimertinib EGFR T790M, deux approches de l'évolution de la résistance ont été rapportées (figure 10) (69). La première approche est celle d'une résistance secondaire acquise par la préexistence de clones mutés T790M à l'origine d'une rechute précoce, ou par l'acquisition d'une mutation T790M *de novo* à l'origine d'une rechute tardive (70). La seconde approche est celle de l'acquisition de mécanismes de résistance par les voies de contournement (71) différents de T790M.

Figure 10. Evolution de la résistance acquise aux thérapies ciblées (69)



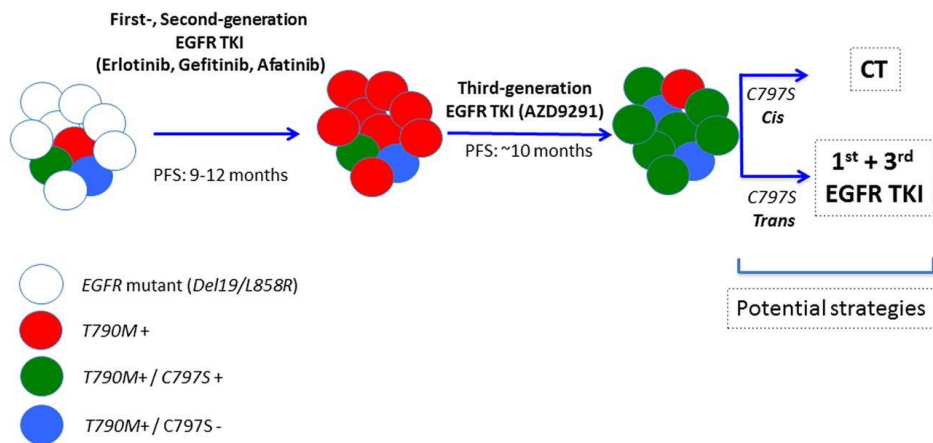
b. C797S : mutation de résistance aux inhibiteurs de tyrosine kinase anti-EGFR de troisième génération

De la même manière, la mutation secondaire EGFR C797S de résistance à l'osimertinib a été rapportée (19,72). Sur le plan clinique, la mutation C797S a initialement été identifiée par séquençage ciblé à partir de l'ADN tumoral circulant de patient et confirmé par PCR digitale sur une plus grande cohorte (19). Sur le plan génétique, il s'agit d'un changement d'une cystéine en sérine au niveau de la position 797 du domaine kinase du gène EGFR. L'acide aminé C797 est localisé sur le gène EGFR de manière opposée à T790 au niveau de la poche à ATP. C797 est indispensable au mécanisme d'action de l'osimertinib puisqu'il permet la liaison covalente avec les ITK anti-EGFR de troisième génération (73). Une mutation au niveau de C797 induit systématiquement une résistance

aux ITK anti-EGFR de troisième génération. Lorsque les mutations C797S et T790M ne sont pas situées sur le même allèle, soit en trans, la combinaison d'un ITK anti-EGFR de première génération associée à un ITK anti-EGFR de troisième génération permet de lever la résistance *in vitro* (figure 11) (73,74).

Dans l'étude MATCH R, nous avons montré un cas de mutation C797S associé à la mutation T790M chez un patient traité par osimertinib à partir de l'analyse du séquençage de l'exome entier. Les fréquences alléliques respectives étaient de 12% et 23% et la configuration en cis a malheureusement été identifiée.

Figure 11. Représentation des mutations EGFR T790M et C797S en cis et en trans, et stratégie thérapeutique adaptée (74)



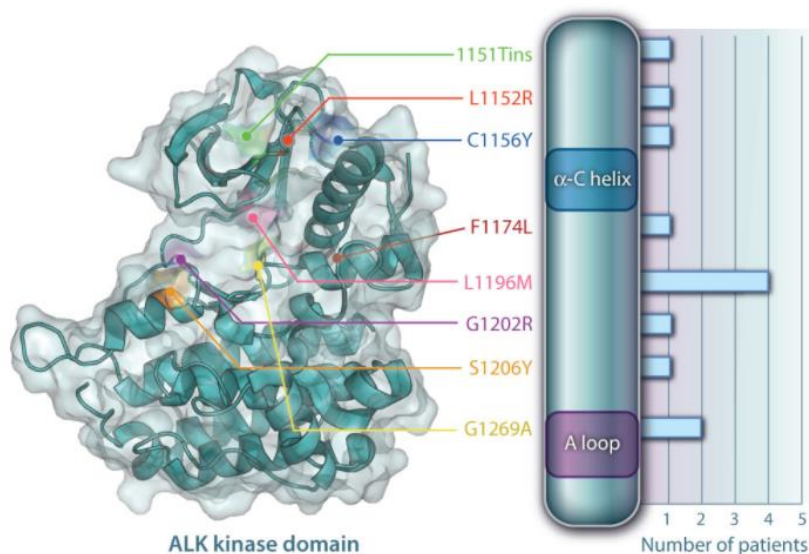
c. Mutations de résistance acquise aux inhibiteurs de tyrosine kinase anti-ALK

L'alectinib, un ITK sélectif anti-ALK de deuxième génération, a été désigné thérapie innovante par la FDA suite aux résultats de l'étude J-ALEX qui a montré en première ligne dans les CBNPC métastatiques transloqués ALK, une amélioration significative de la survie sans progression (non atteinte avec l'alectinib versus 11.1 mois avec le crizotinib) (75). Plusieurs mutations de résistance au crizotinib ont été rapportées sur le gène ALK dont la plus fréquente est L1196M (figure 12). Ces mutations ponctuelles présentes au niveau du domaine kinase du gène ALK ont lieu soit par substitution d'un nucléotide par un autre soit par insertion (exemple de 1151Tins). De plus, le mécanisme de résistance de la mutation ALK L1196M est comparable à celui de la mutation EGFR T790M secondaire à l'osimertinib. La position L1196 sur le gène ALK est similaire à la position T790 située au niveau de la poche ATP du gène EGFR. De ce fait lorsque cet acide aminé est muté, l'interaction entre la poche ATP et les ITK ne peut avoir lieu rendant cette mutation à l'origine de la résistance (34). D'autres mutations secondaires ont été mises en évidence par exemple C1156Y au niveau du gène ALK qui se trouve à proximité de l'hélice alpha interférant avec le site de liaison des ITK anti-ALK (34).

Dans l'étude MATCH R, nous avons caractérisé deux nouvelles mutations de résistance au crizotinib au niveau du gène ROS1 : S1986Y/F (49). Il existe d'autres mutations de résistance secondaire au crizotinib, G2032R et D2033N (54,55). En raison de la forte similitude des domaines kinase des gènes ALK et ROS1, C1156Y correspond à la mutation S1986Y ou S1986F. De cette manière, nous avons permis la réalisation d'un modèle de prédiction de sensibilité aux ITK anti-ALK de première, deuxième et

troisième génération (76,77).

Figure 12. Représentation des mutations du gène ALK de résistance aux inhibiteurs de tyrosine kinase anti-ALK (78)



d. Mutations de résistance acquise aux inhibiteurs de tyrosine kinase anti-FGFR

Plusieurs altérations des différents récepteurs FGFR ont été décrites dans les tumeurs solides (56,57). En fonction des altérations retrouvées, les mécanismes de résistance aux ITK anti-FGFR sont différents. Des mutations de résistance au niveau du domaine kinase de FGFR2 ont été identifiées dans les cholangiocarcinomes présentant une translocation FGFR2 et traités par BGJ398, sur le séquençage ciblé de l'ADN tumoral circulant et le séquençage de l'exome entier et de l'ARN à partir de biopsies tissulaires. La mutation FGFR2 V564F est une mutation de résistance aux ITK anti-FGFR dont le mécanisme est l'activation d'un changement de conformation stérique empêchant l'interaction du

BGJ398 au récepteur FGFR2 (79).

Dans l'étude MATCH R, nous n'avons pas identifié de mutations secondaires de résistance à l'erdafitinib chez une patiente présentant un carcinome urothélial de l'uretère métastatique muté FGFR3 S249C. Cependant, nous avons retrouvé un autre mécanisme de résistance à l'erdafitinib, qui est l'activation de l'EGFR jouant le rôle de voies de contournement.

2. Amplification du gène cible

L'amplification du gène cible est un autre mécanisme de résistance dépendant de la cible puisque la cible elle-même se retrouve surexprimée de façon tellement importante que les ITK ne parviennent plus à inhiber toutes les copies (20,21). L'amplification du gène ALK est retrouvée dans environ 10% des résistances au crizotinib (80) et peut coexister avec des mutations secondaires du gène ALK orientant vers une résistance multifactorielle au niveau du gène cible (mutations, amplifications) sous pression thérapeutique.

B. Mécanismes de résistance indépendants de la cible

1. Activation des voies de signalisation alternatives

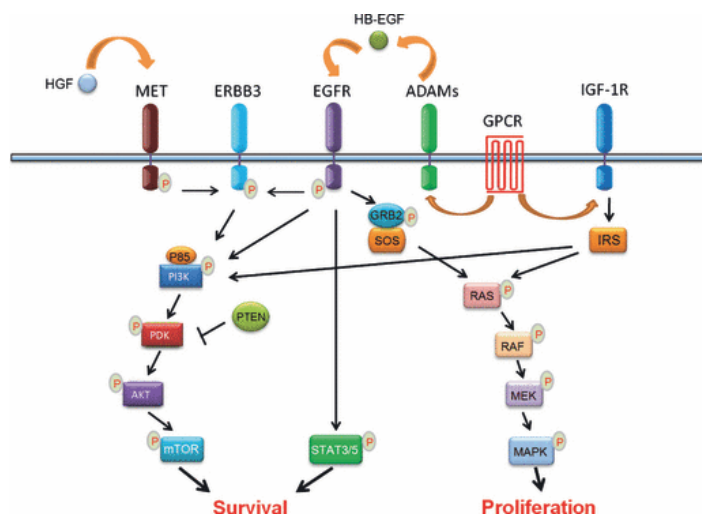
L'activation de l'EGFR par son ligand active les voies de signalisation associées telles que PI3K/AKT et RAS/RAF/MEK, qui ont un rôle dans la survie et la prolifération cellulaire (figure 13) (81). Les voies de signalisation associées à l'EGFR peuvent aussi être activées par d'autres récepteurs, par exemple MET, ERBB3 ou IGF1R. Le mécanisme de voies de contournement implique l'activation des voies de signalisation

par d'autres kinases malgré l'inhibition de la cible (25). Par exemple, lorsque MET est amplifié, la voie de signalisation PI3K/AKT reste activée par l'intermédiaire de ERBB3 et permet la survie cellulaire (81). Ce mécanisme d'amplification du gène MET a été identifié dans environ 20% des CBNPC résistants aux ITK anti-EGFR de première génération (15,16,22–24,82). Quelques cas d'amplifications de MET ont été rapportés dans la résistance aux ITK anti-EGFR de troisième génération (37–39). De manière similaire, ce processus a été identifié *in vitro* dans la résistance aux ITK anti-FGFR (83,84). Permettant l'activation de l'EGFR, l'amplification du gène HER2 a aussi été décrite dans la résistance aux ITK anti-EGFR de première génération dans environ 13% des CBNPC (16,85) et rapportée dans la résistance aux ITK anti-EGFR de troisième génération (37–39). D'autre part, les mutations des gènes en aval de la cible, par exemple PI3K E545K, induisent aussi l'activation de la voie PI3K/AKT. Ces mutations PI3K ont été identifiées dans la résistance aux ITK anti-EGFR de première génération (15,86). *In vitro*, la mutation PI3K E545K induit l'expression de la forme phosphorylée de AKT dans des lignées résistantes au gefitinib. D'autre part, ALK active également les voies de signalisation PI3K/AKT et STAT3. L'activation de l'EGFR a été décrite dans la résistance au crizotinib (21,87). L'activation de cette voie a été identifiée initialement *in vitro* avec l'expression des protéines phosphorylées MET, EGFR et IGF-1R. La résistance était levée lorsque les cellules étaient traitées par un anti-EGFR associé au crizotinib (21). De même, la mise en évidence de l'activation de l'EGFR par l'expression de sa protéine phosphorylée a été rapportée dans l'échappement des cancers mutés FGFR3 (58). La combinaison gefitinib / anti-FGFR permettait de restaurer la sensibilité aux anti-FGFR *in vivo*.

D'autres mécanismes de résistance aux ITK anti-EGFR de première génération ont été rapportés activant la voie de signalisation RAS/RAF/MEK en aval de EGFR tels que les mutations BRAF G469A et V600E (1%) (88), la baisse d'activité des protéines NF1 (89) et IGFBP3 (protéine de liaison de IGF1) (90,91), l'activation de FGFR1 (92) et d'AXL (93). Cette voie RAS/RAF/MAK était aussi retrouvée activée par la présence de l'amplification de NRAS et l'activation de la protéine AKT dans la résistance aux anti-FGFR (84,94).

Nous avons rapporté dans l'étude MATCH R ce mécanisme de voies de contournement par l'activation d'EGFR chez une patiente présentant un carcinome urothélial de l'uretère muté FGFR S249C traitée par erdafitinib. Cette voie de contournement a été identifiée *in vitro* sur des lignées établies à partir de la lésion progressive, alors qu'il était absent sur les analyses des lignées établies à partir de la lésion stable. Il est important de noter ici l'intérêt de la double biopsie stable / progression pour suivre l'architecture clonale. Cette évolution moléculaire tumorale confirme l'addiction oncogénique aux voies de signalisation PI3K/AKT et RAS/RAF/MEK à l'origine de la résistance aux thérapies ciblées.

Figure 13. Voies de signalisation associées à l'EGFR (81)



2. Autres mécanismes

a. Transformation histologique

La transition épithéliomato-mésenchymateuse (EMT) est définie par la perte des propriétés épithéliales de la cellule tumorale et le gain de propriétés mésenchymateuses, telles que la perte d'adhésion intercellulaire, la formation de pseudopodes et l'expression de protéines spécifiques (95). La baisse d'activité de la protéine E-Cadherine et l'expression de la vimentine ont été décrites *in vitro* dans la résistance aux ITK anti-EGFR de première génération et anti-FGFR (15,93,96–99). De plus, l'EMT a aussi été rapportée comme un mécanisme de résistance aux thérapies ciblées par l'activation de l'EGFR (100). La tyrosine kinase AXL décrite comme un mécanisme de résistance par

voie de contournement intervient aussi dans l'EMT. L'expression d'AXL est régulée par la vimentine et permet la migration de la cellule tumorale (101).

Lors de la progression de la maladie sous thérapie ciblée, 3% à 14% des CBNPC acquièrent une transformation histologique en carcinome pulmonaire à petites cellules (CPPC) (15,16). Dans certains cas, la mutation EGFR au diagnostic du CBNPC est maintenue lors de la transformation histologique en CPPC (102). Ce mécanisme de résistance n'est pas exclusif et peut être observé associé à d'autres mécanismes tels que les amplifications de MET et les mutations de PI3K. Parmi les cas rapportés, l'évolution décrite de la maladie après transformation en CPPC est très hétérogène (maladie indolente ou progression rapide de la maladie). Le rationnel biologique de cette transformation reste encore peu élucidé. Une des hypothèses est celle d'un événement génétique ou épigénétique à l'origine de cette transformation (15). Le mécanisme moléculaire décrit potentiellement initiateur de cette transformation en CPPC est la perte de RB (25). Ce changement phénotypique est confirmé par la présence de marqueurs neuroendocrine tels que la synaptophysine, chromogranine et CD56. Ce marquage est indispensable pour confirmer le diagnostic et adapter la stratégie thérapeutique.

Dans l'étude MATCH R, nous n'avons pas diagnostiqué de transformation histologique.

b. Résistance à l'apoptose

La protéine BIM de la famille Bcl2 « à BH3 seulement » joue un rôle clef dans l'apoptose. En effet, une des actions de BIM est de se lier aux protéines anti-apoptotiques. En les neutralisant, BIM permet l'induction de l'apoptose. Il a été mis en évidence que le niveau d'expression de la protéine BIM est corrélé à l'apoptose et à la

régression tumorale induite par les thérapies ciblées dans les cancers présentant une anomalie moléculaire cible (103). Lorsque la protéine BIM est peu exprimée ou modifiée, la réponse apoptotique sous thérapies ciblées est altérée à l'origine de la résistance (103–105). La résistance à l'apoptose a été décrite comme un des mécanismes de résistance aux thérapies ciblées.

Dans l'étude MATCH R nous n'avons pas mis en évidence d'altération de l'expression de BIM à l'origine de la résistance aux thérapies ciblées.

c. Modifications épigénétiques

Les altérations épigénétiques sont des modifications de la transcription génique induites par la méthylation de l'ADN et les modifications post traductionnelles des histones, comme la méthylation, via les histones méthyl-transférases (HMT), ou la déacétylation des histones via les histones déacétylase (HDAC). Ces deux processus induisent une répression de l'expression des gènes (106). A partir d'analyses *in vitro*, sur des lignées de cancer du poumon résistantes aux thérapies ciblées, il a été mis en évidence la présence d'altérations chromatinienne impliquant les histones lysine déméthylases, par exemple, KDM5A (90). La méthylation de l'ADN au niveau du promoteur du gène EGFR est un mécanisme de résistance décrit au gefitinib (107,108).

Dans cette étude MATCH R, nous avons rapporté l'apparition d'une mutation IDH1 R132C chez un patient ayant un adénocarcinome bronchique métastatique muté BRAF V600E traité par dabrafenib / trametinib. Cette mutation était absente de la biopsie pré dabrafenib / trametinib sur le séquençage direct. Lorsque IDH1 est mutée, il y a une augmentation du taux de 2HG et les histones lysine déméthylases ainsi que les TET DNA

methytransférases sont inhibées. Les mutations d'IDH1 sont donc associées à un phénotype d'hyper méthylation de l'ADN induisant une répression génique (64). Toutefois l'étude MATCH R ne permet pas de détecter les modifications épigénétiques liés à des méthylations ou acétylations des histones.

C. Limites de l'étude MATCH R

Compte tenu de l'enjeu des analyses moléculaires dans la résistance aux thérapies ciblées, il est essentiel de pouvoir analyser l'échantillon pré thérapie ciblée afin de valider de nouveaux mécanismes de résistance. Après la réalisation de la biopsie au diagnostic, les patients ont souvent été traités par plusieurs lignes de traitement avant d'être inclus dans l'essai MATCH R. L'hétérogénéité tumorale induite par les divisions cellulaires successives, mais aussi les traitements reçus, peuvent biaiser les analyses moléculaires réalisées sur l'échantillon au diagnostic dit de référence avant thérapie ciblée. Ces résultats préliminaires ont montré l'importance du rapatriement du bloc au diagnostic pour permettre la réalisation des analyses moléculaires et la comparaison des résultats. Toutefois, pour certains patients, un échantillon tumoral plus récent était disponible dans le cadre de l'essai MOSCATO 01. Deux des trois blocs MOSCATO 01 disponibles pour nos patients ont été ré analysés par séquençage de l'exome entier pour permettre la comparaison des résultats moléculaires. Le séquençage de l'exome entier a été implémenté à l'essai MOSCATO 01 à partir de 2015. Une biopsie dite de référence, avant que les patients ne débutent la thérapie ciblée, est donc d'un intérêt majeur pour valider scientifiquement les mécanismes de résistance observés.

Un des objectifs de cette étude était de suivre l'architecture clonale tumorale

spatiale sur deux sites ayant eu une évolution tumorale différente sous pression thérapeutique pour distinguer le mécanisme de résistance de la lésion progressive par rapport à la lésion stable. Il est relativement difficile de certifier sans biopsie de référence que la biopsie de la lésion stable n'a pas subi de changements moléculaires génétiques ni épigénétiques. A partir de ces données préliminaires, une double biopsie stable / progression a pu être réalisée pour trois patients seulement (13%). Toutefois, une double biopsie sur deux lésions progressives a été réalisée pour deux patients, confirmant l'hétérogénéité spatiale tumorale (MR 20) (37).

L'expertise radiologique interventionnel a, dans cette étude MATCH R, une place majeure pour permettre une analyse moléculaire adéquate sur un tissu de qualité avec une cellularité relativement suffisante (>30%) où la quantité et la qualité de l'ADN et de l'ARN sont au moins mieux préservés que sur un tissu de faible cellularité. Le taux d'échec de cellularité à 0% était de 8% (2 patients sur 24 patients biopsiés).

Enfin, pour mieux caractériser les mécanismes moléculaires et cellulaires de résistance aux thérapies ciblées au long cours, il aurait été utile de réaliser des biopsies séquentielles après chaque thérapie ciblée administrée. Des biopsies séquentielles dans le cadre de l'essai MATCH R ont été réalisées pour une patiente seulement (MR12). Cette patiente, non fumeuse, suivie pour un adénocarcinome bronchique métastatique était incluse dans l'essai MOSCATO 01 après quatre lignes de traitement. La biopsie MOSCATO a révélé une mutation MET D1028H et la patiente a été traitée par crizotinib en cinquième ligne. A treize mois de crizotinib, une première biopsie MATCH R a été réalisée puis la patiente a été traitée par erlotinib en sixième ligne en raison d'une amplification d'EGFR et d'une mutation EGFR L861 (48). La patiente a ensuite reçu en

septième ligne un traitement par nivolumab, anticorps monoclonal anti-PD1. Une seconde biopsie MATCH R a été réalisée après onze mois de nivolumab. Les hybridations génomiques comparatives de ces trois biopsies ont permis de révéler exclusivement une amplification MDM2, une amplification EGFR et une amplification MET respectivement. Cette hétérogénéité tumorale temporelle est la force de l'addiction oncogénique appuyant l'adaptation moléculaire de la tumeur vers la progression. Les biopsies séquentielles spatiotemporelles avec une analyse moléculaire à partir d'outils génomiques haut débit fait partie intégrante de la réflexion des mécanismes de résistance et de la stratégie thérapeutique à adapter pour chaque patient.

De plus, l'apport de la biopsie liquide dans cette étude a permis de mettre en évidence une mutation dans 38% de patients avec dans un tiers des cas l'apparition d'une nouvelle mutation non connue au diagnostic (n = 2 cas sur 6). Cette technique, facile en pratique puisqu'elle consiste en une prise de sang, et par l'apport du séquençage ciblé sur l'ADN tumoral circulant, devrait être réalisée de façon répétée lors de l'administration de la thérapie ciblée afin de réaliser un suivi dynamique des analyses génomiques et identifier au plus tôt le mécanisme de résistance.

Les résultats préliminaires de l'étude MATCH-R ont démontré que le séquençage haut débit est utile en pratique courante dans la compréhension des mécanismes de résistance aux thérapies ciblées. En effet, nous avons mis en évidence de potentiels mécanismes de résistance dans 30% des cas (n = 8 patients sur 24 inclus, dont 22 ayant eu un profil moléculaire) et orienter la stratégie thérapeutique lorsqu'il était possible (état général du patient, disponibilité de thérapies adaptées aux mécanismes de résistance) dans 63% des cas (n = 5 patients sur 8). En pratique clinique, nous n'avons pas été confronté à

un refus de réalisation de biopsie de la part des patients, une fois consentants. Les patients étaient généralement favorables à la réalisation de biopsies tissulaires et liquides afin de permettre une analyse génomique complète dans le but de comprendre le mécanisme de résistance inévitable sous thérapie ciblée. Les principales difficultés d'acceptabilité de biopsie de la part des patients était le risque de ne pas identifier de mécanisme de résistance et quand bien même un mécanisme de résistance aurait été découvert, l'absence d'orientation thérapeutique adéquate *in fine* était un obstacle.

Enfin, avec l'avancée majeure de l'immunothérapie par l'autorisation de mise sur le marché d'anticorps monoclonaux anti-PD(L)1 et anti-CTLA4, leur efficacité prolongée et l'apparition de résistance primaire ou acquise dans différents cas, il nous paraît important d'étudier aussi la résistance à ces immunothérapies. Cette réflexion a ainsi été intégrée récemment dans l'étude MATCH R.

V. Perspectives

Ces données préliminaires ont permis l'étude des mécanismes de résistance aux thérapies ciblées dans plusieurs types histologiques présentant des profils moléculaires initiaux différents. Ce travail a démontré l'existence de mécanismes de résistances connus comme la mutation EGFR T790M, EGFR C797S et les voies de contournement par l'activation de la voie EGFR mais aussi l'émergence de nouvelles mutations secondaires ROS1 S1986Y/F de résistance au crizotinib. Actuellement, plusieurs analyses moléculaires *in vitro* et *in vivo* sont en cours au laboratoire pour permettre le développement de nouveaux modèles de résistance aux ITK anti-EGFR de troisième génération, anti-ALK, anti-FGFR et anti-BRAF.

A. Amendements pour l'ouverture de sous-études

Devant la fréquence élevée des patients, inclus dans l'étude MATCH R, présentant un CBNPC muté EGFR ou transloqué ALK ou ROS1, et la difficulté relative du rapatriement du bloc au diagnostic (délai, qualité et quantité de matériel, etc.) l'étude MATCH R a été amendée pour mettre en place une biopsie obligatoire de référence avant le début des ITK anti-EGFR et anti-ALK. Une seconde biopsie lors de la progression après une réponse initiale ou une stabilité de vingt-quatre semaines sera ensuite réalisée. Cela permettra une comparaison prospective et homogène des résultats pré et post thérapie ciblée des analyses génomiques. Ces deux sous-études MATCH R-ALK, MATCH R-EGFR se joignent à une troisième sous étude MATCH R-immuno avec le même principe ; une biopsie avant de débiter une immunothérapie devra être réalisée ainsi qu'une biopsie post immunothérapie après un contrôle de la maladie de six mois minimum. Cela permettra aussi d'identifier de manière prospective les mécanismes de résistance à l'immunothérapie dont plusieurs ont été déjà récemment découverts (109,110).

B. Analyse prospective de la résistance aux immunothérapies ciblant les points de restriction

L'immunothérapie étant actuellement un des piliers de la prise en charge thérapeutique des cancers (mélanome, CBNPC, carcinome urothélial, carcinome rénal à cellules claires, carcinome épidermoïde ORL, etc.) il nous paraît important d'analyser par séquençage de l'exome entier et séquençage de l'ARN les mécanismes de résistance aux immunothérapies ciblant les points de restriction. En particulier le séquençage de l'ARN

va permettre l'analyse de l'infiltrat immunitaire des patients traités par immunothérapie (111). Cette analyse a été nouvellement mise en place de manière prospective pour tous les patients inclus dans l'essai MATCH R. Elle consiste à l'aide d'outils bioinformatiques, d'analyser sur les résultats du séquençage de l'ARN, le niveau d'expression de gènes immunitaires à partir d'un panel de signatures d'expression génique (112,113) et d'évaluer pour chaque expression génique significative son niveau d'expression pour un patient donné par rapport à une cohorte de patients de même histologie à partir des bases de données MOSCATO 01 et MATCH R (111). Cet outil nous paraît primordial pour identifier de nouveaux biomarqueurs prédictifs de réponses ou d'hyper progression à l'immunothérapie. La notion d'hyper progression a récemment été définie (114,115) et les analyses génomiques de ces patients sont fondamentales pour évaluer ce mécanisme sur le plan biomoléculaire et immunitaire. En effet, un infiltrat pauvre en cellules effectrices et riches en lymphocytes T régulateurs (Treg) et cellules myéloïdes immunosuppressives (MDSC) pourrait être une hypothèse de résistance à l'immunothérapie et aiderait à mieux guider la stratégie thérapeutique.

Cibler spécifiquement le pilote oncogénique permet une efficacité clinique majeure mais limitée dans le temps. La résistance sous thérapie ciblée apparaît systématiquement et le mécanisme d'action des thérapies dite de nouvelle génération permet d'outrepasser les mécanismes de résistance identifiés. Les analyses moléculaires comparatives pré et post thérapie ciblée à l'aide d'outils génomiques haut débit permettent d'affiner les mécanismes de résistance. L'émergence de processus encore peu élucidés comme la transformation histologique, et la résistance aux immunothérapies ciblant les points de restriction sont essentiels pour ré-orienter la recherche et le développement de nouveaux

traitements anticancéreux.

A. Références bibliographiques

1. Sharma SV, Gajowniczek P, Way IP, Lee DY, Jiang J, Yuza Y, et al. A common signaling cascade may underlie “addiction” to the Src, BCR-ABL, and EGF receptor oncogenes. *Cancer Cell*. 2006 Nov;10(5):425–35.
2. Soria J-C, Mok TS, Cappuzzo F, Jänne PA. EGFR-mutated oncogene-addicted non-small cell lung cancer: Current trends and future prospects. *Cancer Treat Rev*. 2012 Aug;38(5):416–30.
3. Shaw AT, Engelman JA. *ALK* in Lung Cancer: Past, Present, and Future. *J Clin Oncol*. 2013 Mar 10;31(8):1105–11.
4. Kantarjian H, Sawyers C, Hochhaus A, Guilhot F, Schiffer C, Gambacorti-Passerini C, et al. Hematologic and Cytogenetic Responses to Imatinib Mesylate in Chronic Myelogenous Leukemia. *N Engl J Med*. 2002 Feb 28;346(9):645–52.
5. Shepherd FA, Rodrigues Pereira J, Ciuleanu T, Tan EH, Hirsh V, Thongprasert S, et al. Erlotinib in Previously Treated Non–Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*. 2005 Jul 14;353(2):123–32.
6. Mok TS, Wu Y-L, Thongprasert S, Yang C-H, Chu D-T, Saijo N, et al. Gefitinib or Carboplatin–Paclitaxel in Pulmonary Adenocarcinoma. *N Engl J Med*. 2009 Sep 3;361(10):947–57.
7. Chapman PB, Hauschild A, Robert C, Haanen JB, Ascierto P, Larkin J, et al. Improved Survival with Vemurafenib in Melanoma with BRAF V600E Mutation. *N Engl J Med*. 2011 Jun 30;364(26):2507–16.
8. 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.
9. André F, Bachelot T, Commo F, Campone M, Arnedos M, Dieras V, et al. Comparative genomic hybridisation array and DNA sequencing to direct treatment of metastatic breast cancer: a multicentre, prospective trial (SAFIR01/UNICANCER). *Lancet Oncol*. 2014 Mar;15(3):267–74.
10. Massard C, Michiels S, Ferte C, Deley M-CL, Lacroix L, Hollebecque A, et al. High-Throughput Genomics and Clinical Outcome in Hard-to-Treat Advanced Cancers: Results of the MOSCATO 01 Trial. *Cancer Discov*. 2017 Jun 1;7(6):586–95.
11. Le Tourneau C, Delord J-P, Gonçalves A, Gavaille C, Dubot C, Isambert N, et al. Molecularly targeted therapy based on tumour molecular profiling versus conventional therapy for advanced cancer (SHIVA): a multicentre, open-label,

proof-of-concept, randomised, controlled phase 2 trial. *Lancet Oncol.* 2015 Oct;16(13):1324–34.

12. Gainor JF, Shaw AT. Emerging Paradigms in the Development of Resistance to Tyrosine Kinase Inhibitors in Lung Cancer. *J Clin Oncol.* 2013 Nov;31(31):3987–96.
13. Kobayashi S, Boggon TJ, Dayaram T, Jänne PA, Kocher O, Meyerson M, et al. *EGFR* Mutation and Resistance of Non–Small-Cell Lung Cancer to Gefitinib. *N Engl J Med.* 2005 Feb 24;352(8):786–92.
14. Arcila ME, Oxnard GR, Nafa K, Riely GJ, Solomon SB, Zakowski MF, et al. Rebiopsy of Lung Cancer Patients with Acquired Resistance to EGFR Inhibitors and Enhanced Detection of the T790M Mutation Using a Locked Nucleic Acid-Based Assay. *Clin Cancer Res.* 2011 Mar 1;17(5):1169–80.
15. Sequist LV, Waltman BA, Dias-Santagata D, Digumarthy S, Turke AB, Fidias P, et al. Genotypic and Histological Evolution of Lung Cancers Acquiring Resistance to EGFR Inhibitors. *Sci Transl Med.* 2011 Mar 23;3(75):75ra26–75ra26.
16. Yu HA, Arcila ME, Rekhtman N, Sima CS, Zakowski MF, Pao W, et al. Analysis of Tumor Specimens at the Time of Acquired Resistance to EGFR-TKI Therapy in 155 Patients with EGFR-Mutant Lung Cancers. *Clin Cancer Res.* 2013 Apr 15;19(8):2240–7.
17. Jänne PA, Yang JC-H, Kim D-W, Planchard D, Ohe Y, Ramalingam SS, et al. AZD9291 in EGFR Inhibitor–Resistant Non–Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med.* 2015 Apr 30;372(18):1689–99.
18. Mok TS, Wu Y-L, Ahn M-J, Garassino MC, Kim HR, Ramalingam SS, et al. Osimertinib or Platinum–Pemetrexed in *EGFR* T790M–Positive Lung Cancer. *N Engl J Med.* 2017 Feb 16;376(7):629–40.
19. Thress KS, Paweletz CP, Felip E, Cho BC, Stetson D, Dougherty B, et al. Acquired EGFR C797S mutation mediates resistance to AZD9291 in non–small cell lung cancer harboring EGFR T790M. *Nat Med.* 2015 May 4;21(6):560–2.
20. Katayama R, Khan TM, Benes C, Lifshits E, Ebi H, Rivera VM, et al. Therapeutic strategies to overcome crizotinib resistance in non-small cell lung cancers harboring the fusion oncogene EML4-ALK. *Proc Natl Acad Sci.* 2011 May 3;108(18):7535–40.
21. Katayama R, Shaw AT, Khan TM, Mino-Kenudson M, Solomon BJ, Halmos B, et al. Mechanisms of Acquired Crizotinib Resistance in ALK-Rearranged Lung Cancers. *Sci Transl Med.* 2012 Feb 8;4(120):120ra17–120ra17.

22. Engelman JA, Zejnullahu K, Mitsudomi T, Song Y, Hyland C, Park JO, et al. MET Amplification Leads to Gefitinib Resistance in Lung Cancer by Activating ERBB3 Signaling. *Science*. 2007 May 18;316(5827):1039–43.
23. Bean J, Brennan C, Shih J-Y, Riely G, Viale A, Wang L, et al. MET amplification occurs with or without T790M mutations in EGFR mutant lung tumors with acquired resistance to gefitinib or erlotinib. *Proc Natl Acad Sci*. 2007 Dec 26;104(52):20932–7.
24. Engelman JA, Janne PA. Mechanisms of Acquired Resistance to Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitors in Non-Small Cell Lung Cancer. *Clin Cancer Res*. 2008 May 15;14(10):2895–9.
25. Niederst MJ, Engelman JA. Bypass Mechanisms of Resistance to Receptor Tyrosine Kinase Inhibition in Lung Cancer. *Sci Signal*. 2013 Sep 24;6(294):re6–re6.
26. Geyer CE, Forster J, Lindquist D, Chan S, Romieu CG, Pienkowski T, et al. Lapatinib plus Capecitabine for HER2-Positive Advanced Breast Cancer. *N Engl J Med*. 2006 Dec 28;355(26):2733–43.
27. Solit DB, Rosen N. Resistance to BRAF Inhibition in Melanomas. *N Engl J Med*. 2011 Feb 24;364(8):772–4.
28. Van Allen EM, Wagle N, Sucker A, Treacy DJ, Johannessen CM, Goetz EM, et al. The Genetic Landscape of Clinical Resistance to RAF Inhibition in Metastatic Melanoma. *Cancer Discov*. 2014 Jan 1;4(1):94–109.
29. Robert C, Karaszewska B, Schachter J, Rutkowski P, Mackiewicz A, Stroiakovski D, et al. Improved Overall Survival in Melanoma with Combined Dabrafenib and Trametinib. *N Engl J Med*. 2015 Jan;372(1):30–9.
30. Larkin J, Ascierto PA, Dréno B, Atkinson V, Liskay G, Maio M, et al. Combined Vemurafenib and Cobimetinib in *BRAF* -Mutated Melanoma. *N Engl J Med*. 2014 Nov 13;371(20):1867–76.
31. Van Allen EM, Wagle N, Stojanov P, Perrin DL, Cibulskis K, Marlow S, et al. Whole-exome sequencing and clinical interpretation of formalin-fixed, paraffin-embedded tumor samples to guide precision cancer medicine. *Nat Med*. 2014 May 18;20(6):682–8.
32. Schram AM, Reales D, Galle J, Cambria R, Durany R, Feldman D, et al. Oncologist Use and Perception of Large Panel Next Generation Tumor Sequencing. *Ann Oncol* [Internet]. 2017 Jul 6 [cited 2017 Jul 13]; Available from: <https://academic.oup.com/annonc/article-lookup/doi/10.1093/annonc/mdx294>
33. Robinson DR, Wu Y-M, Lonigro RJ, Vats P, Cobain E, Everett J, et al. Integrative clinical genomics of metastatic cancer. *Nature*. 2017 Aug 2;548(7667):297–303.

34. Choi YL, Soda M, Yamashita Y, Ueno T, Takashima J, Nakajima T, et al. EML4-ALK Mutations in Lung Cancer That Confer Resistance to ALK Inhibitors. *N Engl J Med*. 2010 Oct 28;363(18):1734–9.
35. Shaw AT, Friboulet L, Leshchiner I, Gainor JF, Bergqvist S, Brooun A, et al. Resensitization to Crizotinib by the Lorlatinib *ALK* Resistance Mutation L1198F. *N Engl J Med*. 2016 Jan 7;374(1):54–61.
36. Kempf E, Lacroix L, Soria J-C. First Reported Case of Unexpected Response to an Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitor in the I744M Uncommon EGFR Mutation. *Clin Lung Cancer*. 2015 Nov;16(6):e259–61.
37. Planchard D, Loriot Y, André F, Gobert A, Auger N, Lacroix L, et al. EGFR-independent mechanisms of acquired resistance to AZD9291 in EGFR T790M-positive NSCLC patients. *Ann Oncol*. 2015 Oct;26(10):2073–8.
38. Ortiz-Cuaran S, Scheffler M, Plenker D, Dahmen I., Scheel AH, Fernandez-Cuesta L, et al. Heterogeneous Mechanisms of Primary and Acquired Resistance to Third-Generation EGFR Inhibitors. *Clin Cancer Res*. 2016 Oct 1;22(19):4837–47.
39. Martinez-Marti A, Felip E, Matito J, Mereu E, Navarro A, Cedrés S, et al. Dual MET and ERBB inhibition overcomes intra-tumor plasticity in osimertinib resistant advanced non-small cell lung cancer (NSCLC). *Ann Oncol* [Internet]. 2017 Jul 21 [cited 2017 Aug 14]; Available from: <https://academic.oup.com/annonc/article-lookup/doi/10.1093/annonc/mdx396>
40. Huang Q, Schneeberger VE, Luetteke N, Jin C, Afzal R, Budzevich MM, et al. Preclinical Modeling of KIF5B-RET Fusion Lung Adenocarcinoma. *Mol Cancer Ther*. 2016 Oct 1;15(10):2521–9.
41. Gautschi O, Milia J, Filleron T, Wolf J, Carbone DP, Owen D, et al. Targeting RET in Patients With *RET*-Rearranged Lung Cancers: Results From the Global, Multicenter *RET* Registry. *J Clin Oncol*. 2017 May;35(13):1403–10.
42. De Falco V, Buonocore P, Muthu M, Torregrossa L, Basolo F, Billaud M, et al. Ponatinib (AP24534) Is a Novel Potent Inhibitor of Oncogenic RET Mutants Associated With Thyroid Cancer. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013 May;98(5):E811–9.
43. Frampton GM, Ali SM, Rosenzweig M, Chmielecki J, Lu X, Bauer TM, et al. Activation of MET via Diverse Exon 14 Splicing Alterations Occurs in Multiple Tumor Types and Confers Clinical Sensitivity to MET Inhibitors. *Cancer Discov*. 2015 Aug 1;5(8):850–9.
44. Paik PK, Drilon A, Fan P-D, Yu H, Rekhtman N, Ginsberg MS, et al. Response to MET Inhibitors in Patients with Stage IV Lung Adenocarcinomas Harboring MET Mutations Causing Exon 14 Skipping. *Cancer Discov*. 2015 Aug 1;5(8):842–9.

45. Mahjoubi L, Gazzah A, Besse B, Lacroix L, Soria J-C. A never-smoker lung adenocarcinoma patient with a MET exon 14 mutation (D1028N) and a rapid partial response after crizotinib. *Invest New Drugs*. 2016 Jun;34(3):397–8.
46. Camidge DR, Ou S-HI, Shapiro G, Otterson GA, Villaruz LC, Villalona-Calero MA, et al. Efficacy and safety of crizotinib in patients with advanced c-MET-amplified non-small cell lung cancer (NSCLC). *J Clin Oncol*. 2014 May 20;32(15_suppl):8001–8001.
47. Waqar SN, Morgensztern D, Sehn J. MET Mutation Associated with Responsiveness to Crizotinib. *J Thorac Oncol*. 2015 May;10(5):e29–31.
48. Benderra M-A, Aspeslagh S, Postel-Vinay S, Bigot L, De Baere T, Loriot Y, et al. Acquired EGFR Mutation as the Potential Resistance Driver to Crizotinib in a MET-Mutated Tumor. *J Thorac Oncol*. 2016 Feb;11(2):e21–3.
49. Facchinetti F, Loriot Y, Kuo M-S, Mahjoubi L, Lacroix L, Planchard D, et al. Crizotinib-Resistant ROS1 Mutations Reveal a Predictive Kinase Inhibitor Sensitivity Model for ROS1- and ALK-Rearranged Lung Cancers. *Clin Cancer Res*. 2016 Dec 15;22(24):5983–91.
50. Davies KD, Le AT, Theodoro MF, Skokan MC, Aisner DL, Berge EM, et al. Identifying and Targeting ROS1 Gene Fusions in Non-Small Cell Lung Cancer. *Clin Cancer Res*. 2012 Sep 1;18(17):4570–9.
51. Takeuchi K, Soda M, Togashi Y, Suzuki R, Sakata S, Hatano S, et al. RET, ROS1 and ALK fusions in lung cancer. *Nat Med*. 2012 Feb 12;18(3):378–81.
52. Bergethon K, Shaw AT, Ignatius Ou S-H, Katayama R, Lovly CM, McDonald NT, et al. *ROS1* Rearrangements Define a Unique Molecular Class of Lung Cancers. *J Clin Oncol*. 2012 Mar 10;30(8):863–70.
53. Shaw AT, Ou S-HI, Bang Y-J, Camidge DR, Solomon BJ, Salgia R, et al. Crizotinib in *ROS1* -Rearranged Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*. 2014 Nov 20;371(21):1963–71.
54. Awad MM, Katayama R, McTigue M, Liu W, Deng Y-L, Brooun A, et al. Acquired Resistance to Crizotinib from a Mutation in *CD74 – ROS1*. *N Engl J Med*. 2013 Jun 20;368(25):2395–401.
55. Drilon A, Somwar R, Wagner JP, Vellore NA, Eide CA, Zabriskie MS, et al. A Novel Crizotinib-Resistant Solvent-Front Mutation Responsive to Cabozantinib Therapy in a Patient with ROS1-Rearranged Lung Cancer. *Clin Cancer Res*. 2016 May 15;22(10):2351–8.
56. Helsten T, Elkin S, Arthur E, Tomson BN, Carter J, Kurzrock R. The FGFR Landscape in Cancer: Analysis of 4,853 Tumors by Next-Generation Sequencing. *Clin Cancer Res*. 2016 Jan 1;22(1):259–67.

57. Dienstmann R, Rodon J, Prat A, Perez-Garcia J, Adamo B, Felip E, et al. Genomic aberrations in the FGFR pathway: opportunities for targeted therapies in solid tumors. *Ann Oncol*. 2014 Mar 1;25(3):552–63.
58. Herrera-Abreu MT, Pearson A, Campbell J, Shnyder SD, Knowles MA, Ashworth A, et al. Parallel RNA Interference Screens Identify EGFR Activation as an Escape Mechanism in FGFR3-Mutant Cancer. *Cancer Discov*. 2013 Sep 1;3(9):1058–71.
59. Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*. 2002 Jun 27;417(6892):949–54.
60. Paik PK, Arcila ME, Fara M, Sima CS, Miller VA, Kris MG, et al. Clinical Characteristics of Patients With Lung Adenocarcinomas Harboring *BRAF* Mutations. *J Clin Oncol*. 2011 May 20;29(15):2046–51.
61. Cardarella S, Ogino A, Nishino M, Butaney M, Shen J, Lydon C, et al. Clinical, Pathologic, and Biologic Features Associated with BRAF Mutations in Non-Small Cell Lung Cancer. *Clin Cancer Res*. 2013 Aug 15;19(16):4532–40.
62. Barlesi F, Mazieres J, Merlio J-P, Debievre 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.
63. Planchard D, Besse B, Groen HJM, Souquet P-J, Quoix E, Baik CS, et al. Dabrafenib plus trametinib in patients with previously treated BRAF V600E - mutant metastatic non-small cell lung cancer: an open-label, multicentre phase 2 trial. *Lancet Oncol*. 2016 Jul;17(7):984–93.
64. Yang H, Ye D, Guan K-L, Xiong Y. IDH1 and IDH2 Mutations in Tumorigenesis: Mechanistic Insights and Clinical Perspectives. *Clin Cancer Res*. 2012 Oct 15;18(20):5562–71.
65. Yun C-H, Mengwasser KE, Toms AV, Woo MS, Greulich H, Wong K-K, et al. The T790M mutation in EGFR kinase causes drug resistance by increasing the affinity for ATP. *Proc Natl Acad Sci*. 2008 Feb 12;105(6):2070–5.
66. Katakami N, Atagi S, Goto K, Hida T, Horai T, Inoue A, et al. LUX-Lung 4: A Phase II Trial of Afatinib in Patients With Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer Who Progressed During Prior Treatment With Erlotinib, Gefitinib, or Both. *J Clin Oncol*. 2013 Sep 20;31(27):3335–41.
67. Schuler M, Yang JC-H, Park K, Kim J-H, Bennouna J, Chen Y-M, et al. Afatinib beyond progression in patients with non-small-cell lung cancer following chemotherapy, erlotinib/gefitinib and afatinib: phase III randomized LUX-Lung 5 trial. *Ann Oncol*. 2016 Mar;27(3):417–23.

68. Cross DAE, Ashton SE, Ghiorghiu S, Eberlein C, Nebhan CA, Spitzler PJ, et al. AZD9291, an Irreversible EGFR TKI, Overcomes T790M-Mediated Resistance to EGFR Inhibitors in Lung Cancer. *Cancer Discov.* 2014 Sep 1;4(9):1046–61.
69. Oxnard GR. The cellular origins of drug resistance in cancer. *Nat Med.* 2016 Mar 3;22(3):232–4.
70. Hata AN, Niederst MJ, Archibald HL, Gomez-Caraballo M, Siddiqui FM, Mulvey HE, et al. Tumor cells can follow distinct evolutionary paths to become resistant to epidermal growth factor receptor inhibition. *Nat Med.* 2016 Feb 1;22(3):262–9.
71. Ramirez M, Rajaram S, Steininger RJ, Osipchuk D, Roth MA, Morinishi LS, et al. Diverse drug-resistance mechanisms can emerge from drug-tolerant cancer persister cells. *Nat Commun.* 2016 Feb 19;7:10690.
72. Yu HA, Tian SK, Drilon AE, Borsu L, Riely GJ, Arcila ME, et al. Acquired Resistance of *EGFR*- Mutant Lung Cancer to a T790M-Specific EGFR Inhibitor: Emergence of a Third Mutation (C797S) in the EGFR Tyrosine Kinase Domain. *JAMA Oncol.* 2015 Oct 1;1(7):982.
73. Niederst MJ, Hu H, Mulvey HE, Lockerman EL, Garcia AR, Piotrowska Z, et al. The Allelic Context of the C797S Mutation Acquired upon Treatment with Third-Generation EGFR Inhibitors Impacts Sensitivity to Subsequent Treatment Strategies. *Clin Cancer Res.* 2015 Sep 1;21(17):3924–33.
74. Remon J, Besse B. Unravelling signal escape through maintained EGFR activation in advanced non-small cell lung cancer (NSCLC): new treatment options. *ESMO Open.* 2016 Jul;1(4):e000081.
75. 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 12]; Available from: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1704795>
76. Friboulet L, Li N, Katayama R, Lee CC, Gainor JF, Crystal AS, et al. The ALK Inhibitor Ceritinib Overcomes Crizotinib Resistance in Non-Small Cell Lung Cancer. *Cancer Discov.* 2014 Jun 1;4(6):662–73.
77. Zou HY, Friboulet L, Kodack DP, Engstrom LD, Li Q, West M, et al. PF-06463922, an ALK/ROS1 Inhibitor, Overcomes Resistance to First and Second Generation ALK Inhibitors in Preclinical Models. *Cancer Cell.* 2015 Jul;28(1):70–81.
78. Lovly CM, Pao W. Escaping ALK Inhibition: Mechanisms of and Strategies to Overcome Resistance. *Sci Transl Med.* 2012 Feb 8;4(120):120ps2–120ps2.
79. Goyal L, Saha SK, Liu LY, Siravegna G, Leshchiner I, Ahronian LG, et al. Polyclonal Secondary *FGFR2* Mutations Drive Acquired Resistance to FGFR

Inhibition in Patients with FGFR2 Fusion–Positive Cholangiocarcinoma. *Cancer Discov.* 2017 Mar;7(3):252–63.

80. Gainor JF, Varghese AM, Ou S-HI, Kabraji S, Awad MM, Katayama R, et al. ALK Rearrangements Are Mutually Exclusive with Mutations in EGFR or KRAS: An Analysis of 1,683 Patients with Non-Small Cell Lung Cancer. *Clin Cancer Res.* 2013 Aug 1;19(15):4273–81.
81. Ji H. Mechanistic insights into acquired drug resistance in epidermal growth factor receptor mutation-targeted lung cancer therapy. *Cancer Sci.* 2010 Sep;101(9):1933–8.
82. Turke AB, Zejnullahu K, Wu Y-L, Song Y, Dias-Santagata D, Lifshits E, et al. Preexistence and Clonal Selection of MET Amplification in EGFR Mutant NSCLC. *Cancer Cell.* 2010 Jan;17(1):77–88.
83. Kim S-M, Kim H, Yun MR, Kang HN, Pyo K-H, Park HJ, et al. Activation of the Met kinase confers acquired drug resistance in FGFR-targeted lung cancer therapy. *Oncogenesis.* 2016 Jul 18;5(7):e241.
84. Malchers F, Ercanoglu M, Schütte D, Castiglione R, Tischler V, Michels S, et al. Mechanisms of Primary Drug Resistance in *FGFR1* -Amplified Lung Cancer. *Clin Cancer Res [Internet]*. 2017 Jun 19 [cited 2017 Aug 18]; Available from: <http://clincancerres.aacrjournals.org/lookup/doi/10.1158/1078-0432.CCR-17-0478>
85. Takezawa K, Pirazzoli V, Arcila ME, Nebhan CA, Song X, de Stanchina E, et al. *HER2* Amplification: A Potential Mechanism of Acquired Resistance to EGFR Inhibition in *EGFR* -Mutant Lung Cancers That Lack the Second-Site *EGFR*^{T790M} Mutation. *Cancer Discov.* 2012 Oct;2(10):922–33.
86. Engelman JA, Mukohara T, Zejnullahu K, Lifshits E, Borrás AM, Gale C-M, et al. Allelic dilution obscures detection of a biologically significant resistance mutation in EGFR-amplified lung cancer. *J Clin Invest.* 2006 Oct 2;116(10):2695–706.
87. Sasaki T, Koivunen J, Ogino A, Yanagita M, Nikiforow S, Zheng W, et al. A Novel ALK Secondary Mutation and EGFR Signaling Cause Resistance to ALK Kinase Inhibitors. *Cancer Res.* 2011 Sep 15;71(18):6051–60.
88. Ohashi K, Sequist LV, Arcila ME, Moran T, Chmielecki J, Lin Y-L, et al. Lung cancers with acquired resistance to EGFR inhibitors occasionally harbor BRAF gene mutations but lack mutations in KRAS, NRAS, or MEK1. *Proc Natl Acad Sci.* 2012 Jul 31;109(31):E2127–33.
89. de Bruin EC, Cowell C, Warne PH, Jiang M, Saunders RE, Melnick MA, et al. Reduced NF1 Expression Confers Resistance to EGFR Inhibition in Lung Cancer. *Cancer Discov.* 2014 May 1;4(5):606–19.

90. Sharma SV, Lee DY, Li B, Quinlan MP, Takahashi F, Maheswaran S, et al. A Chromatin-Mediated Reversible Drug-Tolerant State in Cancer Cell Subpopulations. *Cell*. 2010 Apr;141(1):69–80.
91. Cortot AB, Repellin CE, Shimamura T, Capelletti M, Zejnullahu K, Ercan D, et al. Resistance to Irreversible EGF Receptor Tyrosine Kinase Inhibitors through a Multistep Mechanism Involving the IGF1R Pathway. *Cancer Res*. 2013 Jan 15;73(2):834–43.
92. Terai H, Soejima K, Yasuda H, Nakayama S, Hamamoto J, Arai D, et al. Activation of the FGF2-FGFR1 Autocrine Pathway: A Novel Mechanism of Acquired Resistance to Gefitinib in NSCLC. *Mol Cancer Res*. 2013 Jul 1;11(7):759–67.
93. Zhang Z, Lee JC, Lin L, Olivas V, Au V, LaFramboise T, et al. Activation of the AXL kinase causes resistance to EGFR-targeted therapy in lung cancer. *Nat Genet*. 2012 Jul 1;44(8):852–60.
94. Datta J, Damodaran S, Parks H, Ocrainiciuc C, Miya J, Yu L, et al. Akt Activation Mediates Acquired Resistance to Fibroblast Growth Factor Receptor Inhibitor BGJ398. *Mol Cancer Ther*. 2017 Apr;16(4):614–24.
95. Thiery JP, Acloque H, Huang RYJ, Nieto MA. Epithelial-Mesenchymal Transitions in Development and Disease. *Cell*. 2009 Nov;139(5):871–90.
96. Thomson S, Buck E, Petti F, Griffin G, Brown E, Ramnarine N, et al. Epithelial to Mesenchymal Transition Is a Determinant of Sensitivity of Non–Small-Cell Lung Carcinoma Cell Lines and Xenografts to Epidermal Growth Factor Receptor Inhibition. *Cancer Res*. 2005 Oct 15;65(20):9455–62.
97. Yauch RL. Epithelial versus Mesenchymal Phenotype Determines In vitro Sensitivity and Predicts Clinical Activity of Erlotinib in Lung Cancer Patients. *Clin Cancer Res*. 2005 Dec 15;11(24):8686–98.
98. Rho JK, Choi YJ, Lee JK, Ryoo B-Y, Na II, Yang SH, et al. Epithelial to mesenchymal transition derived from repeated exposure to gefitinib determines the sensitivity to EGFR inhibitors in A549, a non-small cell lung cancer cell line. *Lung Cancer*. 2009 Feb;63(2):219–26.
99. Grygielewicz P, Dymek B, Bujak A, Gunerka P, Stanczak A, Lamparska-Przybysz M, et al. Epithelial–mesenchymal transition confers resistance to selective FGFR inhibitors in SNU-16 gastric cancer cells. *Gastric Cancer*. 2016 Jan;19(1):53–62.
100. Barr S, Thomson S, Buck E, Russo S, Petti F, Sujka-Kwok I, et al. Bypassing cellular EGF receptor dependence through epithelial-to-mesenchymal-like transitions. *Clin Exp Metastasis*. 2008 Oct;25(6):685–93.
101. Vuoriluoto K, Haugen H, Kiviluoto S, Mpindi J-P, Nevo J, Gjerdrum C, et al. Vimentin regulates EMT induction by Slug and oncogenic H-Ras and migration by

- governing Axl expression in breast cancer. *Oncogene*. 2011 Mar 24;30(12):1436–48.
102. Alam N, Gustafson KS, Ladanyi M, Zakowski MF, Kapoor A, Truskinovsky AM, et al. Small-Cell Carcinoma With an Epidermal Growth Factor Receptor Mutation in a Never-Smoker With Gefitinib-Responsive Adenocarcinoma of the Lung. *Clin Lung Cancer*. 2010 Sep;11(5):E1–4.
103. Faber AC, Corcoran RB, Ebi H, Sequist LV, Waltman BA, Chung E, et al. BIM Expression in Treatment-Naive Cancers Predicts Responsiveness to Kinase Inhibitors. *Cancer Discov*. 2011 Sep 1;1(4):352–65.
104. San José-Eneriz E, Agirre X, Jiménez-Velasco A, Cordeu L, Martín V, Arqueros V, et al. Epigenetic down-regulation of BIM expression is associated with reduced optimal responses to imatinib treatment in chronic myeloid leukaemia. *Eur J Cancer*. 2009 Jul;45(10):1877–89.
105. Ng KP, Hillmer AM, Chuah CTH, Juan WC, Ko TK, Teo ASM, et al. A common BIM deletion polymorphism mediates intrinsic resistance and inferior responses to tyrosine kinase inhibitors in cancer. *Nat Med*. 2012 Mar 18;18(4):521–8.
106. Verdin E, Ott M. 50 years of protein acetylation: from gene regulation to epigenetics, metabolism and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014 Dec 30;16(4):258–64.
107. Feng J-F. Blockade of DNA methylation enhances the therapeutic effect of gefitinib in non-small cell lung cancer cells. *Oncol Rep [Internet]*. 2013 Feb 21 [cited 2017 Aug 14]; Available from: <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/or.2013.2298>
108. Terai H, Soejima K, Yasuda H, Sato T, Naoki K, Ikemura S, et al. Long-term exposure to gefitinib induces acquired resistance through DNA methylation changes in the EGFR-mutant PC9 lung cancer cell line. *Int J Oncol [Internet]*. 2014 Oct 29 [cited 2017 Aug 14]; Available from: <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/ijo.2014.2733>
109. Zaretsky JM, Garcia-Diaz A, Shin DS, Escuin-Ordinas H, Hugo W, Hu-Lieskovan S, et al. Mutations Associated with Acquired Resistance to PD-1 Blockade in Melanoma. *N Engl J Med*. 2016 Sep 1;375(9):819–29.
110. Sharma P, Hu-Lieskovan S, Wargo JA, Ribas A. Primary, Adaptive, and Acquired Resistance to Cancer Immunotherapy. *Cell*. 2017 Feb;168(4):707–23.
111. Verlingue L, Mahjoubi L, Aspeslagh S, Pedrero M, Buzzatti G, Brandao D, et al. Abstract 1011: RNAseq analysis obtained from on-purpose tumor biopsies of patients in the MATCH-R trial allows the identification of potential mechanisms of acquired resistance to PD(L)1 therapies. *Cancer Res*. 2017 Jul 1;77(13 Supplement):1011–1011.

112. Hugo W, Zaretsky JM, Sun L, Song C, Moreno BH, Hu-Lieskovan S, et al. Genomic and Transcriptomic Features of Response to Anti-PD-1 Therapy in Metastatic Melanoma. *Cell*. 2016 Mar 24;165(1):35–44.
113. Chen P-L, Roh W, Reuben A, Cooper ZA, Spencer CN, Prieto PA, et al. Analysis of Immune Signatures in Longitudinal Tumor Samples Yields Insight into Biomarkers of Response and Mechanisms of Resistance to Immune Checkpoint Blockade. *Cancer Discov*. 2016 Aug;6(8):827–37.
114. Champiat S, Derle L, Ammari S, Massard C, Hollebecque A, Postel-Vinay S, et al. Hyperprogressive Disease Is a New Pattern of Progression in Cancer Patients Treated by Anti-PD-1/PD-L1. *Clin Cancer Res*. 2017 Apr 15;23(8):1920–8.
115. Kato S, Goodman AM, Walavalkar V, Barkauskas DA, Sharabi A, Kurzrock R. Hyper-progressors after Immunotherapy: Analysis of Genomic Alterations Associated with Accelerated Growth Rate. *Clin Cancer Res*. 2017 Jan 1;clincanres.3133.2016.

B. Bibliographie

ANNEXE 1

Annals of Oncology

original articles

Annals of Oncology 26: 2073–2078, 2015
doi:10.1093/annonc/mdv319
Published online 12 August 2015**EGFR-independent mechanisms of acquired resistance to AZD9291 in EGFR T790M-positive NSCLC patients**D. Planchard^{1*}, Y. Loriot¹, F. André^{1,5}, A. Gobert², N. Auger³, L. Lacroix⁴ & J. C. Soria^{2,5}¹Department of Medical Oncology, Gustave Roussy, Villejuif; ²Drug Development Department (DITEP), Gustave Roussy, and University Paris-Sud, Villejuif; ³Department of Medical Biology and Pathology; ⁴Translational Research Laboratory and BioBank, Gustave Roussy, Villejuif; ⁵INSERM U981, Gustave Roussy, University Paris XI, Villejuif, France

Received 27 May 2015; revised 11 July 2015; accepted 20 July 2015

Background: AZD9291 is an oral, irreversible, mutant-selective epidermal growth factor receptor (EGFR) tyrosine kinase inhibitors (EGFR-TKI), which specifically targets both sensitizing and resistant T790M mutations. This compound has shown outstanding activity, in a phase I/II (AURA) trial. However, despite impressive tumor responses in T790M-positive patients, acquired resistance to this drug limits the benefit of this compound. Mutations at the EGFR C797 codon, located within the kinase-binding site, were very recently reported to be a potential mechanism of resistance to AZD9291 in T790M-positive patients.**Patients and methods:** To identify potential mechanisms of resistance to AZD9291, we report here on two patients with resistant biopsy specimens that had been treated with AZD9291.**Results:** We identified in two distinct cases, HER2 and MET amplification by FISH and CGH as a potential mechanism of acquired resistance to third-generation EGFR-TKI. Interestingly, this event occurred with complete loss of the T790M mutation. In one case, we observed a different molecular status at two biopsy sites (the T790M mutation at the primary site and wild-type T790M at the metastatic site with different pathways of acquired resistance to AZD9291).**Conclusion:** Our observations suggest that T790M-positive and wild-type T790M clones may coexist at baseline. AZD9291 efficiently suppresses the growth of T790M-positive cells, but a population of wild-type T790M cells at baseline will mediate the development of resistance, here via a by-pass pathway activating either HER2 or MET.**Key words:** NSCLC, EGFR, AZD9291, T790M, MET, HER2**introduction**

Activating mutations in the epidermal growth factor receptor (EGFR) are key drivers of non-small-cell lung cancer (NSCLC) in 10%–15% of non-Asian patients [1, 2]. Patients with one of the most common EGFR mutations [i.e. the p.Leu858Arg (L858R) mutation in exon 21 and delE746-A750 deletions in exon 19] achieve typically good responses to therapy with first- or second-generation EGFR tyrosine kinase inhibitors, such as erlotinib, gefitinib or afatinib [3–5]. Despite a striking initial response to treatment, practically all patients experience disease progression generally after 9–14 months of treatment. This acquired resistance is driven in ~60% of cases by a second-site EGFR point mutation, p.Thr790Met (T790M), whereas MET amplification, HER2 amplification, EGFR amplification, PIK3CA mutations and

transformation into small-cell components occur less frequently [6, 7]. AZD9291 is an oral, irreversible, mutant-selective EGFR tyrosine kinase inhibitors (EGFR TKI), that selectively targets both drug-sensitive (like L858R or exon 19 deletion) and resistant T790M mutations. AZD9291 has shown promising activity (with an overall response rate of 61% in EGFR T790M-positive patients), in a phase I (AURA trial) even at the first dose [8, 9]. However, despite impressive tumor responses in T790M-positive patients, acquired resistance to this drug eventually occurs after a median duration of response of ~10 months. EGFR p.Cys797Ser (C797S) mutations, located within the kinase-binding site, were recently reported to be a potential mechanism of resistance to irreversible EGFR inhibitors such as AZD9291 in T790M-positive patients [10, 11]. No other molecular mechanisms underlying resistance to AZD9291 have been identified to date. A better understanding of the mechanisms of resistance to these third-generation EGFR inhibitors is critical for envisioning new strategies for these patients. To identify potential mechanisms of resistance to AZD9291, we studied resistant biopsy specimens of patients

*Correspondence to: Dr David Planchard, Gustave Roussy, Department of Medical Oncology, 114 rue Edouard Belin, 94805 Villejuif, France. Tel: +33-1-42-11-45-64; E-mail: david.planchard@gustaveroussy.fr

treated with AZD9291 in the AURA study. Here we report a genomic analysis of acquired resistance in two patients.

methods

Tumor samples were analyzed for the presence of genetic alterations at baseline in the MOSCATO (Molecular screening for cancer treatment optimization; an institutional biospecimen protocol) trial and at recurrence in the MATCH-R trial [using next-generation sequencing (NGS, Ion Torrent PGM); whole-exome sequencing (Illumina technology), RNA seq (Illumina technology) and CGH (Agilent technology)] [12].

results

The first patient (subject 1) was a 54 year-old man, a former smoker (20 PY, had stopped smoking 25 years earlier) presented with an epileptic seizure (Figure 1). A unique 3-cm-diameter brain metastasis was detected by MRI. Additional exams corroborated the diagnosis of a right upper lobe adenocarcinoma with mediastinal lymph node involvement and a brain metastasis (T2N2M1b, according to the current 7th TNM classification) in July 2009. The patient received stereotactic brain irradiation then a four-cycle platinum-based chemotherapy doublet followed by thoracic irradiation (42 Gy). Nine months after the

end of treatment (October 2010), the patient presented with tumor progression; a new 4-mm-diameter right cerebellar brain lesion and a lesion in the right femur for which he received femoral irradiation alone (20 Gy). The brain metastasis was considered too small for stereotaxic irradiation. At that time, a mutation analysis was carried out on the initial tumor biopsy specimen which unveiled an activating mutation of EGFR Del19 (p.Glu746_Ala750delins). Second-line treatment with gefitinib was started in December 2010 with excellent tolerance and a clinical benefit. In November 2012, right shoulder pain led to detection of a new bone metastasis of the tip of the right scapula that was treated with local irradiation (20 Gy) in December 2012. Stereotaxic brain irradiation was delivered to four new brain metastases in January 2013. Treatment with gefitinib was continued but lung and right scapula CT scan-guided tumor biopsy specimens were collected in October 2013 following tumor progression at these two sites (Moscato trial at Gustave Roussy) [12]. The molecular analysis found an *EGFR* del19 (p.Glu746_Ala750delins) mutation as well as an *EGFR* exon 20 T790M mutation in the lung tumor samples. The *EGFR* Del19 (Glu746_Ala750delins) mutation was found in the scapula samples but not the T790M mutation (Figure 1). After discussion of the case during the phase I Molecular Tumor Board meeting, the patient was enrolled in the phase I study of

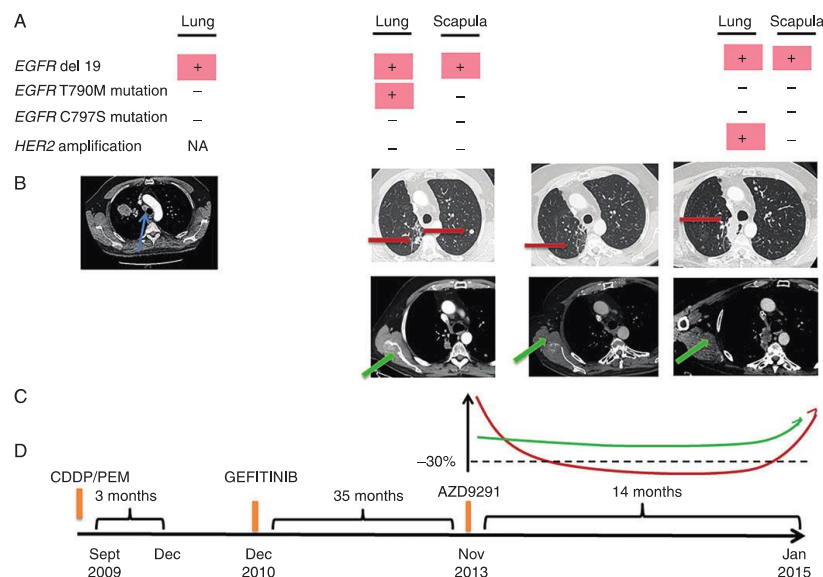


Figure 1. Patient 1 clinical course including treatment history and relevant imaging studies and tumor biopsy specimens. (A) Next-generation sequencing readings from sequential tumor biopsy specimens (pre-gefitinib, pre- and post-AZD9291). (B) Representative images of a chest CT scan with different timings. (i) At baseline before gefitinib, showing right pulmonary lesion and mediastinal lymph node [grey (blue online) arrow]. (ii) At baseline before AZD9291 with right and left pulmonary nodes [dark grey (red online) arrows] and right scapula metastasis [light grey (green online) arrow]. (iii) At 4 months with a partial tumor response of pulmonary nodes and of the right scapula metastasis showing stable disease. (iv) At 14 months of treatment with AZD9291: lung and bone tumor progression. (C) Disease course [dark grey (red online) curve for lung and light grey (green online) for bone] with AZD9291 according to RECIST criteria 1.1. (D) Patient (subject 1) clinical course between 2009 and 2015.

AZD9291 (AURA) started in November 2013. He received a fixed daily dose of 80 mg. An excellent tumor response was observed with a partial response of the different lung lesions and the right scapula lesion showed stable disease. RECIST progression was observed at different tumor sites after more than 12 months of treatment. The patient was enrolled in the MATCH-R trial at Gustave Roussy and underwent further lung and right scapula CT scan-guided tumor biopsies. The results of the molecular profile are reported in Figure 1. Significant HER2 amplification was found by CGH in the lung sample together with a persistent EGFR Del19 mutation. Intriguingly, NGS revealed complete loss of the EGFR T790M mutation (with a limit of detection at least of 1%). No EGFR C797S mutation was found. Neither HER2 amplification nor the EGFR T790M mutation was observed on the scapula biopsy specimen but the EGFR Del19 mutation was still observed. The HER2 amplification observed on the lung biopsy specimen by CGH was confirmed by FISH (50 nuclei analyzed, average number of centromeres per cell: 3.16, HER2/chromosome-specific centromeric enumeration probe (CEP) 17 ratio: 6.65, DNA probe kit from Dako) (Figure 2). Given this molecular profile, the patient started a new therapeutic line with a combination of paclitaxel and trastuzumab in March 2015. The patient presented a stable disease on the

lung lesions and the right scapula lesion after 6 and 12 weeks of treatment.

The second patient (subject 2) was a 60-year-old lady, a never smoker, diagnosed with a stage IV lung adenocarcinoma (lung and pleural metastasis) (Figure 3). She received six cycles of cisplatin–pemetrexed as first-line therapy and achieved a partial response. Due to the discovery of an activating EGFR mutation (exon 21, L858R) on the initial biopsy specimen, she received second-line therapy with erlotinib that caused grade 3 skin toxicity. Erlotinib was switched to gefitinib. The treatment was continued for 12 months with a good safety profile and stable disease. However, in January 2012 she developed a brain metastasis that was treated neurosurgically, followed by a whole-brain irradiation. NGS analysis of the brain tumor revealed a T790M mutation (with an exon 21 L858R mutation). Due to extra-brain tumor progression, she received six cycles of carboplatin–pemetrexed–bevacizumab followed by bevacizumab maintenance therapy. In September 2012, she was enrolled in a phase I trial (cetuximab combined with an mTor inhibitor) due to tumor progression. Disease stabilization was obtained for 17 months. In parallel, molecular screening was carried out in a cMET inhibitor phase I trial but FISH analysis of the tumor was negative for MET amplification. In March 2014, a core needle lung biopsy was carried out on a progressive lung nodule. This

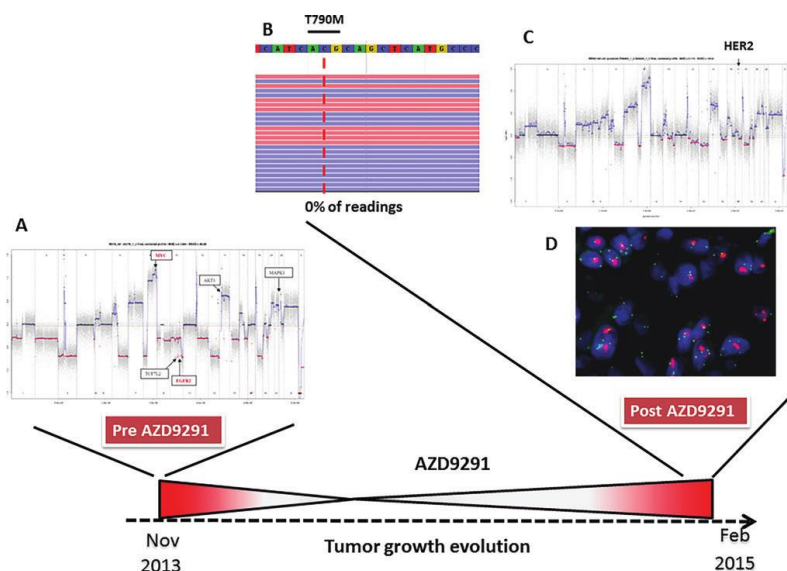


Figure 2. Patient 1 clinical course including NGS, CGH and FISH results on tumor biopsy specimens. Pre-AZD9291 treatment sample analysis: (A) Copy number alteration profiles of primary lung by array CGH. Frequencies of DNA gain and loss according to chromosomal positions indicated along the x-axis. Post-AZD9291 treatment sample analysis: (B) Integrative genomic viewer screenshots of next-generation sequencing readings from sequential tumor biopsy specimens. The analysis shows the absence of both T790M and C797S EGFR mutations. (C) Copy number alteration profiles of primary lung by array CGH. Frequencies of DNA gain and loss according to chromosomal positions indicated along the x-axis. Chromosomal amplification (not present on previous CGH) is demonstrated for 17q comprising the HER2 Locus. (D) Fluorescent *in situ* hybridization with HER2 amplification [HER2 in dark grey (red online); centromere 17 in light grey (green online)].

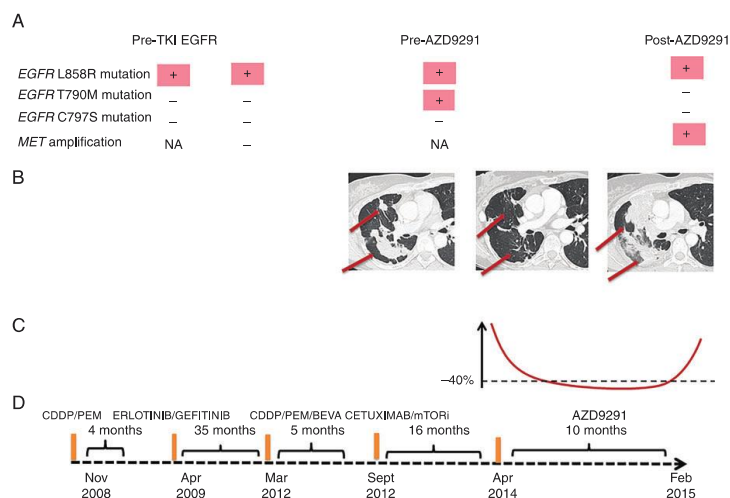


Figure 3. Patient 2 clinical course including treatment history and relevant imaging studies and tumor biopsy specimens. (A) Next-generation sequencing readings from sequential tumor biopsy specimens (pre-erlotinib, pre and post-AZD9291). (B) Representative images from a CT of the chest with different timings. (i) At baseline before AZD9291 with right pulmonary lesions [grey (red online) arrows]. (ii) At 6 months with a partial tumor response of pulmonary lesions. (iii) At 10 months of treatment with AZD9291: lung progression. (C) Pulmonary disease course with AZD9291 according to RECIST criteria 1.1. (D) Patient (subject 2) clinical course between 2008 and 2015.

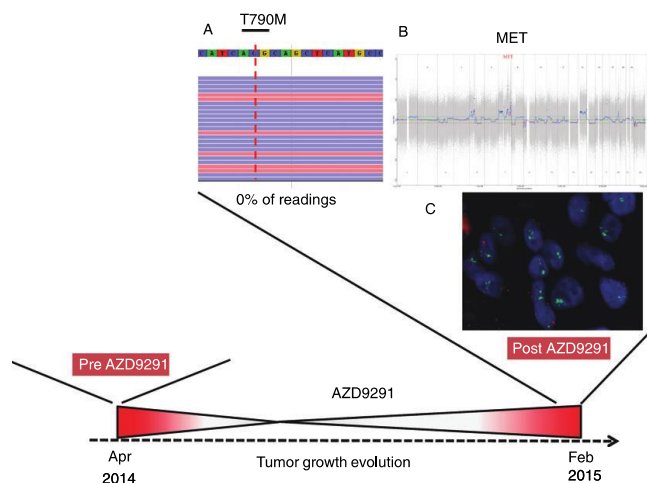


Figure 4. Patient 2 clinical course including NGS, CGH and FISH results on tumor biopsy specimens. Post-AZD9291 treatment sample analysis: (A) Integrative genomic viewer screenshots of next-generation sequencing readings from sequential tumor biopsy specimens. The analysis shows the absence of both T790M and C797S EGFR mutations. (B) Copy number alteration profiles of primary lung by array CGH. Frequencies of DNA gain and loss according to chromosomal positions indicated along the x-axis. Chromosomal amplification is clearly demonstrated for 7q comprising the MET Locus. (C) Fluorescent *in situ* hybridization with MET amplification [MET in light grey (green online); centromere 17 in dark grey (red online)].

biopsy confirmed the presence of a T790M resistance mutation. The patient was enrolled in the phase I of AZD9291 (AURA). She started the treatment in April 2014 at a dose of 80 mg/day. A confirmed partial tumor regression (45%) was achieved with a clinical benefit until February 2015. She received AZD9291 for 10 months until progression of pulmonary disease. She was enrolled in the MATCH-R trial at Gustave Roussy and a core needle lung biopsy of a progressive pulmonary nodule was carried out. FISH results showed significant amplification of MET (40 nuclei analyzed, average number of cMET-positive cells: 21, ratio cMET/CEP7: 5.32, DNA probe kit from Zytovision) confirmed by CGH (log ratio 0.85) and by immunohistochemistry (100% positivity on tumor cells) (Figure 4). NGS analyses showed an EGFR-activating mutation (exon 21, L858R) but no EGFR T790M or C797S resistance mutation, and no other acquired mutations. The patient is currently being treated with a cMET inhibitor in a phase I trial.

discussion

These two cases illustrate the potential importance of sequential rebiopsies of growing tumors at clinical progression as the results may lead to immediate changes in therapy. EGFR T790M mutation is the most common mechanism of acquired resistance under first-generation EGFR tyrosine kinase inhibitors (EGFR-TKI), seen in nearly two thirds of cases. HER2 and MET amplification may be the second most common finding at the time of resistance, seen in ~10%–20% of patients with acquired resistance [6, 7, 13, 14]. This is the first report on the potential escape of tumor cells via the EGFR-independent pathway under third-generation EGFR-TKI. We did not identify HER2 or MET amplification on the pretreatment samples using CGH or FISH. Preclinical findings suggested that HER2 and MET play an important role in mediating sensitivity and resistance to EGFR-TKI and in driving tumor growth and survival [15, 16]. The EGFR T790M mutation and HER2 amplification appear to be mutually exclusive while MET amplification occurs with or without T790M mutations [14, 16]. In our two patients, HER2 or MET amplification appeared to be exclusive of the EGFR T790M mutation with loss of the T790M mutation. In subject 1, due to a divergent radiological response, we carried out whole-exome sequencing on lung and scapula biopsy specimens. HER2 amplification was observed only on tumor lung biopsy samples which previously escaped first-generation EGFR-TKI through the acquired resistance T790M mutation and lost it at progression with AZD9291. The significant partial tumor response achieved by subject 1 with AZD9291 was observed only in the T790M-positive lung metastases whereas the bone scapula metastasis (Del19 and T790M wild-type) was stable. These results are comparable with what has been reported with AZD9291 in the phase I AURA trial according to the T790M mutation status (ORR of 61% in T790M-positive patients versus 21% in patients with wild-type T790M) [9]. In subject 2, we also observed a sustained partial response in T790M-positive lung disease with loss of T790M at acquired resistance to AZD9291. These cases reflect potential intratumor heterogeneity, suggesting spatial and temporal patterns of subclone evolution that need to be taken into consideration in treatment

Table 1. Potential mechanisms of acquired resistance to third-generation EGFR inhibitors already published in NSCLC patients (irreversible pyrimidine EGFR inhibitors, inhibitors, including the tool compound WZ4002 and clinical compounds CO-1686 and AZD9291)

EGFR dependency	Resistance to third-generation EGFR inhibitors		Independent			
	Dependent					
Molecular profile	T790M+/C797S+	T790M+/C797S+	T790M+/C797S-	T790M+	T790M+	NRAS mutation or gain of copy (in vitro/vivo models)
	New EGFR mutations	New EGFR mutations (in vitro models)	EGFR amplification	Unknown	ERK1/2 reactivation (in vitro/vivo models)	WZ4002
Potential mechanism	AZD9291 [10, 18]	AZD9291 [10, 18]	AZD9291 [10, 11]	AZD9291 (present report)	WZ4002 [19]	AZD9291 [20]
Drug			Rociletinib [17]	Rociletinib [10, 17]		

strategies. Both observations suggest that T790M-positive and T790M wild-type clones may coexist in some cancers with acquired resistance to initial EGFR-TKIs. In both cases, we observed loss of the T790M mutation at the time of acquired resistance to AZD9291 associated with the emergence of new oncogenic drivers that are independent of the EGFR pathway. We hypothesize that this might be due to the selection of T790M wild-type clones present in the tumor at AZD9291 treatment initiation and which led to resistance via an independent mechanism such as HER- or MET-amplified sub-clones. Similar results were recently reported by Thress et al. They showed that some cancers may convert from T790M-positive to T790M wild-type cancer cells upon AZD9291 exposure and also identified cases harboring acquired C797S mutations [10]. If these findings are related to tumor heterogeneity, this would reinforce the importance of studying 'an underappreciated genomic heterogeneity' through the proportion of T790M-positive or -negative tumor cells. Table 1 summarizes the potential mechanisms of acquired resistance to third-generation EGFR inhibitors already published in NSCLC. We need to better understand this heterogeneity which is an important issue in cancer genome studies and may lead clinicians to combine therapies in order to stop or prevent the emergence of resistance.

We identified HER2 and MET amplification as a potential mechanism of acquired resistance to third-generation EGFR-TKIs such as AZD9291 in EGFR T790M-positive NSCLC. Further investigations are needed to confirm this report on two clinical cases. Our findings may provide the rationale for targeting HER2 or MET pathways in this clinical setting. In both cases, our observations suggest that T790M-positive and T790 wild-type clones may coexist at baseline in cancers with acquired resistance to initial EGFR-TKI. AZD9291 can efficiently suppress the growth of T790M-positive cells, but a population of T790M wild-type cells at the baseline will mediate the development of resistance.

acknowledgements

We thank Lorna Saint-Ange for English editing.

funding

This work was funded by Institut National du Cancer (INCa)–Direction générale de l'offre de soins (DGOS)–Institut national de la santé et de la recherche médicale (INSERM) 6043 and Philanthropia-Lombard Odier.

disclosure

JCS has received consultancy fees from AstraZeneca. All remaining authors have declared no conflicts of interest.

references

1. Barlesi F, Blons H, Beau-Faller M et al. Biomarkers (BM) France: results of routine EGFR, HER2, KRAS, BRAF, PI3KCA mutations detection and EML4-ALK

- gene fusion assessment on the first 10,000 non-small cell lung cancer (NSCLC) patients (pts). J Clin Oncol ASCO 2013; 31(suppl); abstr 8000.
2. Kris MG, Johnson BE, Berry LD et al. Using multiplexed assays of oncogenic drivers in lung cancers to select targeted drugs. JAMA 2014; 311: 1998–2006.
3. Rosell R, Carcereny E, Gervais R et al. Erlotinib versus standard chemotherapy as first-line treatment for European patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (EURTAC): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial. Lancet Oncol 2012; 13: 239–246.
4. Mok TS, Wu YL, Thongprasert S et al. Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. N Engl J Med 2009; 361: 947–957.
5. Yang JC, Wu YL, Schuler M et al. Afatinib versus cisplatin-based chemotherapy for EGFR mutation-positive lung adenocarcinoma (LUX-Lung 3 and LUX-Lung 6): analysis of overall survival data from two randomised, phase 3 trials. Lancet Oncol 2015; 16: 141–151.
6. Sequist LV, Waltman BA, Dias-Santagata D et al. Genotypic and histological evolution of lung cancers acquiring resistance to EGFR inhibitors. Sci Transl Med 2011; 3: 75ra26.
7. Yu HA, Arcila ME, Rekhtman N et al. Analysis of tumor specimens at the time of acquired resistance to EGFR-TKI therapy in 155 patients with EGFR-mutant lung cancers. Clin Cancer Res 2013; 19: 2240–2247.
8. Cross DA, Ashton SE, Ghiorghiu S et al. AZD9291, an irreversible EGFR TKI, overcomes T790M-mediated resistance to EGFR inhibitors in lung cancer. Cancer Discov 2014; 4: 1046–1061.
9. Janne PA, Yang JC, Kim DW et al. AZD9291 in EGFR inhibitor-resistant non-small-cell lung cancer. N Engl J Med 2015; 372: 1689–1699.
10. Thress KS, Pawelczak CP, Felip E et al. Acquired EGFR C797S mutation mediates resistance to AZD9291 in non-small cell lung cancer harboring EGFR T790M. Nat Med 2015; 21: 560–562.
11. Helena AY, Shaozhou KT, Alexander ED et al. Acquired resistance of EGFR-mutant lung cancer to a T790M-specific EGFR inhibitor: emergence of a third mutation (C797S) in the EGFR tyrosine kinase domain. JAMA Oncol 2015 May 7 [epub ahead of print]. doi: 10.1001/jamaoncol.2015.1066.
12. Féré C, Massard M, Ileana E et al. Molecular screening for cancer treatment optimization (MOSCATO 01): a prospective molecular triage trial; Interim analysis of 420 patients. Can Res 2014; 74(Suppl 19): abstr CT240.
13. Engelman JA, Zejnullahu K, Mitsudomi T et al. MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling. Science 2007; 316: 1039–1043.
14. Bean J, Brennan C, Shih JY et al. MET amplification occurs with or without T790M mutations in EGFR mutant lung tumors with acquired resistance to gefitinib or erlotinib. Proc Natl Acad Sci USA 2007; 104: 20932–20937.
15. Lutterbach B, Zeng Q, Davis LJ et al. Lung cancer cell lines harboring MET gene amplification are dependent on Met for growth and survival. Cancer Res 2007; 67: 2081–2088.
16. Takezawa K, Pirazzoli V, Arcila ME et al. HER2 amplification: a potential mechanism of acquired resistance to EGFR inhibition in EGFR-mutant lung cancers that lack the second-site EGFR T790M mutation. Cancer Discov 2012; 2: 922–933.
17. Piotrowska Z, Niederst MJ, Karlovich CA et al. Heterogeneity underlies the emergence of EGFR T790 wild-type clones following treatment of T790M-positive cancers with a third generation EGFR inhibitor. Cancer Discov 2015; 5: 713–722.
18. Ercan D, Choi HG, Yun CH et al. EGFR mutations and resistance to irreversible pyrimidine based EGFR inhibitors. Clin Cancer Res 2015; 21(17): 3913–3923.
19. Tricker EM, Xu C, Uddin S et al. Combined EGFR/MEK inhibition prevents the emergence of resistance in EGFR mutant lung cancer. Cancer Discov 2015; 5(9): 960–971.
20. Eberlein CA, Stetson D, Markovets AA et al. Acquired resistance to mutant-selective EGFR inhibitor AZD9291 is associated with increased dependence on RAS signaling in preclinical models. Cancer Res 2015; 75: 2489–2500.

ANNEXE 2

Published OnlineFirst July 11, 2016; DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-16-0917

Cancer Therapy: Clinical

Clinical
Cancer
Research**Crizotinib-Resistant *ROS1* Mutations Reveal a Predictive Kinase Inhibitor Sensitivity Model for *ROS1*- and *ALK*-Rearranged Lung Cancers**

Francesco Facchinetti¹, Yohann Lorient^{1,2}, Mei-Shiue Kuo¹, Linda Mahjoubi³, Ludovic Lacroix^{1,4,5}, David Planchard², Benjamin Besse^{2,6}, Françoise Farace^{1,4}, Nathalie Auger⁵, Jordi Remon², Jean-Yves Scoazec^{4,5,6}, Fabrice Andre^{1,2,6}, Jean-Charles Soria^{1,3,6}, and Luc Friboulet¹

Abstract

Background: The identification of molecular mechanisms conferring resistance to tyrosine kinase inhibitor (TKI) is a key step to improve therapeutic results for patients with oncogene addiction. Several alterations leading to EGFR and anaplastic lymphoma kinase (ALK) resistance to TKI therapy have been described in non-small cell lung cancer (NSCLC). Only two mutations in the *ROS1* kinase domain responsible for crizotinib resistance have been described in patients thus far.

Methods: A patient suffering from a metastatic NSCLC harboring an *ezrin* (*EZR*)-*ROS1* fusion gene developed acquired resistance to the ALK/*ROS1* inhibitor crizotinib. Molecular analysis (whole-exome sequencing, CGH) and functional studies were undertaken to elucidate the mechanism of resistance. Based on this case, we took advantage of the structural homology of *ROS1* and ALK to build a predictive model for drug sensitivity regarding future *ROS1* mutations.

Results: Sequencing revealed a dual mutation, S1986Y and S1986F, in the *ROS1* kinase domain. Functional *in vitro* studies demonstrated that *ROS1* harboring either the S1986Y or the S1986F mutation, while conferring resistance to crizotinib and ceritinib, was inhibited by lorlatinib (PF-06463922). The patient's clinical response confirmed the potency of lorlatinib against S1986Y/F mutations. The *ROS1* S1986Y/F and ALK C1156Y mutations are homologous and displayed similar sensitivity patterns to ALK/*ROS1* TKIs. We extended this analogy to build a model predicting TKI efficacy against potential *ROS1* mutations.

Conclusions: Clinical evidence, *in vitro* validation, and homology-based prediction provide guidance for treatment decision making for patients with *ROS1*-rearranged NSCLC who progressed on crizotinib. *Clin Cancer Res*; 22(24): 5983–91. ©2016 AACR.

Introduction

Alterations in tyrosine kinases or in their downstream effectors drive the activation of intracellular pathways culminating in neoplastic transformation (1, 2). As cancer cells can strictly rely on these specific alterations in order to proliferate, survive, and invade, the ability to block their function became of crucial

therapeutic interest. This kind of biological dependency, termed oncogene addiction, has been documented in a broad spectrum of solid and hematologic malignancies. In non-small cell lung cancer (NSCLC), the first evidence of a targetable activating mutation was *EGFR*-mutated tumors (3). Later, *ALK* and *ROS1* gene rearrangements were documented, and fusions involving these genes lead to abnormal expression of constitutively activated kinases, thus resulting in oncogene addiction (4). Patients with *ALK*- and *ROS1*-rearranged diseases are treated with shared tyrosine kinase inhibitors (TKI). First- (crizotinib), second- (ceritinib, brigatinib), and third- [lorlatinib (PF-0646392)] generation compounds are either approved or currently under evaluation in clinical trials. As for the other TKIs, patients ultimately develop resistance to the therapy. Parallel therapeutic approaches against the two receptors can be explained by their common phylogenetic origin. *ALK* and *ROS1* are indeed evolutionary conserved and share 77% of amino acid identity in their ATP-binding sites (5, 6), specifically where TKIs exert their inhibitory activity.

If 11 different mutations in the *ALK* kinase domain explain a relevant part of acquired resistance to TKIs in *ALK*-rearranged tumors, only two mutations (G2032R, D2033N) have so far been reported as mechanism of crizotinib resistance in *ROS1*-rearranged NSCLC (7, 8).

Here, we describe the case of a patient suffering from an NSCLC harboring the *ezrin* (*EZR*)-*ROS1* fusion gene with acquired

¹INSERM U981, Gustave Roussy Cancer Campus, Université Paris-Sud, Villejuif, France, ²Department of Medical Oncology, Gustave Roussy Cancer Campus, Villejuif, France, ³Drug Development Department (DITEP), Gustave Roussy Cancer Campus, Villejuif, France, ⁴Translational Research Laboratory and Bio-Bank, AMMICA, INSERM U523/CNRS UMS3655, Gustave Roussy Cancer Campus, Villejuif, France, ⁵Department of Pathology and Laboratory Medicine (BIOpath), Gustave Roussy Cancer Campus, Villejuif, France, ⁶Université Paris Saclay, Université Paris Sud, Faculté de médecine de Bicêtre, Kremlin-Bicêtre, France.

Note: Supplementary data for this article are available at Clinical Cancer Research Online (<http://clincancerres.aacrjournals.org/>).

J.-C. Soria and L. Friboulet share senior authorship.

Corresponding Author: Luc Friboulet, Gustave Roussy Cancer Campus, 114 rue Edouard Vaillant, 94805 Villejuif, FRANCE. Phone: 33-1-42-11-65-10; Fax: 33-1-42-11-64-44; E-mail: luc.friboulet@gustaveroussy.fr

doi: 10.1158/1078-0432.CCR-16-0917

©2016 American Association for Cancer Research.

www.aacrjournals.org

AACR 5983

Facchinetti et al.

Translational Relevance

This study reveals two new ROS1 kinase domain mutations S1986Y/F detected in a patient that developed acquired resistance to crizotinib. Functional studies revealed cross-resistance to ceritinib induced by S1986Y/F mutations which can however be overcome by the third-generation TKI lorlatinib, as observed for the corresponding anaplastic lymphoma kinase (ALK) C1156Y mutation. Clinical response confirmed this result. On the basis of structural and functional homologies between ALK and ROS1 proteins, we also provide oncologists with a predictive model of sensitivity to ALK/ROS1 inhibitors for different ROS1 mutations anticipated to appear in the clinic. With the recent approval of crizotinib for ROS1-rearranged non-small cell lung cancer patients, we can expect an increased number of acquired resistant mutations detected in this molecular subtype of lung cancer. Therefore, modeling theoretical sensitivity of ROS1 patients according to their mutational status can provide therapeutic guidance and generate significant clinical benefits by avoiding worthless treatments in the presence of novel resistance mutations.

crizotinib resistance. Sequencing of the tumor revealed the presence of novel S1986Y and S1986F mutations. Given the sequence homology, mentioned above, codon 1986 of ROS1 is the equivalent of codon 1156 of ALK (6). The C1156Y ALK mutation has already been reported in crizotinib-resistant patients (9, 10). This ALK mutant, also conferring ceritinib resistance in preclinical models (11), remained however sensitive to lorlatinib in both *in vitro* models (12) and in the clinical setting (10). We therefore hypothesized that the ROS1 mutations we detected would exhibit a superposable pattern of response to the different ALK/ROS1 TKIs. Experiments on engineered Ba/F3 cells confirmed our conjecture, and the patient was indeed successfully addressed to lorlatinib treatment. We therefore predicted overlapping profiles of sensitivity of ROS1 and ALK corresponding mutations to the different TKIs.

Materials and Methods**Molecular analyses**

Comparative genomic hybridization (CGH) analysis (Agilent technology) was performed following standard procedures (13). ROS1 and ALK rearrangements were evaluated by FISH, as previously described (5, 14), and threshold for positivity attribution was defined according to current recommendations. The fusion partner of the ROS1-rearranged gene was identified by RNAseq analysis (Illumina technology), and ROS1 resistance mutations were identified by whole-exome sequencing (WES; Illumina technology).

Clinical trials

The patient provided written informed consent to participate in the molecular screening studies MOSCATO (NCT01566019) and MATCH-R (NCT02517892) of serial biopsy specimens. Both trials are ongoing at Gustave Roussy Cancer Center. Lorlatinib is administered in the phase I/II clinical trial (NCT01970865), enrolling patients suffering from ALK- or ROS1-rearranged NSCLC.

Cell lines and viability assays

Ba/F3 cells were purchased from DSMZ cell bank less than 6 months ago and confirmed as mouse origin with IEF of AST, MDH, NP, PEP B, and with species PCR. Cells were confirmed Mycoplasma negative using microbiological culture, RNA hybridization, and PCR assays. Ba/F3 cells were transduced with lentiviral constructs in order to express the EZR-ROS1 fusion protein harboring different ROS1 resistance mutations. Cell-survival assays were performed as previously described (11).

Immunoblot analyses

Native, EZR-ROS1^{WT}, EZR-ROS1^{G2032R}, EZR-ROS1^{S1986F}, and EZR-ROS1^{S1986Y} Ba/F3-expressing cells were treated with the indicated concentrations of inhibitors for 3 hours. Immunoblotting was performed as previously described (11). Phospho-ERK (T202/Y204), ERK, S6, phospho-S6 (S240/244), phospho-AKT (S473), AKT, phospho-ROS1 (Y2274), and ROS1 antibodies were obtained from Cell Signaling Technology.

ALK and ROS1 sequence alignment

ALK and ROS1 proteins share 77% of their active site amino acid sequence. Sequence alignment for ALK and ROS1 was described by Ou and colleagues (6) and obtained by Log-Expression (MUSCLE) software.

Structural characterization of ROS1^{S1986Y/F} mutants

In-silico studies were performed by Life Chemicals. The initial ROS1 structure 4UJL was downloaded from the protein data bank. Mutated proteins and reconstructed gaps were generated with the Swiss-model server. Gromacs package 4.5.5 and amber99sb force field were used to perform fast simulations of the wild-type and mutant ROS1 structures. We used TIP3P water model to get the protein solved in the octahedron with a 10 Å radius. AmberTools 14 antechamber module was used to generate topology of ligands in AM1-bcc approach. A total of 25,000 steps of steepest descent energy minimization were carried before the equilibration step at constant temperature and pressure. The long-range electrostatic interactions were handled by particle-mesh Ewald algorithm, whereas constrains bond lengths by LINCS algorithm. A heat-annealing code was used for conformational mobility of the protein with periodic temperature changes for each 100 picoseconds (ps) from 100 to 320 Kelvin (K), as a modification of default parameters. The simulation time was set to 5,000 ps with integration time step of 2 femtoseconds. A free molecular dynamics (MD) simulation without any intervention in the system was then performed in a 10 ns time-lapse. Root mean square deviation (RMSD), root mean square fluctuation (RMSF), and protein-ligand interaction energies were analyzed starting from free MD with the respective Gromacs tools. Average structures were generated from last 5 ns of free MD with g-cluster tool utilizing a RMSD cut-off of 0.1 nmol/L and were then visualized with PyMol software.

Results**ROS1 S1986Y and S1986F mutations confer crizotinib resistance overcome by lorlatinib in an EZR-ROS1 NSCLC patient**

In August 2010, a 63-year-old male never-smoker was diagnosed with stage IV lung adenocarcinoma with diffuse lymph node and pleural involvement. No EGFR, KRAS, PI3K, BRAF, and

HER2 mutations were found (Sanger sequencing) in the diagnostic specimen, and a search for an *ALK* translocation proved negative. First-line treatment, including cisplatin, gemcitabine, and the PARP inhibitor, iniparib (NCT01086254), started in September 2010. Therapy was administered up to the sixth cycle with good clinical and radiological responses (~44% according to RECIST 1.1 as the best response). When pulmonary disease progression was documented in April 2012, second-line treatment with pemetrexed was initiated leading to a prolonged partial response.

A new CT scan-guided biopsy of the left pleura was performed in January 2013. Histology confirmed the presence of a TTF1-positive lung adenocarcinoma, whereas CGH analysis led to the detection of *HOMX7* gene amplification and deletion of the 3' region of *ROS1*. FISH showed *ROS1* rearrangement in 40% of tumor cells (Fig. 1A), and *EZR* was identified as the *ROS1* fusion partner by RNAseq. Targeted next-generation sequencing on a panel of 50 cancer genes did not reveal any mutation. *ROS1* rearrangement was confirmed by FISH in circulating tumor cells (15).

After a total of 17 pemetrexed cycles from April 2012 to September 2013, manifest bilateral lung progression was detected, and third-line therapy with off-label crizotinib, 250 mg twice daily, was initiated. Previous coughing symptoms disappeared a few days after treatment initiation, and after 40 days of treatment, CT scans depicted a profound thoracic response, with clear shrinkage of parenchymal lesions dimensions. Crizotinib exerted a clinical activity maintained over time, with the best radiological response achieved in March 2014, after 6 months of therapy (~75% according to RECIST 1.1).

Disease control and excellent clinical tolerability persisted over 22 months of TKI therapy, and disease progression was first detected in July 2015; crizotinib administration was maintained beyond tumor progression with still a major clinical benefit. In order to explore the molecular events explaining crizotinib secondary resistance, a new CT scan-guided biopsy was performed on a left lung cancer nodule. WES analysis uncovered the presence of molecular alterations in exon 37 of the *ROS1* gene, corresponding to the *ROS1* tyrosine kinase domain. Mutations consisted of serine-to-tyrosine and to-phenylalanine substitutions in codon 1986 (S1986Y/F) of *ROS1* (Fig. 1B). The specimen analyzed contained 70% of cancer cells, and tyrosine and phenylalanine substitutions were found respectively in 18% and 17% of WES reads. No other relevant molecular alterations were identified (Supplementary Table S1).

The patient was therefore enrolled in the phase I/II clinical trial evaluating lorlatinib activity (NCT01970865), given the strong *in vitro* evidence of the activity of this compound against the analogous C1156Y *ALK* mutation.(12) As depicted in Fig. 1B, although not strictly conserved, native 1986 *ROS1* and 1156 *ALK* codons respectively harbor serine (S) and cysteine (C) amino acid residues, whose structures are markedly similar. A single missense mutation generates the substitution of serine to tyrosine (Y)/phenylalanine (F) for *ROS1* and from cysteine to tyrosine for *ALK*. Tyrosine and phenylalanine have comparable structures with a benzoic group, indicating that they act in a superposable manner modifying *ROS1* S1986Y/F and *ALK* C1156Y conformations. Lorlatinib administration, 100 mg daily, started at the beginning of December 2015 with a suboptimal tolerance profile, characterized by grade I hypercholesterolemia and peripheral neuropathy. The first evaluation CT scan performed 40 days after treat-

ment initiation showed an impressive disease response, confirmed at the second radiologic evaluation at the third month of lorlatinib treatment (~89% according to RECIST 1.1; Fig. 1C). Disease remains controlled without any signs of progression after 6 months of therapy (June 2016).

Functional characterization of novel *ROS1* mutations

In order to investigate the effect of *ROS1* mutations on *ROS1* sensitivity to TKIs, we generated Ba/F3 cells expressing *EZR-ROS1*^{WT}, *EZR-ROS1*^{G2032R}, *EZR-ROS1*^{S1986F}, and *EZR-ROS1*^{S1986Y}. The cells were treated with increasing concentrations of crizotinib, ceritinib, and lorlatinib (Fig. 2A). The results of viability assays confirmed the superiority of lorlatinib (≈ 7 –10-fold lower IC₅₀) against *ROS1*^{WT}-expressing cells compared with crizotinib and ceritinib. The latter showed similar IC₅₀ values in inhibiting *ROS1*^{WT}, with contrast to the pronounced biological superiority of ceritinib compared with crizotinib against the native *ALK* form (11). As suggested by structure analogies with *ALK*, S1986F/Y substitutions in the *ROS1* kinase domain led to crizotinib and ceritinib resistance. However, lorlatinib maintained its strong inhibitory activity against S1986F and S1986Y mutations (Fig. 2A). The first and most reported *ROS1* G2032R mutation (7, 16, 17) engendered resistance to the three compounds (Fig. 2A).

Immunoblot analyses of *ROS1* and downstream pathway activation corroborated the cell survival assays. Lower doses of lorlatinib, compared with crizotinib and ceritinib, were required to decrease *ROS1* phosphorylation, whereas only a high concentration of lorlatinib appeared to have a mild effect on *ROS1*^{G2032R} phosphorylation (Fig. 2B). Crizotinib and ceritinib had only a mild effect on *ROS1* phosphorylation in cells harboring S1986F/Y mutations, which led to persistent S6 phosphorylation and cell survival. Only lorlatinib was able to completely switch off *ROS1*, AKT, and ERK signaling leading to inhibition of S6 phosphorylation in the presence of S1986Y or S1986F mutations (Fig. 2B).

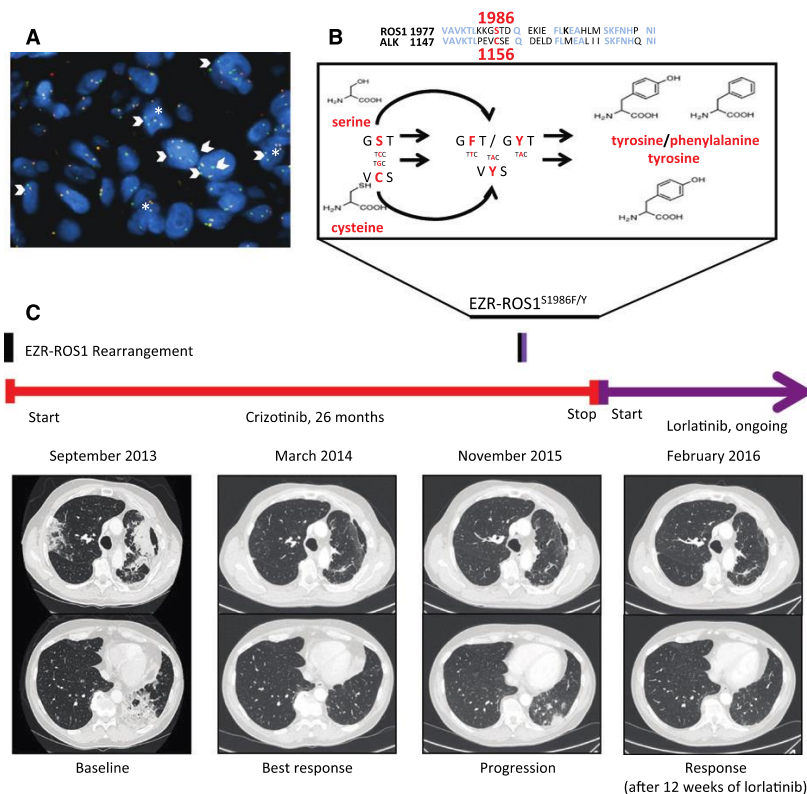
Taken together, these *in vitro* results revealed crizotinib and ceritinib resistance conferred by *ROS1* S1986F/Y mutations, against which lorlatinib maintained its inhibitory potency.

Structural basis for S1986Y/F mutations impact on *ROS1* structure and TKI binding

We performed molecular studies to acquire information about the conformational changes induced by the two uncovered mutations on *ROS1* structure. In the absence of ligands, we observed that mutant structures underwent some motions with comparison to the wild-type *ROS1* protein (Fig. 3). Importantly, we noticed that these mutations do not directly occur within the enzyme active site, but do actually impact on the α helix of the kinase domain, causing its movement with a following change in the tip of the close glycine-rich region, involving the residues from 1950 to 1960 (Fig. 3). As suggested by their similar structures, S1986Y and S1986F substitutions generated perfectly comparable conformations in *ROS1* kinase domain.

We also performed conformational studies involving protein-inhibitor complexes (Supplementary Fig. S1). With the intrinsic limits of the complexity concerning the mutation site, as already reported for the corresponding *ALK* C1156Y substitution (11), S1986Y/F mutations prevent crizotinib access to the kinase domain, whereas lorlatinib can fix and maintain its ability to

Facchinetti et al.

**Figure 1.**

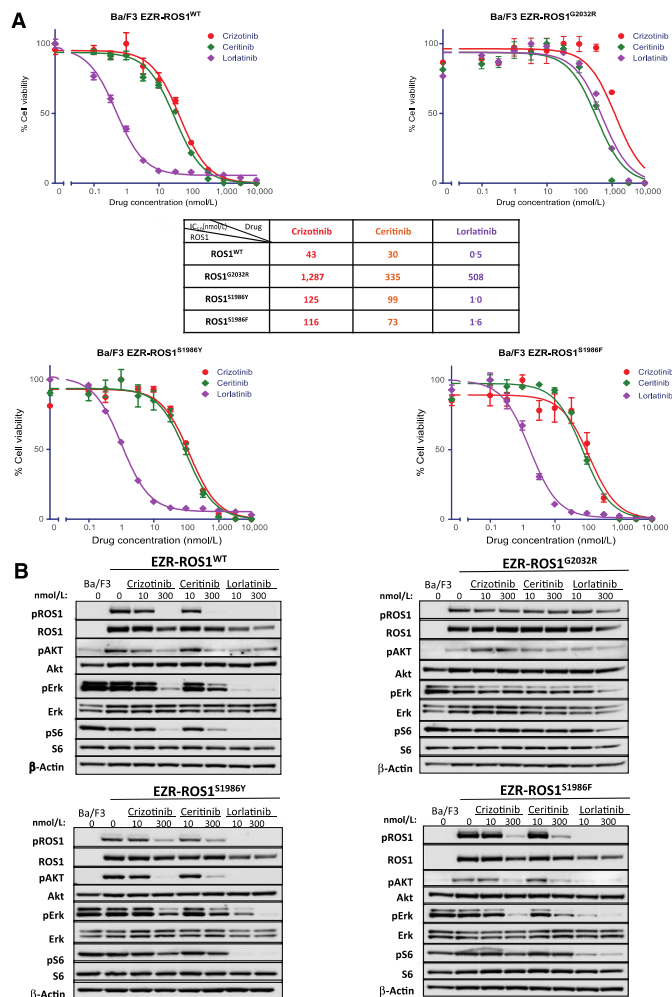
Novel ROS1 crizotinib-resistant mutations clinically overcome by lorlatinib. **A**, FISH analysis showed ROS1 split signal in 40% of cells, with a copy-number gain of both the native (red and green probes leading to yellow signal, asterisks) and the rearranged (green signal, arrowheads) ROS1 genes. **B**, Analogy between ROS1 and ALK amino acid sequences. The serine (S) at codon 1986 of ROS1 kinase domain corresponds to the I156 ALK cysteine (C). S1986Y and S1986F ROS1 substitutions emerge from TCC to TTC and TAC missense mutations, respectively. Although residues of 1986 ROS1 and I156 ALK codon do not match, both serine and cysteine are structurally close nucleophilic amino acids. The same conclusions can be drawn from the similarity between tyrosine (Y) and phenylalanine (F) aromatic conformations. Structural proximity between amino acids involved in respective ROS1 and ALK substitutions suggests similar effects on protein structure and upon steric interferences. **C**, Radiological evolution of lung lesions under ALK-TKIs treatment. After having undergone two systemic treatment lines, in September 2013, patient started crizotinib treatment, which led to deep and prolonged response upon diffuse lung metastatic sites. Disease progression was documented in July 2015 and confirmed 4 months later. Patient was successfully addressed to lorlatinib as a second ALK/ROS1 TKI.

induce a conformational shift in both wild-type and mutated ROS1 forms. In the case of crizotinib binding, the positioning of the glycine-rich loop tip of the α helix is inside-out, whereas it does present oppositely in the case of lorlatinib interaction, potentially explaining the differential capacity in inhibiting ROS1 mutants (Supplementary Fig. S1).

Prediction of ROS1 mutations identification and inhibitory profiles

All mutations *loci* reported so far in crizotinib-resistant ROS1-rearranged NSCLC [G2032R (7), D2033N (8)], and the present S1986Y/F, chronologically have already been reported in the clinic at the corresponding ALK kinase domain codons (G1202R,

New ROS1 Mutants and a Predictive Model for TKI Sensitivity

**Figure 2.**

Functional characterization of ALK/ROS1 TKIs inhibitory potential across different *ROS1* mutations. **A**, Cell viability assays upon Ba/F3 cells harboring EZR-ROS1^{WT}, EZR-ROS1^{G2032R}, EZR-ROS1^{S1986Y}, and EZR-ROS1^{S1986F} constructs, respectively. Ba/F3 cells were treated with the indicated doses of crizotinib, ceritinib, or lorlatinib for 48 hours. After the incubation, the cell survival was assayed by Cell-Titer-Glo. As depicted by survival curves and IC₅₀ table, lorlatinib displayed superior inhibitory activity against EZR-ROS1^{WT}, EZR-ROS1^{S1986Y}, and EZR-ROS1^{S1986F} compared with crizotinib and ceritinib. The central table resumes median values obtained from crizotinib, ceritinib, and lorlatinib treatment of the four mutants. Data are representative of three independent biological replicates. **B**, Immunoblot analyses show differential activity of crizotinib, ceritinib, and lorlatinib upon intracellular signaling inhibition in EZR-ROS1^{WT}, EZR-ROS1^{G2032R}, EZR-ROS1^{S1986Y}, and EZR-ROS1^{S1986F} Ba/F3 cells. Cells were treated with the indicated concentrations of TKI for 3 hours. Lysates were probed with antibodies directed against the indicated proteins. Inhibition of ROS1 and intracellular intermediates of MAPK and PI3K-AKT-mTOR pathways was achieved at lower doses for lorlatinib (10 nmol/L) compared with crizotinib and ceritinib in ROS1^{WT} and ROS1^{S1986Y/F} cells. Experiments were repeated three times.

Facchinetti et al.

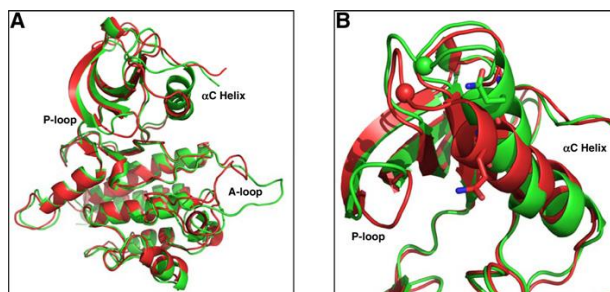


Figure 3. Visual representation of wild-type and S1986Y/F mutants ROS1 structures. **A**, Alignment of the complete structures of the wild-type (green) and mutated (red) ROS1 forms. No difference was noticed between tyrosine or phenylalanine mutations at 1986 codon. The conformational changes generated by the mutations mainly involve three structural elements of ROS1 N-lobe: the alphaC helix, the P-loop (harboring the glycine-rich region within codons 1950–1960), and the A-loop. **B**, Detailed representation of the alphaC helix displacement due to the different state of the glycine-rich region of P-loop in the mutated protein. 1986 codons are marked with spheres. The images were created by PyMol software (www.pymol.org).

D1203N, and C1156Y, respectively; Fig. 4). In addition to a perfect match in involved amino acids, functional consequences, in terms of structure and TKI sensitivity, overlapped between ROS1 S1986Y/F and ALK C1156Y, as depicted above (Figs. 1B and 2). Therefore, ROS1 and ALK kinase domains do not only share phylogenetic origin and structure homology, but also mutational hotspots and TKI sensitivity. We can therefore predict that any of the ALK-resistant mutations could be identified in ROS1-rearranged tumors and confer specific TKI resistance. Those mutations would be the 1981Tins, L1982F, S1986Y/F (reported here), M2001T, F2004C/V, L2026M, G2032R (7), D2033N (8), and G2101A (Fig. 4).

With regard to ALK analogy, the 1981Tins, L1982F, S1986Y/F, F2004C/V, and D2033N ROS1 mutations (homologous to the L151Tins, L1152R, C1156Y, F1174C/V, and D1203N ALK mutations, respectively) would be ceritinib resistant and lorlatinib sensitive (Fig. 4; refs. 11, 12). The M2001T, the gatekeeper L2026M, and the G2101A ROS1 mutations (corresponding to I1171T, L1196M, and G1269A ALK mutations, respectively) would still be prone to ceritinib inhibition (Fig. 4), due to smaller dimensions allowing access to the ATP-binding pocket (11). Remarkably, recent evidence confirmed our predictions concerning ceritinib lack of activity against D2033N and L1982F mutations (8, 16), as we functionally validated here for S1986Y/F mutants and ceritinib efficacy against the L2026M gatekeeper mutation (18).

Of note, not all described ALK secondary mutations can be acquired in ROS1 kinase domain. An arginine (R) residue cannot substitute the leucine (L) of L1982 ROS1 codon as a consequence of a single nucleotide base mutation as observed for ALK L1152R mutation. However, Katayama and colleagues have reported a L1982F mutation conferring crizotinib and ceritinib resistance in a mutagenesis screening (16). ROS1 cannot either acquire the homologous of L1198F (resistant to ceritinib and lorlatinib, crizotinib re-sensitizing; ref. 10) and S1206Y ALK mutation, as a result of a single-nucleotide modification. Similarly, M2001 ROS1 codon can give rise to M2001T but not to M2001S or

M2001N as reported for ALK I1171 codon (Supplementary Table S2; refs. 19, 20).

Discussion

Growing attention is currently being devoted to the identification of resistance mechanisms to targeted therapies, to better guide treatment strategies and impact favorably on patient outcomes. We report two novel mutations in the ROS1 kinase domain capable of conferring crizotinib resistance but allowing lorlatinib efficacy. Using Ba/F3 cells expressing native or mutated EZR-ROS1, we functionally demonstrated that S1986F/Y substitutions confer crizotinib and ceritinib resistance. Lorlatinib, more potent against WT ROS1 compared with crizotinib and ceritinib, maintained strong growth inhibition of ROS1^{S1986F/Y} cells (Fig. 2A). Immunoblot analyses confirmed that lorlatinib was the only ALK/ROS1 TKI tested capable of completely switching off ROS1 and downstream signaling phosphorylation in engineered Ba/F3 cells (Fig. 2B). Early clinical data supported lorlatinib strong efficacy by reporting remarkable tumor response rates, including partial and complete intracranial remissions (21).

We moreover confirmed that G2032R, the first documented and most reported ROS1 secondary mutation, confers resistance to crizotinib and ceritinib. Lorlatinib activity against this mutation ($IC_{50} \cong 500$ nmol/L) suggested that the third-generation compound would not be able to reverse resistance in the clinic. As other *in vitro* data (18) suggested a potential lorlatinib efficacy on this mutation, clinical activity remains to be sorted out. Recent evidence suggests potential activity of board-spectrum TKIs such as foretinib and cabozantinib against G2032R ROS1 mutation (16–18, 22). Similarly, cabozantinib has recently been shown to overcome D2033N, the other ROS1-resistant mutation, both in *in vitro* models and in a patient (8). The therapeutic index of these multitargeted kinase inhibitors against the G2032R ROS1 mutation has not yet been clinically investigated.

Crystallographic features and docking studies for ROS1 kinase domain have already been described (7, 22). Regarding the

New ROS1 Mutants and a Predictive Model for TKI Sensitivity

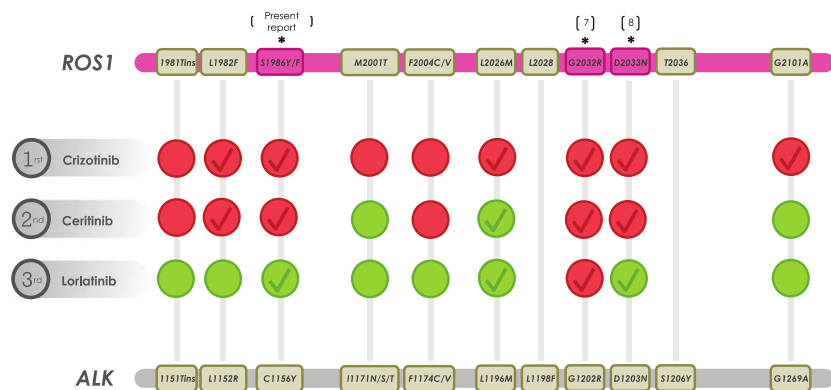


Figure 4.

Modeling theoretical sensitivity of ROS1 patients according to their mutational status. The present figure depicts the validated (✓) and predicted activity patterns of crizotinib, ceritinib, and lorlatinib against ROS1 mutations homologous to reported ALK-resistant mutations. Magenta boxes contain ROS1 mutations already reported in NSCLC patients. Red and green circles indicate resistance or sensitivity of the mutated protein, respectively. ROS1 mutations homologous to L1198F and S1206Y ALK ones cannot develop as a result of a single-nucleotide substitution (Supplementary Table S2).

current S1986F/Y mutations, Shaw and colleagues recently described structural alteration of the analogous C1156Y ALK mutation (10). Generating co-crystal structures of the native or mutated kinase domains coupled with crizotinib or lorlatinib, the authors observed that substitution at codon C1156 would probably not directly affect drug binding, due to its relatively remote distance from the inhibitor binding site. The structural studies we performed revealed a similar situation concerning S1986Y/F ROS1 mutations, supposed to trigger a conformational shift in the alphaC helix and the glycine-rich region close to the active site of the enzyme (Fig. 3). The latter event appears to impact on crizotinib binding while allowing the access and the inhibitory activity of lorlatinib into the kinase domain (Supplementary Fig. S1).

In their report, Shaw and colleagues reported two mutations within the same ALK allele, C1156Y/L1198F (10). In our case, the two mutations at the exact same position can either be on two distinct translocated ROS1 alleles within the same cell or in two individual cells. In addition to being technically challenging to investigate, it did not seem crucial here to examine whether the two mutations were in the same cells. Indeed, the two mutants displayed identical sensitivity to the different TKIs tested, and cell sensitivity would be the same with one or two mutants of the ROS1 protein.

Along with the functional characterization of the novel S1986F/Y ROS1 mutations, the present study focuses on the transposability of ALK-validated therapeutic approaches to ROS1 secondary mutations. Based on ALK and ROS1 similarity in kinase domain sequences, common pharmacologic susceptibility, and homologous hotspots *loci* involved in molecular events, we developed a model predicting sensitivity of 9 ROS1 mutants to different generations of ALK/ROS1 TKIs (Fig. 4). Six of these putative ROS1 secondary mutations have been studied for some TKI in preclinical models, and the data the authors obtained

matched our prediction based on ALK knowledge (Fig. 4; refs. 7, 8, 16–18). We cannot however exclude that other ROS1 mutations could occur, and functional studies will be required to directly assess TKI sensitivity. If 11 different mutations conferring resistance to TKIs have already been reported in ALK-rearranged NSCLC thus far (9–11, 19, 23, 24), three secondary mutations have been documented in ROS1-rearranged tumors [G2032R (7), D2033N (8), and the present S1986Y/F]. This discrepancy is ostensibly due to the number of patients with ALK-rearranged disease, about 4 to 5 times higher compared with ROS1-rearranged NSCLC (21), and the fact that therapeutic targeting against ALK began earlier.

Besides ROS1 kinase domains mutations, crizotinib resistance has been reported to emerge due to EGFR (25), RAS (26), or KIT signaling activation (27). Remarkably, the three events have also been reported in ALK-rearranged tumors and suggest the potential of dual target inhibition (19, 23). Pharmacokinetic issues can account for a significant part of resistance to crizotinib and other inhibitors in ALK-rearranged NSCLC, and the equivalent scenario can be depicted for tumors harboring ROS1 fusion gene. The significant number of patients developing brain metastases during crizotinib treatment (28) reflects the scarce penetration of the compound across the blood–brain barrier (29). The novel ALK/ROS1 inhibitors have been designed to obtain a better performance over brain metastases and are indeed showing remarkable results, with a special mention accorded to lorlatinib (12, 21). Recently, ALK-rearranged cells have been proven to adapt to both crizotinib and ceritinib treatment by the overexpression of the p-glycoprotein, whereas lorlatinib and the second-generation ALK inhibitor alectinib are not suitable substrates for this efflux pump (30).

Anyhow, as further exhaustion of novel generation compounds does eventually lead to disease progression, treatment

Facchinetti et al.

combinations with downstream signaling cascade inhibitors, cytotoxic chemotherapies, or antiangiogenic antibodies represent potential strategies to approach the issue of acquired resistance (31).

As previously suggested (18), our experiments indicate that crizotinib and ceritinib display similar potency on WT ROS1. This is in contrast with the superior efficacy of ceritinib compared with crizotinib on WT ALK both in preclinical and clinical studies (11, 28, 32). Therefore, the ability of ceritinib to overcome crizotinib resistance in ROS1-rearranged tumors without secondary mutations, as it is the case for ALK-positive patients, would need to be directly addressed in the clinic.

Besides defining the pharmacologic susceptibility of ROS1 S1986F/Y mutations, the present report highlights the unavoidable contribution of molecular analyses of specimens obtained at disease progression under TKI therapy. The availability of tumor material thus far allows us to address treatment decisions and to undertake functional validations. The current study enabled us to confirm that the ROS1 S1986Y/F mutations confer resistance to both crizotinib and ceritinib and allowed more efficient patient treatment by avoiding a ceritinib therapy, which would very likely not have afforded a clinical benefit. It is actually challenging to drive specific indications for the treatment of ROS1-rearranged NSCLC patients, given the relative small incidence (1%–2% of all NSCLC), potentially designating ROS1 tumors as a "rare molecularly subtype of common cancers" (33). Given the absolute incidence of NSCLC, the number of patients harboring ROS1 rearrangement worldwide is still relevant. Validated data concerning ALK inhibition can be advantageously transposed to guide treatment decisions in ROS1-rearranged tumors. The current widespread access to deep molecular analyses would ostensibly reveal, for every patient, the specific ROS1 mutation responsible for crizotinib resistance, when it is actually due to kinase domain modifications. We therefore provide a predictive model which finds in the clinical setting its best field of both validation and exploitation. However, performing repeated biopsies in patients is not always feasible. A noninvasive method to detect molecular alterations conferring ALK and ROS1 resistance to TKIs, such as that finely developed for EGFR NSCLC with cell-free circulating tumor DNA (34), would be of inestimable interest.

References

1. Kan Z, Jaiswal BS, Stinson J, Janakiraman V, Bhatt D, Stern HM, et al. Diverse somatic mutation patterns and pathway alterations in human cancers. *Nature* 2010;466:869–73.
2. Shaw AT, Hsu PP, Awad MM, Engelman JA. Tyrosine kinase gene rearrangements in epithelial malignancies. *Nat Rev Cancer* 2013;13:772–87.
3. Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, Gurubhagavatula S, Okimoto RA, Brannigan BW, et al. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med* 2004;350:2129–39.
4. Rikova K, Guo A, Zeng Q, Possemato A, Yu J, Haack H, et al. Global survey of phosphotyrosine signaling identifies oncogenic kinases in lung cancer. *Cell* 2007;131:1190–203.
5. Shaw AT, Ou S-HI, Bang Y-J, Camidge DR, Solomon BJ, Salgia R, et al. Crizotinib in ROS1-rearranged non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2014;371:1963–71.
6. Ou S-HI, Tan J, Yen Y, Soo RA. ROS1 as a "druggable" receptor tyrosine kinase: Lessons learned from inhibiting the ALK pathway. *Expert Rev Anticancer Ther* 2012;12:447–56.
7. Awad MM, Katayama R, McTigue M, Liu W, Deng Y-L, Brooun A, et al. Acquired resistance to crizotinib from a mutation in CD74-ROS1. *N Engl J Med* 2013;368:2395–401.
8. Drilon A, Somwar R, Wagner JP, Vellere NA, Eide CA, Zabriskie MS, et al. A novel crizotinib-resistant solvent-front mutation responsive to cabozantinib therapy in a patient with ROS1-rearranged lung cancer. *Clin Cancer Res* 2016;22:2351–8.
9. Choi YL, Soda M, Yamashita Y, Ueno T, Takashima J, Nakajima T, et al. EML4-ALK mutations in lung cancer that confer resistance to ALK inhibitors. *N Engl J Med* 2010;363:1734–9.
10. Shaw AT, Friboulet L, Leshchiner I, Gainor JF, Bergqvist S, Brooun A, et al. Resensitization to crizotinib by the lorlatinib ALK resistance mutation L1198F. *N Engl J Med* 2015;374:54–61.
11. Friboulet L, Li N, Katayama R, Lee CC, Gainor JF, Crystal AS, et al. The ALK inhibitor ceritinib overcomes crizotinib resistance in non-small cell lung cancer. *Cancer Discov* 2014;4:662–73.
12. Zou H, Friboulet L, Kodack D, Engstrom L, Li Q, West M, et al. PF-06463922, an ALK/ROS1 inhibitor, overcomes resistance to first and

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

D. Planchard is a consultant/advisory board member for Pfizer. B. Besse reports receiving commercial research grants from Novartis and Pfizer. J. Remon is a consultant/advisory board member for osephearma. J.-C. Soria is a consultant/advisory board member for Pfizer. No potential conflicts of interest were disclosed by the other authors.

Authors' Contributions

Conception and design: F. Facchinetti, Y. Lorient, L. Lacroix, D. Planchard, B. Besse, F. André, J.-C. Soria, L. Friboulet
Development of methodology: F. Facchinetti, Y. Lorient, M.-S. Kuo, L. Lacroix, D. Planchard, J.-C. Soria, L. Friboulet
Acquisition of data (provided animals, acquired and managed patients, provided facilities, etc.): F. Facchinetti, Y. Lorient, M.-S. Kuo, L. Mahjoubi, L. Lacroix, D. Planchard, B. Besse, F. Farace, N. Auger, J.-Y. Scoazec, J.-C. Soria
Analysis and interpretation of data (e.g., statistical analysis, biostatistics, computational analysis): F. Facchinetti, Y. Lorient, M.-S. Kuo, L. Lacroix, D. Planchard, B. Besse, N. Auger, J.-C. Soria, L. Friboulet
Writing, review, and/or revision of the manuscript: F. Facchinetti, Y. Lorient, D. Planchard, B. Besse, N. Auger, J. Remon, J.-Y. Scoazec, F. André, J.-C. Soria, L. Friboulet
Administrative, technical, or material support (i.e., reporting or organizing data, constructing databases): F. Facchinetti, M.-S. Kuo, F. André, J.-C. Soria
Study supervision: F. André, J.-C. Soria, L. Friboulet
Other (patient CTC testing): F. Farace

Acknowledgments

We thank Roman Chabanon for graphical assistance, Ken Olausson for helpful discussions, and Lorna Saint-Ange for article editing. *In-silico* studies were performed by Life Chemicals' computational chemistry team. Especially, Alexey Rayevsky generated the predicted ROS1 kinase domain structure with S1986 mutation and ligand binding stability analysis for crizotinib and lorlatinib inhibitors.

Grand Support

This work is supported by Institut National du Cancer (INCa-DGOS-INSERM 6043) and Lombard Odier Foundation. F. Facchinetti is financed by the University of Modena and Reggio Emilia (Italy), through its association with the University Hospital of Parma (Italy).

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

Received April 12, 2016; revised June 20, 2016; accepted June 22, 2016; published OnlineFirst July 11, 2016.

- second generation ALK inhibitors in preclinical models. *Cancer Cell* 2015;28:70–81.
13. Barrett MT, Scheffer A, Ben-Dor A, Sampas N, Lipson D, Kincaid R, et al. Comparative genomic hybridization using oligonucleotide microarrays and total genomic DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:17765–70.
 14. 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;363:1693–703.
 15. Pailler E, Auger N, Lindsay CR, Vielh P, Islas-Morris-Hernandez A, Borget I, et al. High level of chromosomal instability in circulating tumor cells of ROS1-rearranged non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol* 2015;26:1408–15.
 16. Katayama R, Kobayashi Y, Friboulet L, Lockerman EL, Koike S, Shaw AT, et al. Cabozantinib overcomes crizotinib resistance in ROS1 fusion-positive cancer. *Clin Cancer Res* 2015;21:166–74.
 17. Song A, Kim TM, Kim D-W, Kim S, Kean B, Lee S-H, et al. Molecular changes associated with acquired resistance to crizotinib in ROS1-rearranged non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2015;21:2379–87.
 18. Zou HY, Li Q, Engstrom LD, West M, Appleman V, Wong KA, et al. PF-06463922 is a potent and selective next-generation ROS1/ALK inhibitor capable of blocking crizotinib-resistant ROS1 mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015;112:3493–8.
 19. Katayama R, Shaw AT, Khan TM, Mino-Kenudson M, Solomon BJ, Halmos B, et al. Mechanisms of acquired crizotinib resistance in ALK-rearranged lung cancers. *Sci Transl Med* 2012;4:120ra17.
 20. Ou S-H, Klempner SJ, Greenbowe JR, Azada M, Schrock AB, Ali SM, et al. Identification of a novel HIP1-ALK fusion variant in non-small-cell lung cancer (NSCLC) and discovery of ALK H1171 (H1171N/S) mutations in two ALK-rearranged NSCLC patients with resistance to alectinib. *J Thorac Oncol* 2014;9:1821–5.
 21. Bauer T, Solomon BJ, Besse B, Navarro A, James L, Clancy J, et al. Clinical activity and safety of the ALK/ROS1 TKI Inhibitor PF-06463922 in advanced NSCLC. *J Thor Oncol* 2015;10:S239.
 22. Davare MA, Vellore NA, Wagner JP, Eide CA, Goodman JR, Drilon A, et al. Structural insight into selectivity and resistance profiles of ROS1 tyrosine kinase inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015;112:E5381–90.
 23. Doebele RC, Pilling AB, Aisner DL, Kutateladze TG, Le AT, Weickhardt AJ, et al. Mechanisms of resistance to crizotinib in patients with ALK gene rearranged non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2012;18:1472–82.
 24. Camidge DR, Doebele RC. Treating ALK-positive lung cancer—early successes and future challenges. *Nat Rev Clin Oncol* 2012;9:268–77.
 25. Davies KD, Mahale S, Astling DP, Aisner DL, Le AT, Hinz TK, et al. Resistance to ROS1 inhibition mediated by EGFR pathway activation in non-small cell lung cancer. *PLoS One* 2013;8:1–13.
 26. Cargnelutti M, Corso S, Pergolizzi M, Mévellec L, Aisner DL, Dziadziuszko R, et al. Activation of RAS family members confers resistance to ROS1 targeting drugs. *Oncotarget* 2015;6:5182–94.
 27. Dziadziuszko R, Le AT, Aisner DL, Wrona A, Doebele RC. ROS1 resistance to crizotinib is mediated by an activating mutation in c-KIT. *J Thorac Oncol* 2015;10:S374.
 28. Chun SC, Choe KS, Iyengar P, Yordy JS, Timmerman RD. Isolated central nervous system progression on crizotinib: An Achilles heel of non-small cell lung cancer with EML4-ALK translocation? *Cancer Biol Ther* 2012;13:1376–83.
 29. Costa DB, Kobayashi S, Pandya SS, Yeo WL, Shen Z, Tan W, et al. CSF concentration of the anaplastic lymphoma kinase inhibitor crizotinib. *J Clin Oncol* 2011;29:e443–5.
 30. Katayama R, Sakashita T, Yanagitani N, Ninomiya H, Horiike A, Friboulet L, et al. P-glycoprotein mediates crizotinib resistance in anaplastic lymphoma kinase-rearranged non-small cell lung cancer. *EBioMedicine* 2016;3:54–66.
 31. Costa DB. ALK inhibitors: Plateauing systemic and intracranial activity? *Lancet Oncol* 2016 Mar 10. [Epub ahead of print].
 32. Shaw AT, Kim D-W, Mehra R, Tan DSW, Felip E, Chow LQM, et al. Crizotinib in ALK-rearranged non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2014;370:1189–97.
 33. Boyd N, Dancy JE, Gilks CB, Huntsman DG. Rare cancers: a sea of opportunity. *Lancet Oncol* 2016;17:e52–61.
 34. Thress KS, Pawletz CP, Felip E, Cho BC, Stetson D, Dougherty B, et al. Acquired EGFR C797S mutation mediates resistance to AZD9291 in non-small cell lung cancer harboring EGFR T790M. *Nat Med* 2015;21:560–2.

Published OnlineFirst July 11, 2016; DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-16-0917

AACR American Association
for Cancer Research

Clinical Cancer Research

Crizotinib-Resistant *ROS1* Mutations Reveal a Predictive Kinase Inhibitor Sensitivity Model for *ROS1*- and *ALK*-Rearranged Lung Cancers

Francesco Facchinetti, Yohann Loriot, Mei-Shiue Kuo, et al.

Clin Cancer Res 2016;22:5983-5991. Published OnlineFirst July 11, 2016.

Updated version	Access the most recent version of this article at: doi: 10.1158/1078-0432.CCR-16-0917
Supplementary Material	Access the most recent supplemental material at: http://clincancerres.aacrjournals.org/content/suppl/2016/07/09/1078-0432.CCR-16-0917.DC1

Cited articles	This article cites 33 articles, 11 of which you can access for free at: http://clincancerres.aacrjournals.org/content/22/24/5983.full#ref-list-1
-----------------------	--

E-mail alerts	Sign up to receive free email-alerts related to this article or journal.
Reprints and Subscriptions	To order reprints of this article or to subscribe to the journal, contact the AACR Publications Department at pubs@aacr.org .
Permissions	To request permission to re-use all or part of this article, contact the AACR Publications Department at permissions@aacr.org .

ANNEXE 3

CASE REPORT



Acquired *EGFR* Mutation as the Potential Resistance Driver to Crizotinib in a *MET*-Mutated Tumor

Marc-Antoine Bendersa, MD,^a Sandrine Aspeslagh, PhD,^a
 Sophie Postel-Vinay, PhD,^{a,b,c} Ludovic Bigot, MD,^c Thierry De Baere, PhD,^d
 Yohann Lorient, PhD,^{c,e} Ludovic Lacroix, PhD,^{f,g} Christophe Massard, PhD,^{a,e}
 Gilles Vassal, PhD,^h Fabrice André, PhD,^{b,c} Jean-Charles Soria, PhD^{a,b,c,*}

^aDITEP (Département d'Innovations Thérapeutiques et Essais Précoces), Gustave Roussy Cancer Campus, Villejuif, France

^bFaculté de médecine Paris-Sud XI, Kremlin-Bicêtre, France

^cU981 INSERM, Gustave Roussy Cancer Campus, Villejuif, France

^dRadiologie interventionnelle, Gustave Roussy Cancer Campus, Villejuif, France

^eDépartement de Médecine Oncologique, Gustave Roussy Cancer Campus, Villejuif, France

^fLaboratoire de Recherche Translationnelle et Centre de Ressources Biologiques, AMMICA, INSERM U523/CNRS UMS3655, Gustave Roussy Cancer Campus, Villejuif, France

^gDépartement de Biologie et Pathologie Médicales, Gustave Roussy Cancer Campus, Villejuif, France

^hDirection de la recherche clinique, Gustave Roussy Cancer Campus, Villejuif, France

Received 20 August 2015; accepted 24 August 2015

One major advance of the past decade in anticancer treatment is the advent of precision medicine and personalized therapy, which has led to several therapeutic successes.^{1,2} The efficacy of targeted therapies is unavoidably limited in time, however, and acquired resistance ultimately occurs.

Here, we report the case of a 59-year-old white woman with no smoking history who was diagnosed with metastatic adenocarcinoma of the lung. At diagnosis, restricted molecular analysis of the primary tumor showed epidermal growth factor receptor (*EGFR*), B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase (*BRAF*), and Kristen rat sarcoma viral oncogene homolog (*KRAS*) wild type and the absence of anaplastic lymphoma kinase (*ALK*) translocation. After three lines of conventional therapy, she was included in a phase 1 trial evaluating a gamma secretase inhibitor, during which the disease remained stable for 18 months. A second lung biopsy sample (containing 40% tumor cells) was then obtained as part of the MOSCATO (Molecular Screening for Cancer Treatment Optimization) trial at Gustave Roussy Cancer Campus (NCT01566019). Comparative genomic hybridization analyses revealed an MDM2 proto-oncogene, E3 ubiquitin protein ligase (*MDM2*) amplification, and targeted next-generation sequencing showed a *MET* proto-oncogene, receptor tyrosine kinase (*MET*) activating mutation (NM_001127500.1:c.3082G>C; p.Asp1028His or p.D1028H, allele frequency 18%).

On the basis of this molecular profile, crizotinib (Xalkori, Pfizer) was initiated as part of the basket AcSé Crizotinib trial (NCT02034981). Crizotinib resulted in a 56% reduction in size of the target lesions that was followed by progression of the disease 10 months later (Fig. 1). The patient was then enrolled in the MATCH-R (A Prospective Trial to Study the Evolution of Clonal Architecture of Tumors from Patients Treated with Molecular Targeted Agents) trial at Gustave Roussy Cancer Campus, in which next-generation sequencing, comparative genomic hybridization, and patient-derived xenografts from tumors that progress during administration of targeted therapy (ID-RCB number: 2014-A01147-40) are performed. Biopsy of the progressing pulmonary lymph node (containing 70% tumor cells) revealed a novel *EGFR* amplification (log ratio 1.21) associated with an activating mutation of *EGFR* located in a hot spot codon of p.Leu861Arg

*Corresponding author.

Disclosure: The authors declare no conflict of interest.

Address for correspondence: Jean-Charles Soria, PhD, Hôpital Gustave Roussy 114, Rue Edouard Vaillant 94800 VILLEJUIF, France Service DITEP. E-mail: Jean-Charles.Soria@gustaveroussy.fr

© 2015 International Association for the Study of Lung Cancer. Published by Elsevier Inc. All rights reserved.

ISSN: 1556-0864

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jtho.2015.08.001>

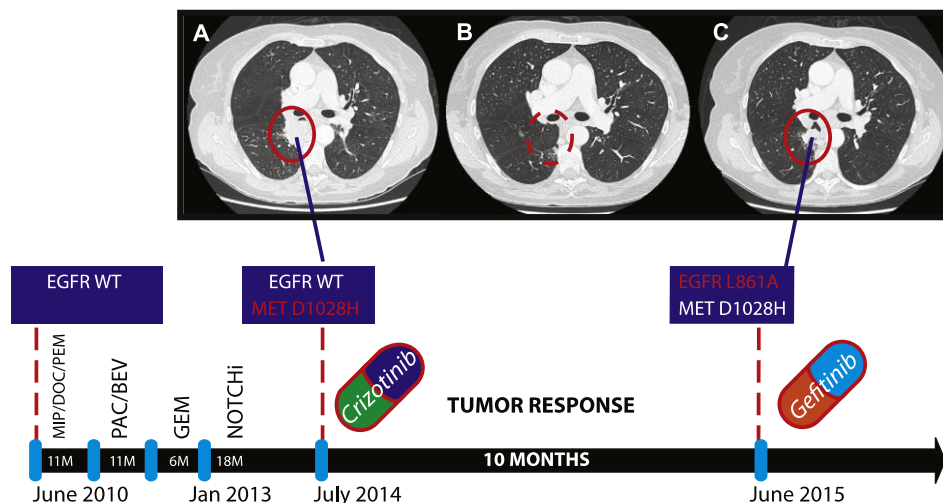


Figure 1. Patient 1: clinical course, including treatment history and relevant imaging studies and tumor biopsy specimens. Representative images from computed tomography of the chest at different times: (A) at baseline (before administration of crizotinib), showing right pulmonary lesion; (B) at 3 months, with an excellent tumor response in right pulmonary lesion; and (C) at 10 months, with tumor progression. Abbreviations: DOC, docetaxel; EGFR, epidermal growth factor receptor; GEM, gemcitabine; KRAS, Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog; M, months; MIP, mitomycin-ifosfamide-cisplatin; NOTCHi, inhibitor of the Notch pathway; PAC-BEV, paclitaxel-bevacizumab; PEM, pemetrexed; WT, wild-type.

(p.L861R, allele frequency 53%) activating mutation on exon 21. The p.D1028H *MET* mutation was still present (allele frequency 6%). Given this molecular profile and the patient's resistance to crizotinib, administration of

the epidermal growth factor receptor (EGFR) inhibitor gefitinib was initiated.

Crizotinib is registered primarily for *ALK*-translocated non-small cell lung cancer. Therefore, most resistance

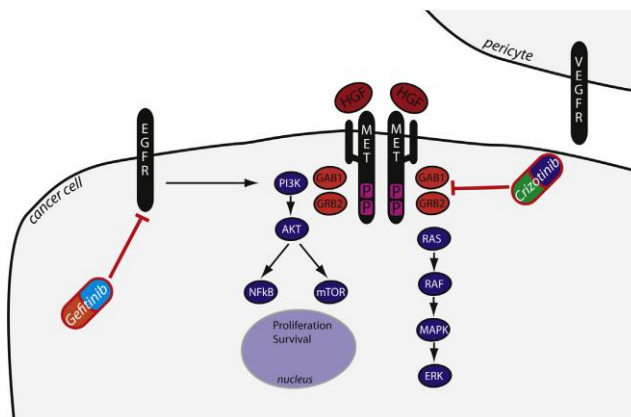


Figure 2. Signaling pathways activated by hepatocyte growth factor and MET. Cytoplasmic effector molecules, including growth factor receptor-bound protein 2 (GRB2) and GRB2-associated binding protein (GAB1) are recruited to the docking site. Abbreviations: AKT, protein kinase B; ERK, extracellular signal-regulated kinase; HGF, hepatocyte growth factor; MAPK, mitogen-activated protein kinases; mTOR, mammalian target of rapamycin; NFκB, nuclear factor kappa B; PI3K, phosphatidylinositol 3-OH-kinase; VEGFR, vascular endothelial growth factor receptor.

mechanisms have been described in this context and include the following: secondary *ALK* mutations (28%), *ALK* copy number gain (18%), *EGFR* mutations (36%, mainly exon 20 p.S768I and exon 21 p.L858R mutations), and rare *KRAS* mutations.³ Approximately one-fifth of the resistance mechanisms remain unknown. Interestingly, crizotinib was initially developed as a *MET* inhibitor,⁴ and some clinical trials are still evaluating it for that indication (NCT00585195). *MET* exon14 alterations (4% of adenocarcinomas of the lung⁵) lead to crizotinib sensitivity.⁶ Whether mechanisms of resistance to crizotinib used in a *MET*-mutated population are the same as those in an *ALK*-translocated population is still unknown (Fig. 2). Logic would suggest that they could be divided into two groups: specific resistance mechanisms (consisting of mutation of the kinase domain of the target of interest, *ALK* or *MET*, respectively), and common resistance mechanisms, which would include the activation of alternative pathways to bypass inhibition of the oncogenic driver. Interestingly, the *EGFR* mutation described here had not been observed previously in the crizotinib-resistant *ALK*-translocated population, which suggests greater “target specificity” of the resistance mechanisms.

This case also illustrates the challenges of tumors’ temporal and spatial heterogeneity: the fact that despite a deep coverage of 3086 X at the corresponding position, the *EGFR* p.L861R mutation was not detected at the initiation of crizotinib therapy does not rule out the possibility that it was already present at another tumor location or at undetectable levels in a subclone.

In summary, here we have described a previously unreported *EGFR* activating hot spot mutation as an

acquired mechanism of resistance to crizotinib in a *MET*-mutated non-small cell lung cancer tumor. This illustrates the importance of repeated molecular profiling in precision medicine.

Acknowledgment

Sandrine Aspeslagh is a European Society for Medical Oncology (ESMO) fellow (Prix Georges Mathé 2014).

References

1. Shaw AT, Kim D-W, Nakagawa K, et al. Crizotinib versus chemotherapy in advanced ALK-positive lung cancer. *N Engl J Med* 2013;368:2385-2394. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23724913>. Accessed May 10, 2015.
2. Fong PC, Boss DS, Yap TA, et al. Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase in tumors from BRCA mutation carriers. *N Engl J Med* 2009;361:123-134. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19553641>. Accessed June 29, 2015.
3. Doebele RC, Pilling AB, Aisner DL, et al. Mechanisms of resistance to crizotinib in patients with ALK gene rearranged non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2012;18:1472-1482.
4. Kwak EL, Bang Y-J, Camidge DR, et al. Anaplastic lymphoma kinase inhibition in non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2010;363:1693-1703.
5. Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma. *Nature* 2014;511:543-550.
6. Frampton GM, Ali SM, Rosenzweig M, et al. Activation of *MET* via diverse exon 14 splicing alterations occurs in multiple tumor types and confers clinical sensitivity to *MET* inhibitors. *Cancer Discov* 2015;5:850-859. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25971938>. Accessed July 21, 2015.

SERMENT D'HIPPOCRATE

Au moment d'être admis à exercer la médecine, en présence des maîtres de cette école et de mes condisciples, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité qui la régissent.

Mon premier souci sera, de rétablir, de préserver ou de promouvoir la santé dans tous les éléments physiques et mentaux, individuels collectifs et sociaux. Je respecterai toutes les personnes, leur autonomie et leur volonté, sans aucune discrimination selon leur état ou leurs convictions.

J'interviendrai pour les protéger si elles sont affaiblies, vulnérables ou menacées dans leur intégrité ou dignité. Même sous la contrainte, je ne ferai usage de mes connaissances contre les lois de l'humanité.

J'informerai les patients de décisions envisagées, de leurs raisons et de leurs conséquences. Je ne tromperai jamais leur confiance et n'exploiterai pas le pouvoir hérité des circonstances pour forcer leurs consciences.

Je donnerai mes soins à l'indigent et à quiconque me les demandera. Je ne me laisserai influencer ni par la recherche du gain ni par la recherche de la gloire.

Admis dans l'intimité des personnes, je tairai les secrets qui me sont confiés. Reçu à l'intérieur des maisons, je respecterai les secrets des foyers. Et ma conduite ne servira pas à corrompre les mœurs.

Je ferai tout pour soulager les souffrances, sans acharnement. Je ne provoquerai jamais la mort délibérément. Je préserverai l'indépendance nécessaire à l'accomplissement de ma mission. Que je sois modéré en tout, mais insatiable de mon amour de la science. Je n'entreprendrai rien qui ne dépasse mes compétences ; je les entretiendrai et les perfectionnerai pour assurer au mieux les services qui me seront demandés.

J'apporterai mon aide à mes confrères ainsi qu'à leurs familles dans l'adversité. Que les hommes et mes confrères m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses, Que je sois déshonoré et méprisé si j'y manque.

MAHJOUBI LINDA

Sujet de la thèse: Données préliminaires de l'étude MATCH R

Thèse: Médecine – Université des Antilles et de la Guyane – Année 2017

Qualification : Médecine Spécialité

Numéro d'identification: 2017ANTI0228

MOTS-CLES: Cancer; résistance; génomique

INTRODUCTION: L'ère des thérapies ciblées a révolutionné la prise en charge thérapeutique en oncologie. Cependant, les patients traités par thérapies ciblées rechutent systématiquement. L'étude MATCHR est une étude clinique et translationnelle prospective évaluant le rationnel moléculaire de la résistance aux thérapies ciblées chez des patients atteints de tumeurs solides.

MÉTHODE: Les analyses génomiques par séquençage ciblé, hybridation génomique comparative, séquençage de l'exome entier et de l'ARN ont été réalisées à partir de biopsies de lésion progressive. L'analyse translationnelle portait sur la réalisation des lignées cellulaires et l'obtention de xénogreffes dérivées de patients. L'objectif primaire était d'étudier l'évolution de l'architecture clonale des tumeurs de patients traités par thérapies ciblées.

RÉSULTATS: Sur un total de 57 patients inclus de Janvier 2015 à Décembre 2015, 24 patients avaient une tumeur solide et 22 ont eu un profil moléculaire. Huit patients étaient traités par un inhibiteur de tyrosine kinase anti-EGFR et quatre patients par un anti-ALK. 72% des patients avaient un adénocarcinome bronchique métastatique. Nous avons observé les mécanismes de résistance suivants: mutations EGFR T790M sous erlotinib et gefitinib, EGFR C797S et amplifications HER2 et MET sous osimertinib, mutations ROS1 S1986Y/F sous crizotinib, et activation de l'EGFR sous erdafitinib.

DISCUSSION: Cette étude a permis d'analyser les mécanismes de résistance aux thérapies ciblées par l'utilisation d'outils génomiques haut débit. Ces données préliminaires sont encourageantes et des sous-études avec biopsies avant anti-EGFR, anti-ALK et immunothérapies sont actuellement en cours.

JURY :

- Directeur de Thèse : Monsieur le Docteur Christophe Massard
- Président du Jury : Monsieur le Professeur Jean-Charles Soria
- Juges :
 - Monsieur le Professeur Michel Ducreux
 - Monsieur le Professeur Benjamin Besse
 - Monsieur le Docteur Patrick Escarmant
 - Monsieur le Docteur Luc Friboulet