



HAL
open science

Recherche de biomarqueurs tumoraux sur des biopsies bronchiques réalisées par écho-endoscopie radiale

Diane Gervereau-Fauconnet

► **To cite this version:**

Diane Gervereau-Fauconnet. Recherche de biomarqueurs tumoraux sur des biopsies bronchiques réalisées par écho-endoscopie radiale. Médecine humaine et pathologie. 2021. dumas-03368962

HAL Id: dumas-03368962

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03368962>

Submitted on 7 Oct 2021

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.

UFR DE SANTE DE ROUEN NORMANDIE

ANNEE 2020

N°

**THESE POUR LE
DOCTORAT EN MEDECINE**

(Diplôme d'Etat)

Par Diane GERVEREAU-FAUCONNET

NEE LE 5 avril 1993 à Chambray-lès-Tours

PRESENTEE ET SOUTENUE PUBLIQUEMENT le 15 septembre 2021

**RECHERCHE DE BIOMARQUEURS TUMORAUX SUR DES BIOPSIES
BRONCHIQUES REALISEES PAR ECHO-ENDOSCOPIE RADIALE**

PRESIDENT DU JURY : Professeur Luc THIBERVILLE

DIRECTEURS DE THESE : Docteur Florian GUISIER

MEMBRES DU JURY : Professeur Antoine CUVELIER

Professeur Mathieu SALAUN

Docteur Samy LACHKAR

ANNEE UNIVERSITAIRE 2020 - 2021

U.F.R. SANTÉ DE ROUEN

DOYEN : **Professeur Benoît VEBER**

ASSESEURS : **Professeur Loïc FAVENNEC**
Professeur Agnès LIARD
Professeur Guillaume SAVOYE

I - MEDECINE

PROFESSEURS DES UNIVERSITES – PRATICIENS HOSPITALIERS

Mr Frédéric ANSELME	HCN	Cardiologie
Mme Gisèle APTER	Havre	Pédopsychiatrie
Mme Isabelle AUQUIT AUCKBUR	HCN	Chirurgie plastique
Mr Jean-Marc BASTE	HCN	Chirurgie Thoracique
Mr Fabrice BAUER	HCN	Cardiologie
Mme Soumeya BEKRI	HCN	Biochimie et biologie moléculaire
Mr Ygal BENHAMOU	HCN	Médecine interne
Mr Jacques BENICHOU	HCN	Bio statistiques et informatique médicale
Mr Olivier BOYER	UFR	Immunologie
Mme Sophie CANDON	HCN	Immunologie
Mr François CARON	HCN	Maladies infectieuses et tropicales
Mr Philippe CHASSAGNE	HCN	Médecine interne (gériatrie)
Mr Moïse COEFFIER	HCN	Nutrition
Mr Vincent COMPERE	HCN	Anesthésiologie et réanimation chirurgicale
Mr Jean-Nicolas CORNU	HCN	Urologie

Mr Antoine CUVELIER	HB	Pneumologie
Mr Jean-Nicolas DACHER	HCN	Radiologie et imagerie médicale
Mr Stéfan DARMONI	HCN	Informatique médicale et techniques de communication
Mr Pierre DECHELOTTE	HCN	Nutrition
Mr Stéphane DERREY	HCN	Neurochirurgie
Mr Frédéric DI FIORE	CHB	Cancérologie
Mr Fabien DOGUET	HCN	Chirurgie Cardio Vasculaire
Mr Jean DOUCET	SJ	Thérapeutique - Médecine interne et gériatrie
Mr Bernard DUBRAY	CHB	Radiothérapie
Mr Frank DUJARDIN	HCN	Chirurgie orthopédique - Traumatologique
Mr Fabrice DUPARC	HCN	Anatomie - Chirurgie orthopédique et traumatologique
Mr Eric DURAND	HCN	Cardiologie
Mr Bertrand DUREUIL	HCN	Anesthésiologie et réanimation chirurgicale
Mme Hélène ELTCHANINOFF	HCN	Cardiologie
Mr Manuel ETIENNE	HCN	Maladies infectieuses et tropicales
Mr Thierry FREBOURG	UFR	Génétique
Mr Pierre FREGER (<i>surnombre</i>)	HCN	Anatomie - Neurochirurgie
Mr Jean François GEHANNO	HCN	Médecine et santé au travail
Mr Emmanuel GERARDIN	HCN	Imagerie médicale
Mme Priscille GERARDIN	HCN	Pédopsychiatrie
M. Guillaume GOURCEROL	HCN	Physiologie
Mr Dominique GUERROT	HCN	Néphrologie
Mme Julie GUEUDRY	HCN	Ophtalmologie
Mr Olivier GUILLIN	HCN	Psychiatrie Adultes
Mr Claude HOUDAYER	HCN	Génétique
Mr Fabrice JARDIN	CHB	Hématologie
Mr Luc-Marie JOLY	HCN	Médecine d'urgence
Mr Pascal JOLY	HCN	Dermato – Vénérologie
Mme Bouchra LAMIA	Havre	Pneumologie
Mme Annie LAQUERRIERE	HCN	Anatomie et cytologie pathologiques
Mr Vincent LAUDENBACH	HCN	Anesthésie et réanimation chirurgicale
Mr Hervé LEFEBVRE	HB	Endocrinologie et maladies métaboliques

Mr Thierry LEQUERRE	HCN	Rhumatologie
Mme Anne-Marie LEROI	HCN	Physiologie
Mr Hervé LEVESQUE	HCN	Médecine interne
Mme Agnès LIARD-ZMUDA	HCN	Chirurgie Infantile
Mr Pierre Yves LITZLER	HCN	Chirurgie cardiaque
M. David MALTETE	HCN	Neurologie
Mr Christophe MARGUET	HCN	Pédiatrie
Mme Isabelle MARIE	HCN	Médecine interne
Mr Jean-Paul MARIE	HCN	Oto-rhino-laryngologie
Mr Loïc MARPEAU	HCN	Gynécologie - Obstétrique
Mr Stéphane MARRET	HCN	Pédiatrie
Mme Véronique MERLE	HCN	Epidémiologie
Mr Pierre MICHEL	HCN	Hépto-gastro-entérologie
M. Benoit MISSET (<i>détachement</i>)	HCN	Réanimation Médicale
Mr Marc MURAINÉ	HCN	Ophtalmologie
Mr Christian PFISTER	HCN	Urologie
Mr Jean-Christophe PLANTIER	HCN	Bactériologie - Virologie
Mr Didier PLISSONNIER	HCN	Chirurgie vasculaire
Mr Gaëtan PREVOST	HCN	Endocrinologie
Mr Jean-Christophe RICHARD (<i>détachement</i>)	HCN	Réanimation médicale - Médecine d'urgence
Mr Vincent RICHARD	UFR	Pharmacologie
Mme Nathalie RIVES	HCN	Biologie du développement et de la reproduction
Mr Horace ROMAN (<i>détachement</i>)	HCN	Gynécologie - Obstétrique
Mr Jean-Christophe SABOURIN	HCN	Anatomie – Pathologie
Mr Mathieu SALAUN	HCN	Pneumologie
Mr Guillaume SAVOYE	HCN	Hépto-gastrologie
Mme Céline SAVOYE-COLLET	HCN	Imagerie médicale
Mme Pascale SCHNEIDER	HCN	Pédiatrie
Mr Lilian SCHWARZ	HCN	Chirurgie Viscérale et Digestive
Mr Michel SCOTTE	HCN	Chirurgie digestive
Mme Fabienne TAMION	HCN	Thérapeutique
Mr Luc THIBERVILLE	HCN	Pneumologie

Mr Hervé TILLY (<i>surnombre</i>)	CHB	Hématologie et transfusion
M. Gilles TOURNEL	HCN	Médecine Légale
Mr Olivier TROST	HCN	Anatomie -Chirurgie Maxillo-Faciale
Mr Jean-Jacques TUECH	HCN	Chirurgie digestive
Mr Benoît VEBER	HCN	Anesthésiologie - Réanimation chirurgicale
Mr Pierre VERA	CHB	Biophysique et traitement de l'image
Mr Eric VERIN	Les Herbiers	Médecine Physique et de Réadaptation
Mr Eric VERSPYCK	HCN	Gynécologie obstétrique
Mr Olivier VITTECOQ	HC	Rhumatologie
Mr David WALLON	HCN	Neurologie
Mme Marie-Laure WELTER	HCN	Physiologie

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES – PRATICIENS HOSPITALIERS

Mme Najate ACHAMRAH	HCN	Nutrition
Mme Elodie ALESSANDRI-GRADT	HCN	Virologie
Mme Noëlle BARBIER-FREBOURG	HCN	Bactériologie – Virologie
Mr Emmanuel BESNIER	HCN	Anesthésiologie - Réanimation
Mme Carole BRASSE LAGNEL	HCN	Biochimie
Mme Valérie BRIDOUX HUYBRECHTS	HCN	Chirurgie Vasculaire
Mr Gérard BUCHONNET	HCN	Hématologie
Mme Mireille CASTANET	HCN	Pédiatrie
Mme Nathalie CHASTAN	HCN	Neurophysiologie
M. Vianney GILARD	HCN	Neurochirurgie
Mr Serge JACQUOT	UFR	Immunologie
Mr Joël LADNER	HCN	Epidémiologie, économie de la santé
Mr Jean-Baptiste LATOUCHE	UFR	Biologie cellulaire
M. Florent MARGUET	HCN	Histologie
Mme Chloé MELCHIOR	HCN	Gastroentérologie
M. Sébastien MIRANDA	HCN	Chirurgie Vasculaire
Mr Thomas MOUREZ (<i>détachement</i>)	HCN	Virologie

Mr Gaël NICOLAS	UFR	Génétique
Mme Muriel QUILLARD	HCN	Biochimie et biologie moléculaire
Mme Laëtitia ROLLIN	HCN	Médecine du Travail
Mme Pascale SAUGIER-VEBER	HCN	Génétique
M. Abdellah TEBANI	HCN	Biochimie et Biologie Moléculaire
Mme Anne-Claire TOBENAS-DUJARDIN	HCN	Anatomie
Mr Julien WILS	HCN	Pharmacologie

PROFESSEUR AGREGÉ OU CERTIFIÉ

Mr Thierry WABLE	UFR	Communication
Mme Mélanie AUVRAY-HAMEL	UFR	Anglais

ATTACHE TEMPORAIRES D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE à MI-TEMPS

Mme Justine SAULNIER	UFR	Biologie
-----------------------------	-----	----------

II - PHARMACIE

PROFESSEURS DES UNIVERSITÉS

Mr Jérémy BELLIEN (PU-PH)	Pharmacologie
Mr Thierry BESSON	Chimie Thérapeutique
Mr Jean COSTENTIN (Professeur émérite)	Pharmacologie
Mme Isabelle DUBUS	Biochimie
Mr Abdelhakim EL OMRI	Pharmacognosie
Mr François ESTOUR	Chimie Organique
Mr Loïc FAVENNEC (PU-PH)	Parasitologie
Mr Jean Pierre GOULLE (Professeur émérite)	Toxicologie
Mme Christelle MONTEIL	Toxicologie
Mme Martine PESTEL-CARON (PU-PH)	Microbiologie
Mr Rémi VARIN (PU-PH)	Pharmacie clinique
Mr Jean-Marie VAUGEOIS	Pharmacologie

Mr Philippe **VERITE**

Chimie analytique

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES

Mme Cécile **BARBOT**

Chimie Générale et Minérale

Mr Frédéric **BOUNOURE**

Pharmacie Galénique

Mr Thomas **CASTANHEIRO MATIAS**

Chimie Organique

Mr Abdeslam **CHAGRAOUI**

Physiologie

Mme Camille **CHARBONNIER (LE CLEZIO)**

Statistiques

Mme Elizabeth **CHOSSON**

Botanique

Mme Marie Catherine **CONCE-CHEMTOB**
santé

Législation pharmaceutique et économie de la

Mme Cécile **CORBIERE**

Biochimie

Mme Nathalie **DOURMAP**

Pharmacologie

Mme Isabelle **DUBUC**

Pharmacologie

Mme Dominique **DUTERTE- BOUCHER**

Pharmacologie

Mr Gilles **GARGALA** (MCU-PH)

Parasitologie

Mme Nejla EL **GHARBI-HAMZA**

Chimie analytique

Mme Marie-Laure **GROULT**

Botanique

Mr Chervin **HASSEL**

Biochimie et Biologie Moléculaire

Mme Maryline **LECOINTRE**

Physiologie

Mme Hong **LU**

Biologie

Mme Marine **MALLETER**

Toxicologie

M. Jérémie **MARTINET** (MCU-PH)

Immunologie

M. Romy **RAZAKANDRAINIBÉ**

Parasitologie

Mme Tiphaine **ROGEZ-FLORENT**

Chimie analytique

Mr Mohamed **SKIBA**

Pharmacie galénique

Mme Malika **SKIBA**

Pharmacie galénique

Mme Christine **THARASSE**

Chimie thérapeutique

Mr Frédéric **ZIEGLER**

Biochimie

PROFESSEURS ASSOCIES

Mme Cécile **GUERARD-DETUNCQ**

Pharmacie officinale

Mme Caroline **BERTOUX**

Pharmacie

PAU-PH

M. Mikaël **DAOUPHARS**

PROFESSE

UR CERTIFIE

Mme Mathilde **GUERIN**

Anglais

ASSISTANTS HOSPITALO-UNIVERSITAIRES

Mme Alice **MOISAN**

Virologie

M. Henri **GONDÉ**

Pharmacie

ATTACHES TEMPORAIRES D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE

Mme Soukaina **GUAOUA-ELJADDI**

Informatique

Mme Clémence **MEAUSSONE**

Toxicologie

ATTACHE TEMPORAIRE D'ENSEIGNEMENT

Mme Ramla **SALHI**

Pharmacognosie

LISTE DES RESPONSABLES DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES

Mme Cécile **BARBOT**

Chimie Générale et minérale

Mr Thierry **BESSON**

Chimie thérapeutique

Mr Abdeslam **CHAGRAOUI**

Physiologie

Mme Elisabeth **CHOSSON**

Botanique

Mme Marie-Catherine **CONCE-CHEMTOB**

Législation et économie de la santé

Mme Isabelle DUBUS	Biochimie
Mr Abdelhakim EL OMRI	Pharmacognosie
Mr François ESTOUR	Chimie organique
Mr Loïc FAVENNEC	Parasitologie
Mr Michel GUERBET	Toxicologie
Mme Martine PESTEL-CARON	Microbiologie
Mr Mohamed SKIBA	Pharmacie galénique
Mr Rémi VARIN	Pharmacie clinique
M. Jean-Marie VAUGEOIS	Pharmacologie
Mr Philippe VERITE	Chimie analytique

III – MEDECINE GENERALE

PROFESSEUR MEDECINE GENERALE

Mr Jean-Loup **HERMIL** (PU-MG) UFR Médecine générale

MAITRE DE CONFERENCE MEDECINE GENERALE

Mr Matthieu **SCHUERS** (MCU-MG) UFR Médecine générale

PROFESSEURS ASSOCIES A MI-TEMPS – MEDECINS GENERALISTE

Mr Pascal **BOULET** UFR Médecine générale
Mr Emmanuel **LEFEBVRE** UFR Médecine Générale
Mme Elisabeth **MAUVIARD** UFR Médecine générale
Mr Philippe **NGUYEN THANH** UFR Médecine générale
Mme Yveline **SEVRIN** UFR Médecine générale

MAITRE DE CONFERENCES ASSOCIE A MI-TEMPS – MEDECINS GENERALISTES

Mme Laëtitia BOURDON	UFR Médecine Générale
Mme Elsa FAGOT-GRIFFIN	UFR Médecine Générale
Mr Emmanuel HAZARD	UFR Médecine Générale
Mme Lucile PELLERIN	UFR Médecine générale

ENSEIGNANTS MONO-APPARTENANTS

PROFESSEURS

Mr Paul MULDER (phar)	Sciences du Médicament
Mme Su RUAN (med)	Génie Informatique

MAITRES DE CONFERENCES

Mr Sahil ADRIOUCH (med)	Biochimie et biologie moléculaire (Unité Inserm 905)
Mme Gaëlle BOUGEARD-DENOYELLE (med)	Biochimie et biologie moléculaire (UMR 1079)
Mme Carine CLEREN (med)	Neurosciences (Néovasc)
M. Sylvain FRAINEAU (med)	Physiologie (Inserm U 1096)
Mme Pascaline GAILDRAT (med)	Génétique moléculaire humaine (UMR 1079)
Mr Nicolas GUEROUT (med)	Chirurgie Expérimentale
Mme Rachel LETELLIER (med)	Physiologie
Mr Antoine OUVRARD-PASCAUD (med)	Physiologie (Unité Inserm 1076)
Mr Frédéric PASQUET	Sciences du langage, orthophonie
Mme Anne-Sophie PEZZINO	Orthophonie
Mme Christine RONDANINO (med)	Physiologie de la reproduction
Mr Youssan Var TAN	Immunologie
Mme Isabelle TOURNIER (med)	Biochimie (UMR 1079)

DIRECTEUR ADMINISTRATIF : M. Jean-Sébastien VALET

HCN - Hôpital Charles Nicolle

CB - Centre Henri Becquerel

SJ – Saint Julien Rouen

Médecine Physique et de Réadaptation

HB - Hôpital de BOIS GUILLAUME

CHS - Centre Hospitalier Spécialisé du Rouvray

CRMPR - Centre Régional de

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

REMERCIEMENTS

Au Professeur Luc Thiberville : Vous m'avez fait l'honneur d'accepter la présidence de ce jury. Je vous remercie de l'attention que vous avez bien voulu porter à mon travail. Veuillez trouver ici le témoignage de mon respect et de ma reconnaissance.

Au Professeur Antoine Cuvelier : Vous me faites l'honneur de juger ce travail. Veuillez trouver ici l'expression de mes sincères remerciements et de mon profond respect.

Au Professeur Mathieu Salaün : Merci de me faire l'honneur de juger ce travail. Merci infiniment de m'avoir conseillé et guidée au cours de mes années d'internat.

Au Docteur Florian Guisier : Je te remercie d'avoir accepté de diriger ce travail et de m'avoir soutenue et encadrée jusqu'à son terme. Merci de ta patience à mon égard, du temps que tu as accordé à la réalisation de ce projet.

Au Docteur Samy Lachkar : Merci d'avoir participé à la genèse de ce travail, et de m'avoir soutenue malgré un premier projet laissé en suspens. Je continue de croire dans le pouvoir de la réalité virtuelle ! Je suis très fière d'avoir pu apprendre l'art de la fibroscopie à tes côtés.

Au Docteur Nicolas Piton : Merci de m'avoir accueillie dans votre laboratoire. Merci d'avoir pris le temps de relire certains prélèvements. Votre aide et votre disponibilité m'ont été extrêmement précieuses.

Un grand Merci à tous les médecins du CHU de Rouen que j'ai croisé de près ou de loin.

Au Dr Maxime Roger : Chaque chose à une place et chaque chose à sa place. Pour tes montages photos, tes farces et tes compétences légendaires en mise en page Word. Tu m'as appris la rigueur et le lâcher prise. Grâce à toi j'évite de me noyer dans un verre d'eau. Merci Maxime d'être toujours disponible.

Au Dr Suzanna Bota, pour ton sourire et ta bienveillance quotidienne. Merci Suzanna de prendre soin de nous.

Au Dr Julie Tillon, merci Julie de m'avoir encadrée pour mes premiers pas en oncologie.

Au Dr Daniel Benhamou merci de m'avoir appris l'art de l'escrime pleural.

A toute l'équipe de l'USIR,

Au Dr Catherine Viacroze pour ta présence toujours rassurante et bienveillante.

Au **Dr Carlos Molano** pour tes petits tours cliniques et tes anecdotes inépuisables aussi bien médicales que vétérinaires.

Au **Dr Elise Artaud-Macari** pour avoir pris le temps de papoter et de si bien nous encadrer.

Au **Dr Dominique Schleifer** pour nous éclairer sur les subtilités de l'échographie cardiaque.

Au service de **réanimation du Havre** de m'avoir si bien accueilli pendant ce semestre. Merci de votre encadrement et de votre rigueur. Je garde un magnifique souvenir de ces mois passés à vos côtés.

Aux **médecins du centre Henri Becquerel**, merci de m'avoir accueilli pendant un an. Votre humanité et votre disponibilité ont été élémentaires dans ma formation.

A l'équipe **du Covid-Ortho**, compagnons d'armes de la première vague.

A mes **co-internes de promotion** (du moins ce qu'il en reste) Doudou, Hugo, et Julien j'ai adoré défricher la réforme à vos côtés ! Des plateformes SIDES de la phase socle à l'attribution du Dr Junior, rien ne nous aura été épargné !

A mes **co-internes de pneumologie** :

A Antoine, pour cette grande curiosité médicale qui t'anime et que tu sais si bien partager.

A Mathilde et Marielle, les demoiselles de Rochefort de Charles Nicole pour tous vos bons conseils du choix de la ville à l'ECN à la maquette du Dr Junior.

A Kinan, pour m'avoir aidé à rendre possible cette épopée parisienne.

A Léa, pour avoir délaissé quelques temps son laboratoire de master pour vaincre le covid.

Aux plus jeunes, que je n'ai pas eu la chance de connaître aussi bien, il me tarde de travailler à vos côtés !

A tous ceux **qui sont déjà chefs** plus ou moins loin de la Normandie, Diane, Sophie, Samuel, Christian, Timothée, Pierre, Mathilde, Stéphanie, Agathe, Julien, Justine, Nicolas...j'ai été très heureuse de partager votre bureau, un DU ou des journées DES endiablés à vos côtés.

A mes co-internes Becqueleriens,

A Marine, notre pilier à tous, ton sourire et ta disponibilité à tout épreuve sont un phare dans la nuit.

A Adrien, pour tes ceintures zébrées qui illuminent mon quotidien.

A Alexandra, pour ton franc parler légendaire et ton caractère de feu.

Merci à toute la **team de radiothérapie** Sandrine, Aurélie, Romain, Charlotte, Malanie, Alexandra pour m'avoir soutenue dans les moments difficiles comme le transfert d'une IRM sur Varian ou le contournage d'un lit tumoral cérébral. J'ai adoré ce semestre passé à vos côtés en salle de contouring.

A mes **co-externes Tourangelles**, les quatre fantastiques, Inès, Omblin, Manon et Mathilde grâce à vous l'externat restera un souvenir incroyable.

A mes co-internes parisiens merci de votre accueil et de ses déjeuners gastronomiques sur le solarium de Cochin.

A l'incroyable duo de kinésithérapeutes **Camille et Laurène** qui nous apportent tant.

A toutes les **équipes infirmières** que j'ai eu la chance de côtoyer en particulier la dream team de l'HDJ oncologie.

A mes **parents** pour leur éducation, leur soutien infailible et leur écoute pendant toutes ces années. Votre curiosité et rigueur médicale ont toujours été de grands exemples.

A ma **sœur Floriane**, de continuer à me supporter depuis toutes ces années.

A **Alexandre** qui me suit dans ces montagnes russes depuis plus de 10 ans.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION

I.	Le cancer du poumon.....	18
	1. Incidence et mortalité en France.....	20
	2. Modifications dans la répartition des types histologique.....	20
	3. Dépistage du cancer pulmonaire.....	21
II.	Les nodules pulmonaires périphériques.....	22
	1. Définition et moyens diagnostiques.....	22
	2. Ponction-biopsie transpariétale.....	23
	3. Techniques endoscopiques.....	24
	a. Taille des fibroscopes.....	24
	b. Echoendoscopie bronchique.....	24
	c. Navigation et repérage.....	26
III.	Drivers oncogéniques et thérapies ciblées des cancers pulmonaires.....	27
	1. Rappels sur la carcinogenèse.....	28
	2. Mécanismes de résistances.....	29
	3. Principaux drivers oncogéniques et leurs traitements.....	29
	a. Mutations <i>EGFR</i> (epidermal growth factor receptor)	30
	b. Réarrangements <i>ALK</i> (anaplastic lymphoma kinase)	31
	c. Réarrangements de <i>ROS 1</i>	31
	d. Mutations <i>KRAS</i>	32
	e. Mutations <i>BRAF</i>	32
	f. Mutations de <i>MET</i>	32
	g. Mutations <i>HER2</i>	32
	h. Réarrangements rares.....	32
IV.	Points de contrôle immunitaires et cancers pulmonaires.....	33
	1. Cycle de l'immunité anti-tumorale.....	33
	2. Point de contrôle PD-1/PD-L1.....	34
	3. Inhibiteurs de checkpoints immunitaires anti PD-1/PD-L1.....	35
V.	Analyses en anatomopathologie.....	37
	1. Qui est concerné par la recherche de biomarqueurs tumoraux	37
	2. Comment analyser ces biomarqueurs ?.....	38
	a. Expression de PD-L1.....	38
	b. Mise en évidence des mutations.....	41
	c. Cas des réarrangements chromosomiques.....	41

3.	Du diagnostic histologique aux analyses moléculaires.....	42
VI.	Repères dans le traitement des CBNPC.....	44
1.	Stade I et II.....	44
2.	Stades III.....	44
3.	Formes métastatiques - stade IV en l'absence de driver oncogénique ciblable.....	44
a.	Protocoles thérapeutiques de première ligne (patients PS 0 ou 1)	44
b.	Protocoles thérapeutiques de deuxième ligne.....	45
VII.	Analyses sur biopsies de nodules pulmonaires périphériques : état des lieux des connaissances.....	45
1.	Rendement diagnostique.....	45
2.	Recherche des altérations moléculaires.....	45
3.	Expression de PD-L1.....	46

MATERIEL ET METHODES

I.	Méthodologie de l'étude et plan expérimental.....	47
1.	Critères de jugement principal et secondaires.....	48
2.	Recueil de données.....	48
a.	Recueil des caractéristiques du patient.....	48
b.	Recueil des caractéristiques du nodule.....	49
c.	Interprétation des résultats de la mini-sonde.....	49
II.	Procédures.....	49
1.	Procédure R-EBUS.....	49
2.	Procédure d'analyse histologique.....	51
3.	Procédure d'analyse immunohistochimique (PDL1 ALK ROS1) et FISH (ALK et ROS1)	52
a.	Expression de PDL1.....	52
b.	Translocations ALK et ROS1.....	52
4.	Procédure d'analyse en biologie moléculaire.....	52
III.	Analyses statistiques.....	53

RESULTATS

I.	Population globale.....	54
	1. Caractéristiques des patients.....	54
	2. Caractéristiques des nodules.....	55
	3. Caractéristiques des procédures.....	55
	4. Résultats de la mini-sonde.....	56
II.	Rentabilité diagnostique de la mini-sonde.....	57
	1. Sensibilité.....	58
	2. Facteurs prédictifs de succès pour le diagnostic de cancer.....	59
III.	Analyse des biomarqueurs.....	60
	1. Expression de PD-L1.....	60
	2. Recherche de translocation ALK et ROS1.....	61
	3. Analyse moléculaire.....	62
IV.	Concordance de la mesure d'expression de PD-L1 sur biopsies bronchiques par mini-sonde et sur pièce opératoire.....	65
	1. Fiabilité de l'expression de PDL1 sur les biopsies.....	65
V.	Valeur prédictive du marquage de PD-L1 sur la réponse à l'immunothérapie.....	66

DISCUSSION

BIBLIOGRAPHIE

ANNEXES

Abréviations utilisées :

CBNPC = cancer bronchique non à petites cellules

CBPC = cancer bronchique à petites cellules

TNM = Tumor Node Metastase

PS = performance status

ADK = adénocarcinome

NLST = National Lung Screening Trial

TDM = tomodensitométrie (= scanner)

VEMS = volume expiratoire maximal par seconde

EBUS-TBNA = endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration

R-EBUS = radial endobronchial ultrasound

MNS = mini-sonde

NVB = navigation virtuelle bronchique

NEM= navigation électromagnétique

ANSM = agence nationale de la sécurité du médicament

EGFR = epidermal growth factor receptor

ITK= inhibiteur de tyrosine kinase

ALK = anaplastic lymphoma kinase

NK = natural killer

LT = lymphocytes T

PD-1 = programmed death ligand 1

PD-L1 = programmed death receptor 1

IHC = immunohistochimie

ITK = inhibiteurs de tyrosine kinase

RTU = recommandations temporaires d'utilisation

BM = biologie moléculaire

FISH = fluorescence in situ hybridization

PCR = Polymerase Chain Reaction

HRM = High Resolution Melt

NGS = Next Generation Sequencing

FPE = Formalin-fixed, Paraffin Embedded

HES = Hématoxyline, Eosine Safran

NOS= not otherwise specified (CBNPC indéterminés)

RECHERCHE DE BIOMARQUEURS TUMORAUX SUR DES BIOPSIES BRONCHIQUES REALISEES PAR ECHO-ENDOSCOPIE RADIALE

INTRODUCTION

I. Le cancer du poumon

Le cancer du poumon est le cancer le plus fréquent et la première cause de décès par cancer dans le monde. ¹ Les cancers broncho-pulmonaires peuvent être classés en deux grands groupes histologiques : les cancers dits « à petites cellules » (CBPC 15% des cas) et les cancers dits « non à petites cellules » (CBNPC) qui représentent plus de 80% des cas et comprennent les adénocarcinomes (ADK), les carcinomes épidermoïdes et les carcinomes indifférenciés. La classification OMS des cancers bronchiques est disponible en annexe 1.

Les principaux facteurs de risque connus sont le tabagisme (actif et passif), les facteurs environnementaux (radon, combustion de charbon, fumées de cuisson d'huiles végétales non raffinées...) et certaines expositions professionnelles (amiante, pollution, rayonnements ionisants...). ²

Le pronostic de cette maladie reste très péjoratif avec une amélioration de la survie modérée malgré les progrès thérapeutiques réalisés ces dernières années. La survie à 5 ans tous stades et histologies confondus, est de 17% en France en 2015 ³ et de 14% dans les études internationales.

Les principaux facteurs pronostiques sont l'histologie (le CBPC ayant un moins bon pronostic ⁴), l'extension de la maladie (que l'on rapporte selon la 8e édition de la classification TNM, voir tableaux 1 et 2), l'état général (évalué selon le grade OMS ou ECOG) et certains biomarqueurs dont en particulier les biomarqueurs theranostiques (Cf infra).

CLASSIFICATION TNM 8^{ème} EDITION

T - Tumeur	Tx	Tumeur primaire non connue ou tumeur prouvée par la présence de cellules malignes dans les sécrétions broncho-pulmonaires mais non visible aux examens radiologiques et endoscopiques.
	T0	Absence de tumeur identifiable.
	Tis	Carcinome <i>in situ</i> .
	T1	Tumeur de 3 cm ou moins dans ses plus grandes dimensions, entourée par du poumon ou de la plèvre viscérale, sans évidence d'invasion plus proximale que les bronches lobaires à la bronchoscopie (c'est-à-dire pas dans les bronches souches).
	T1a(mi)	Adénocarcinome minimalement-invasif
	T1a	≤ 1 cm
	T1b	> 1 cm et ≤ 2 cm
	T1c	> 2 cm et ≤ 3 cm
	T2	Tumeur de plus de 3 cm, mais de moins de 5 cm OU avec un quelconque des éléments suivants -envahissement d'une bronche souche quelle que soit sa distance par rapport à la carène mais sans envahissement de la carène, -envahissement de la plèvre viscérale, -existence d'une atélectasie ou pneumonie obstructive
	T2a	> 3 cm mais ≤ 4 cm
	T2b	> 4 cm mais ≤ 5 cm
	T3	Tumeur de plus de 5 cm et de moins de 7 cm , OU associée à un (des) nodule(s) tumoral(aux) distinct(s) dans le même lobe , OU envahissant directement : -la paroi thoracique (incluant les tumeurs du sommet), -le nerf phrénique, -la plèvre pariétale ou le péricarde pariétal.
	T4	Tumeur de plus de 7 cm OU associée à des nodules tumoraux séparés dans deux lobes différents du même poumon, OU envahissant directement : -le médiastin, -le cœur ou les gros vaisseaux, -la trachée, ou la carène -le diaphragme, -le nerf récurrent, -l'œsophage, -un(des) corps vertébral(x).
N - Adénopathies	Nx	Envahissement locorégional inconnu.
	N0	Absence de métastase dans les ganglions lymphatiques régionaux.
	N1	Métastases ganglionnaires péri-bronchiques homolatérales et/ou hilaires homolatérales incluant une extension directe.
	N2	Métastases dans les ganglions médiastinaux homolatéraux ou dans les ganglions sous-carénaux
	N3	Métastases ganglionnaires médiastinales controlatérales ou hilaires controlatérales ou scaléniques, sus-claviculaires homo-ou controlatérales.
Métastases	M0	Pas de métastase à distance.
	M1	Existence de métastases :
	M1a	Nodule(s) tumoral(x) séparés dans un lobe controlatéral, ou nodules pleuraux ou pleurésie maligne ou péricardite maligne
	M1b	Une seule métastase extra-thoracique dans un seul organe
M1c	Plusieurs métastases extra-thoraciques dans un seul ou plusieurs organes	

Tableau 1 : 8^{ème} édition de la classification TNM du cancer du poumon non à petites cellules.

	N0	N1	N2	N3	M1a-b Tout N	M1c Tout N
T1a	IA-1	IIB	IIIA	IIIB	IV-A	IV-B
T1b	IA-2	IIB	IIIA	IIIB	IV-A	IV-B
T1c	IA-3	IIB	IIIA	IIIB	IV-A	IV-B
T2a	IB	IIB	IIIA	IIIB	IV-A	IV-B
T2b	IIA	IIB	IIIA	IIIB	IV-A	IV-B
T3	IIB	IIIA	IIIB	IIIC	IV-A	IV-B
T4	IIIA	IIIA	IIIB	IIIC	IV-A	IV-B

Tableau 2 : Stades des cancers broncho-pulmonaires non à petites cellules d'après la 8^{ème} édition de la classification TNM.

1. Incidence et mortalité en France

En France il n'existe pas d'enregistrement épidémiologique continu des cancers sur l'ensemble du territoire. Le taux d'incidence et de mortalité est donc estimé à partir des données du réseau Francim ⁵.

On estime à 46 363 le nombre de nouveaux cas de cancer du poumon en France métropolitaine en 2018, dont 67% surviennent chez l'homme. Il est, en incidence, au second rang des cancers les plus fréquents chez l'homme après le cancer de la prostate, et au troisième rang chez la femme, après le cancer du sein et le cancer colo-rectal. Les âges médians au diagnostic et au décès en 2018 sont respectivement de 67 et 69 ans chez l'homme et de 65 et 68 ans chez la femme. Chez l'homme, le taux d'incidence est quasiment stable depuis 1990 avec une légère tendance à la baisse constatée depuis 2005 alors que chez la femme il est en forte augmentation depuis 1990, avec un accroissement moyen de 5,3 % par an entre 2010 et 2018.

La mortalité chez l'homme recule depuis 1990 en moyenne de 1,2 % par an mais le cancer du poumon reste la première cause de mortalité par cancer chez l'homme. Il s'agit de la seconde cause de mortalité par cancer chez la femme, après le cancer du sein, avec une augmentation en moyenne de 3,5 % par an depuis les années 90. Ces variations s'expliquent par le décalage entre l'évolution des pratiques (diminution du tabagisme masculin et augmentation du tabagisme féminin) et l'apparition des cancers liés à ces consommations, 20 à 30 ans plus tard ⁶.

2. Modifications dans la répartition des types histologiques

L'histologie des cas incidents de cancers pulmonaires a considérablement évoluée au cours des 30 dernières années. Chez l'homme, l'évolution est marquée par une augmentation de l'incidence des adénocarcinomes (variation annuelle moyenne de +3,9 %) et une diminution de l'incidence des carcinomes épidermoïdes et des CBPC. Chez la femme, on observe une augmentation de l'incidence globale concernant tous les types histologiques mais nettement plus marquée pour les adénocarcinomes (+7,7 %). Les adénocarcinomes représentent désormais 42,1 % des cas chez l'homme et 56,6 % chez la femme (figure 1).

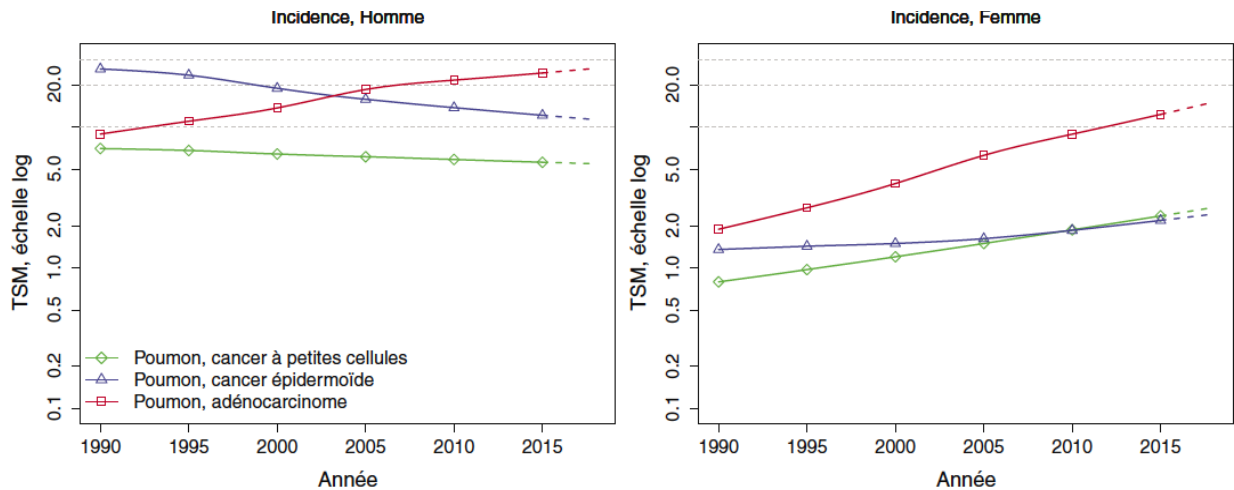


Figure 1 : Évolution du taux d'incidence du cancer du poumon par type histologique entre 1990 et 2018. TSM= taux d'incidence standardisés sur la population mondiale, exprimés pour 100 000 personnes-années. Echelle logarithmique. Source : données des registres du réseau Francim ⁵.

Si tous les types histologiques de cancer du poumon sont associés au tabac ⁷, l'augmentation de l'incidence des adénocarcinomes de localisations préférentiellement périphériques pourrait s'expliquer notamment par une modification de la composition des cigarettes industrielles (introduction de filtres et augmentation de la concentration en nitrosamines) ⁷.

3. Dépistage du cancer pulmonaire

Le mauvais pronostic de cette maladie est expliqué notamment par un diagnostic bien trop tardif. La survie à cinq ans allant de 53% pour les tumeurs localisées à 3,5% pour les tumeurs de stade IV ⁸. Ainsi dans l'étude KBP-CPHG-2010, analysant 7051 cas de cancers broncho-pulmonaires diagnostiqués en 2010 dans 104 hôpitaux généraux français, seuls 18,1% des patients présentaient un cancer localisé (de stade I ou II) au moment du diagnostic. Le stade IIIA, localement avancé et pour lequel un traitement curatif peut parfois être proposé, représentait 14% des cas ⁹. Dans trois quart des cas la maladie est donc diagnostiquée à un stade localement avancé ou métastatique¹⁰. En effet, les poumons et le bronches n'ont pas d'innervation nociceptive, les symptômes révélateurs sont peu spécifiques surtout chez des fumeurs chroniques et la propagation des cellules cancéreuses est facilitée au niveau pulmonaire par une circulation sanguine intense.

Plusieurs études ont donc évalué l'intérêt de différentes stratégies de dépistage du cancer du poumon dans des populations à risque (principalement définies par l'exposition au tabac). Ainsi l'essai américain National Lung Screening Trial (NLST), en 2011, a démontré une baisse de la mortalité par cancer du poumon de 20% grâce à un dépistage par scanner à faible dose

¹¹. Après 13 ans de suivi, le bénéfice en survie globale observé initialement se maintient dans le temps. Les auteurs montrent également que le risque de sur-diagnostic s'amenuise considérablement avec le temps ¹².

Une deuxième étude randomisée, l'essai belgo-néerlandais NELSON publié en 2018, vient conforter les résultats de l'étude Américaine NLST et retrouve une réduction de la mortalité spécifique de 24 % à 10 ans chez les hommes et 48% à 10 ans chez les femmes, grâce à une suivi par TDM basses doses ¹³.

En France, dans les suites de la publication de l'essai NLST, un groupe d'expert a rédigé en 2012 un avis encourageant le dépistage opportuniste d'individus éligibles¹⁴. En 2016, les experts de l'HAS ont considéré que les conditions de qualité et de sécurité permettant un dépistage par scanner faible dose chez des patients sélectionnés n'étaient pas réunies, et a émis un avis défavorable. Bien que les sociétés savantes de pneumologie et de radiologie s'opposent à cette interprétation ¹⁵ il n'y a donc à ce jour en France pas de dépistage organisé du cancer du poumon. Des évaluations sont cependant en cours comme une récente étude Française menée dans la Somme (étude DEP-KP80) qui confirme la faisabilité et l'efficacité d'un dépistage par scanner basse dose selon les modalités de l'étude NLST. L'étude qui se terminera fin 2021 a suivi pendant 3 ans (1 scanner annuel) une population à risque âgée de 55 à 74 ans. Les premiers résultats permettent un dépistage au stade précoce pour 77, 8% des patients (versus 31% dans la population générale) ce qui permet à un accès à un traitement curatif pour 83,3% d'entre eux. ¹⁶

II. Les nodules pulmonaires périphériques

1. Définition et moyens diagnostiques

Une tumeur pulmonaire périphérique correspond à un nodule ou une masse (si la lésion fait plus de 3cm) située dans le tiers externe du poumon. En endoscopie bronchique standard (endoscope de 5mm de diamètre), ces nodules sont invisibles.

L'incidence de ces nodules augmente pour deux raisons : d'une part l'évolution histologique en faveur d'adénocarcinomes qui sont développés préférentiellement en périphérie du poumon et d'autre part l'amélioration des techniques d'imagerie avec les scanner en coupes fines réalisés plus fréquemment ¹⁷. Dans certaines séries le taux de malignité de ces lésions peut atteindre 79% ¹⁷.

Selon la taille, la présentation clinique des nodules et le profil du patient, plusieurs stratégies sont adoptées :

- Surveillance scannographique : dans le cas de nodule(s) sans critère de malignité.
- Prélèvement à visée diagnostique: après surveillance initiale si le nodule s'avère évolutif, ou d'emblée.
- Traitement ablatif d'emblée, par résection chirurgicale ou radiothérapie stéréotaxique : dans le cas de lésions très fortement suspectes de cancer et en l'absence d'accessibilité à un diagnostic pré-thérapeutique.

Dans le cas (le plus fréquent) où un prélèvement à visée diagnostique est requis, le challenge est double : réussir à atteindre ces lésions et obtenir des échantillons en quantité suffisante pour réaliser un diagnostic histologique ainsi que toutes les analyses complémentaires nécessaires aux prises de décisions thérapeutiques.

Deux principales méthodes sont utilisées : ponction par voie transpariétale et technique endoscopique.

2. Ponction-biopsie transpariétale

Une ponction transpariétale est le plus souvent réalisée en ambulatoire par un radiologue interventionnel, sous anesthésie locale, avec repérage par scanner ou échographie. Cette technique a un bon rendement diagnostique mais le taux de complications est élevé. Les deux complications principales sont le pneumothorax et l'hémoptysie. L'incidence du pneumothorax peut atteindre 37 % selon les études^{18 19} et varie en fonction de la taille de la lésion, de l'état du poumon sous-jacent et du rapport du nodule à la plèvre. Cinq à 10% d'entre eux sont symptomatiques et nécessitent un drainage ou une aspiration. L'hémoptysie, plus rare, survient dans moins de 5 % des cas²⁰.

La sensibilité de la ponction transpariétale varie en fonction de la taille du nodule. Elle est de l'ordre de 60 % pour les nodules de moins de 20 mm, et peut atteindre 80 % pour les nodules de plus de 20 mm. Le guidage scannographique est de loin le plus utilisé mais le guidage échographique peut être utile, rapide et efficace pour des lésions thoraciques sous pleurales avec ou sans envahissement pariétal de plus de 10 mm²¹.

Cette technique, bien que très sensible n'est pas adaptée aux nodules inférieurs à 10mm. Elle est fortement déconseillée chez les patients insuffisants respiratoires avec un VEMS < 1L/s, ayant un poumon fonctionnel unique ou une hypertension artérielle pulmonaire, en raison d'un risque de complication grave significativement plus élevé²².

3. Techniques endoscopiques

L'avantage majeur des techniques endoscopiques est leur faible taux de complication, autour de 1% dans les séries modernes les plus larges^{23 24}. Ainsi la voie endoscopique est à privilégier à la ponction transpariétale chez les patients fragiles avec peu de réserve ventilatoire ou si la lésion est jugée difficile d'accès par le radiologue (proche des vaisseaux, de l'omoplate ou du diaphragme). Par ailleurs un examen par voie endoscopique permet de réaliser, dans le même temps, le diagnostic d'une lésion bronchique ou pulmonaire ainsi qu'une stratification médiastinale par ponction ganglionnaire guidée par échographie linéaire (EBUS-TBNA) dans le cadre du bilan d'une lésion localisée ou localement avancée.

Les techniques endoscopiques standards sont toutefois fréquemment mises en échec²⁵ et deviennent désuètes. Ainsi dans une étude publiée en 2012 concernant 318 lésions suspectes d'un diamètre moyen de 14,6 mm, seul 1% des cancers étaient détectés en endoscopie standard²⁶.

De nouvelles techniques endoscopiques ont donc été développées ces 15 dernières années afin d'améliorer le rendement diagnostique, principalement par des techniques de localisation et de guidage permettant une amélioration du rendement diagnostique qui se rapproche désormais de celui de la ponction sous TDM avec un risque de complication plus faible²⁷.

a. Taille des fibroscopes

Certains nodules invisibles en endoscopie standard sont désormais accessibles grâce au développement de bronchoscopes de plus petits diamètres. Les bronchoscopes fins (entre 3 et 5mm de diamètre externe) et les ultra fins (<3mm) permettent d'accéder aux bronches de 10^e ordre contrairement aux bronchoscopes dit standards de > 5mm de diamètre qui ne peuvent dépasser les divisions bronchiques allant au-delà du tiers interne du poumon.

b. Echoendoscopie bronchique

L'échoendoscopie bronchique également appelée EBUS (endobronchial ultrasound) est une technique d'exploration endoscopiques des bronches à laquelle s'ajoute un repérage échographique. Cette technique décrite pour la première fois par Hürter et Hanrath en 1992²⁸ permet de visualiser par voie endoscopique les tissus adjacents à la bronche et la trachée.

L'EBUS dite simple ou linéaire, composée d'une sonde linéaire ou convexe d'échographie permet le repérage d'adénopathies médiastinales hilaires puis leur biopsie par voie transbronchique. Ces prélèvements permettent de réaliser une stratification ganglionnaire dans le cadre du bilan d'une lésion localisée ou localement avancée.

La **R-EBUS** (radial endobronchial ultrasound) appelée également échographie endobronchique par mini-sonde (MNS) ou mini-sonde par échographie radiale permet de réaliser des biopsies bronchiques écho-guidées ²⁷. Une sonde souple, de petit diamètre (1,4mm), connectée à un transducteur de 20Hz à son extrémité fournit une image à 360° de haute résolution des structures avoisinantes dans un rayon de 4cm autour de la sonde. La sonde ainsi placée au contact des tissus émet des ondes ultrasonores qui sont ensuite réfléchies. Le signal obtenu par réflexion varie en fonction des différents milieux d'impédance acoustiques rencontrés ²⁹.

En échographie, le tissu pulmonaire sain, bien aéré apparaît sous forme d'une image dite "en tempête de neige", il s'agit d'un halo hyperéchogène, très hétérogène. Le nodule pulmonaire correspond à une lésion solide et donne une image hypo échogène, homogène entourée d'un halo qui marque la limite avec le parenchyme sain. Si la sonde se positionne en face de la lésion le signal apparaît circonférentiel (Figure 2a) si la sonde la rencontre de façon tangentielle l'image est décrite comme polaire ou tangentielle (figure 2b).

Après repérage échographique la lésion est biopsiée à l'aveugle en suivant le trajet d'un cathéter guide laissé en place.

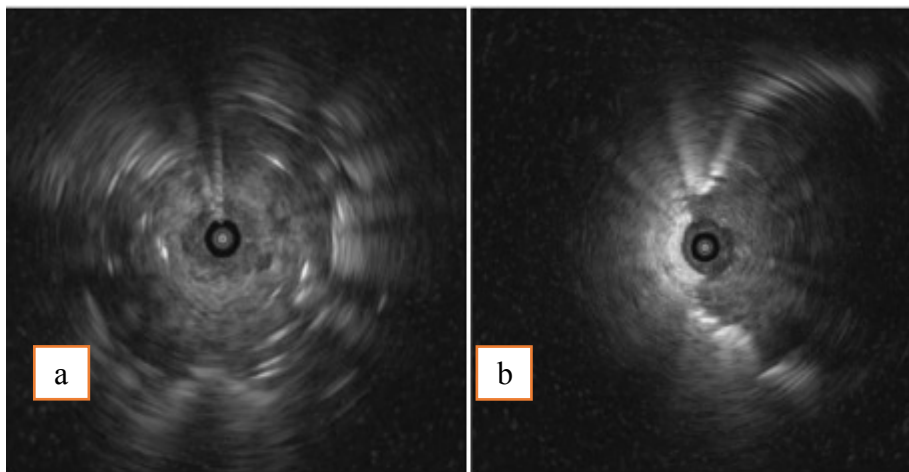


Figure 2 :
Signaux échographiques obtenus par minisonde :
a) circonférentiel
b) tangential

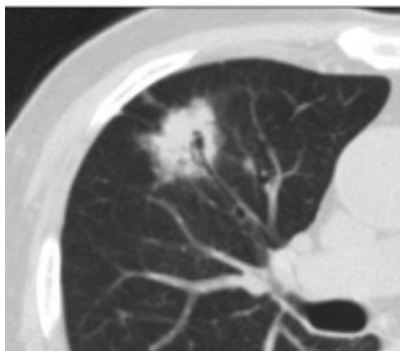


Figure 3: Signe de la bronche : Bronche menant à la lésion sur scanner thoracique en coupes parenchymateuses.

c. Navigation et repérage

Plusieurs outils d'aide au guidage et à la localisation peuvent être associés à la bronchoscopie par mini-sonde (MNS) pour limiter le temps d'examen et augmenter la probabilité de repérage de la lésion³⁰. Il s'agit de la reconstruction virtuelle bronchique qui peut être associée à une navigation virtuelle ou une navigation électromagnétique.

Les logiciels de **reconstruction virtuelle** sont multiples et permettent après repérage de la lésion sur des images scannographiques en coupe fine, une aide au guidage jusqu'à la plus petite bronche menant à la lésion à partir d'une reconstruction en trois dimensions de l'arbre bronchique sur informatique. Des études récentes montrent que leur utilisation avant une endoscopie permet un gain de rentabilité diagnostique et un gain de temps³⁰.

La **navigation virtuelle bronchique (NVB)** permet de synchroniser les images reconstruites par le logiciel de bronchoscopie virtuelle avec la vision directe endobronchique de l'endoscopiste afin de l'aider à se repérer en temps réel. Dans une revue de la littérature récente, le rendement diagnostique global était de 73,8 %, avec, pour les tumeurs < 2 cm un taux de 67,4 %. Les taux de diagnostic en associant la NVB et la MNS étaient compris entre 63,3 et 84,4 %³¹.

La **navigation électromagnétique (NEM)** permet de coupler la navigation virtuelle avec le repérage électromagnétique d'un détecteur de localisation situé à l'extrémité de la sonde d'endoscopie. Ce GPS bronchique aurait un avantage pour la détection des nodules en verre dépoli en particulier³². Il présente également de nombreux inconvénients : il requiert l'utilisation d'un endoscope de 6mm, allonge le temps procédure (environ 30 minutes), nécessite une anesthésie générale et représente un coût important.

Toutes les méthodes endoscopiques ont en commun de prélever des échantillons pulmonaires de petites tailles (figure 4).

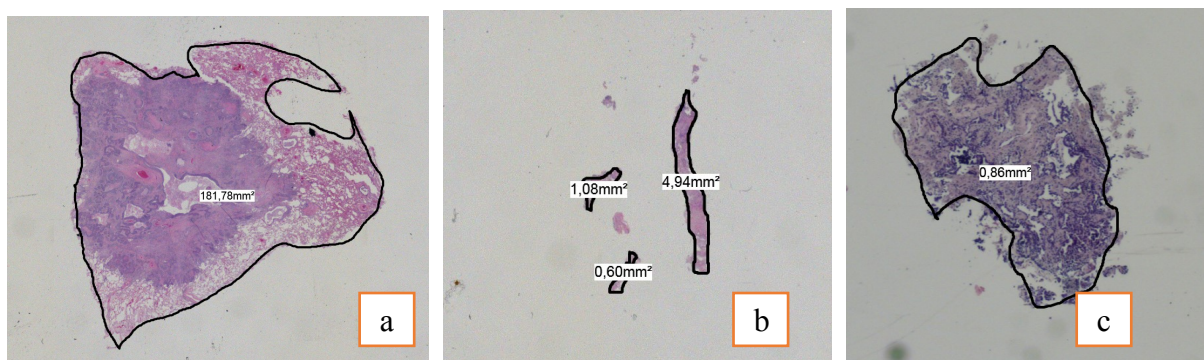


Figure 4 : Lames de biopsies pulmonaires issues d'un geste chirurgical (a) d'une ponction sous TDM (b) ou d'une mini-sonde (c) .

Plusieurs études randomisées ont comparé le rendement diagnostique des biopsies obtenue par MNS versus des biopsies obtenue par ponction sous TDM et concluent que les deux examens sont comparables à ce niveau^{27 33}. L'étude de Steinfort *et al*, montre une rentabilité diagnostique proche entre les deux techniques (87,5% vs 93,3% respectivement) et une bonne sensibilité (86% versus 92%) associée à une diminution considérable des complications en faveur de la MNS (3% vs 27%)²⁷. Nous allons voir cependant que la prise en charge thérapeutique moderne des cancers pulmonaires nécessite souvent, en plus du diagnostic histologique, l'évaluation de biomarqueurs à visée théranostique, c'est-à-dire renseignant sur la sensibilité de la tumeur vis-à-vis de différents traitements.

Il s'agit en particulier :

- D'altérations génétiques (mutations et réarrangements chromosomiques) conférant une sensibilité de la tumeur à des thérapies ciblées
- Du niveau d'expression de la protéine PD-L1 par les cellules tumorales, qui est corrélé à l'efficacité des traitements par immunothérapie

Il est donc essentiel de savoir si les prélèvements de petite taille réalisés en endoscopie permettent l'obtention de l'ensemble des informations nécessaires au traitement optimal des patients.

III. Drivers oncogéniques et thérapies ciblées des cancers pulmonaires

Depuis 2004, la découverte d'anomalies géniques pouvant être ciblées par des agents thérapeutiques a révolutionné la prise en charge des cancer pulmonaires, en particulier au stade métastatique³⁴ (figure 5).

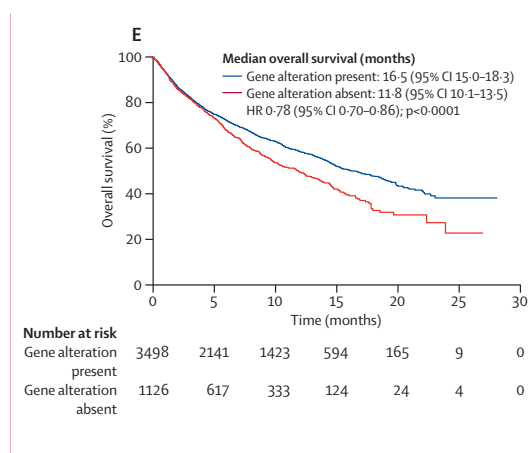


Figure 5 : Survie globale de patients atteints de CBNPC non épidermoïde métastatique, avec et sans altération moléculaire. D'après Barlesi *et al*³⁵.

1. Rappels sur la carcinogénèse

Deux modèles de carcinogénèse peuvent expliquer le développement d'un cancer ³⁶.

Le premier nommé **carcinogénèse multi-étapes** consiste en l'accumulation de plusieurs altérations de gènes participant chacune à l'évolution progressive vers le phénotype cancéreux. Les gènes concernés peuvent être des gènes suppresseurs de tumeur (leur altération entraîne l'inactivité de cette voie d'inhibition) ou des oncogènes (leur altération aboutit à une sur-activation). Chaque altération acquise éloigne un peu plus la cellule de son phénotype normal. Ce modèle est illustré par le cas des carcinomes épidermoïdes dont le développement peut être observé depuis l'apparition d'une hyperplasie puis d'une métaplasie, d'une dysplasie de plus en plus sévère puis d'un carcinome ³⁷.

Le deuxième modèle repose sur le concept **d'addiction oncogénique**. Dans ce modèle, une seule altération moléculaire peut entraîner la transformation cellulaire. D'un point de vue théorique, un traitement ciblant cette altération moléculaire pourrait donc supprimer les cellules cancéreuses dans ce modèle.

L'exposition aux carcinogènes, et en particulier à la fumée de tabac, est connue pour induire des altérations répondant d'avantage au modèle de carcinogénèse multi-étapes. Chez les non-fumeurs, le modèle d'addiction oncogénique est plus fréquent. Ces modèles co-existent toutefois chez un même patient.

Les principales altérations de l'ADN en jeu sont des mutations (substitution, délétion ou insertion) (figure 6), des réarrangements chromosomiques (figure 7) et des amplifications géniques.

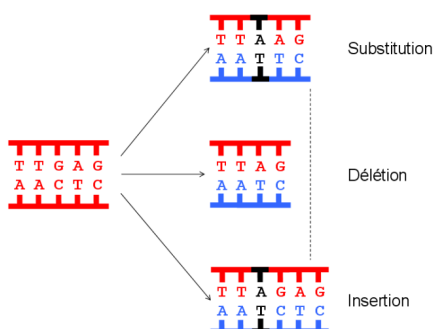


Figure 6 : Différents types de mutations géniques

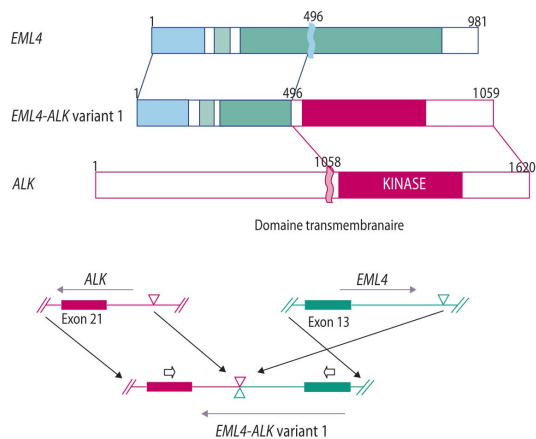


Figure 7 : Réarrangement du gène *ALK* : exemple en cas de translocation *EML4-ALK*, illustrant l'inversion de la partie amino-terminale d'*EML4* et sa fusion avec la partie du gène *ALK* codant pour le domaine tyrosine kinase Source : *Correspondances en Onco-Théranostic / N° 3 sept. 2012*.

2. Mécanismes de résistances

Les altérations entraînant une addiction oncogénique peuvent pour certaines être ciblées par des traitements, dits thérapies ciblées. Cependant, les tumeurs peuvent présenter des mécanismes de résistance primaire (tumeur d'emblée non sensible à la thérapie ciblée), ou développer avec le temps des résistances dites acquises ou secondaires.

Les principales causes de résistance sont l'existence ou l'apparition d'une seconde altération du gène ciblé, d'altérations dans d'autres gènes impliqués dans la carcinogénèse, ou de transformation histologique³⁸. Des causes pharmacologiques peuvent également être responsable de résistance au traitement, notamment leur plus faible concentration au niveau du système nerveux central en raison d'un passage limité à travers la barrière hémato-encéphalique³⁹.

3. Principaux drivers oncogéniques et leurs traitements

Les principaux drivers oncogéniques identifiés à ce jour pour les CBNPC non épidermoïdes et leur fréquence sont présentés dans la figure 8.

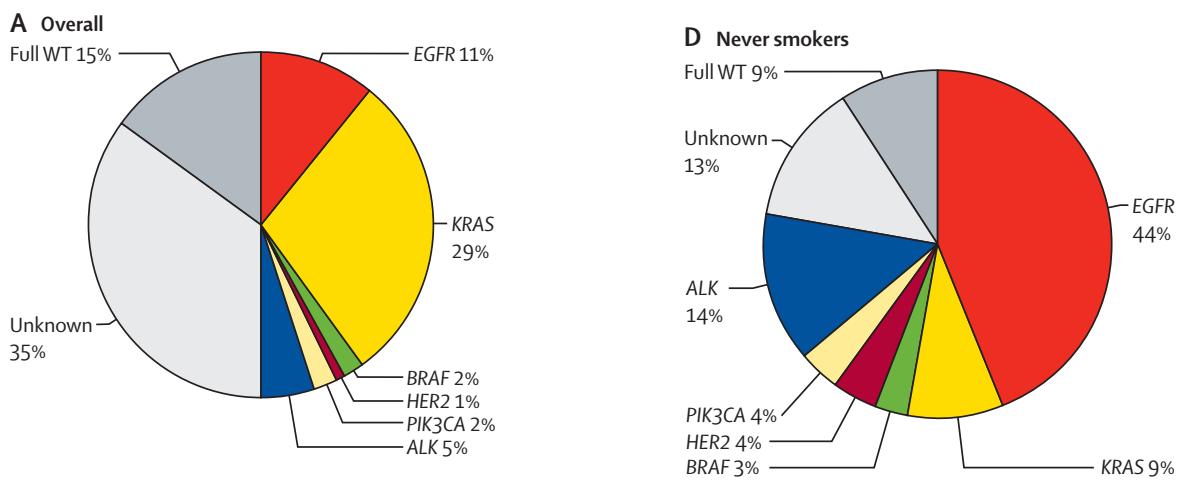


Figure 8 : Fréquence des principales altérations moléculaires dans les CBNPC non épidermoïdes

D'après Barlesi et al ³⁵ Fréquence des altérations de 6 gènes parmi 16679 prélèvements.

A : pour tous les cancers bronchiques, D : pour les non-fumeurs. Full WT = aucune mutation retrouvée parmi ces 6 gènes. Unknown = inconnu, les inconnus représentant les cas ayant au moins un résultat inconnu après évaluation des 6 gènes.

a. Mutations *EGFR* (epidermal growth factor receptor)

En France, 10-12% des CBNPC non épidermoïde sont porteurs d'une mutation de l'*EGFR* ⁴⁰. Ces mutations sont plus fréquentes chez les femmes, les non-fumeurs et les patients d'origine asiatique ⁴¹.

L'*EGFR*, présent au niveau du bras court du chromosome 7, est un gène exprimé de façon physiologique au sein des cellules épithéliales. Il code pour une protéine comportant un domaine extra-membranaire capable de fixer un ligand, un domaine transmembranaire et un domaine intracellulaire porteur d'une activité tyrosine kinase. Après liaison à un ligand le récepteur *EGFR* se dimérise avec un autre récepteur tyrosine-kinase, ce qui entraîne une trans-phosphorylation des résidus tyrosine du domaine intra-cellulaire et l'activation de voies de signalisation cellulaire impliquées notamment dans la survie et la prolifération cellulaires.

Les mutations du gène *EGFR* peuvent entraîner l'activation constitutive de la kinase *EGFR* (indépendamment de la fixation à son ligand) et provoquer une activation permanente des voies de signalisation sous-jacentes et une survie cellulaire incontrôlée. Le rôle des mutations *EGFR* en cancérologie thoracique a été découverte en 2004 ⁴². Ces mutations surviennent au sein du domaine tyrosine-kinase *EGFR* codé par les exons 18 à 21. Toutes les mutations n'ont pas les mêmes répercussions et présentent un profil de sensibilité aux inhibiteurs de tyrosine kinase (ITK) différent ⁴³. Parmi les altérations identifiées dans le CBNPC, 90% sont des délétions au sein de l'exon 19 ou la substitution L858R au niveau de l'exon 21 et sont sensibles initialement aux ITK ⁴⁴.

Plusieurs générations d'ITK anti EGFR sont désormais disponibles. Depuis les résultats de l'essai FLAURA, un ITK de 3e génération, l'Osimertinib est recommandé en traitement de première ligne chez les patients avec CBNPC métastatique présentant une délétion dans l'exon 19 ou une mutation L858R de l'*EGFR*. Dans cette indication, l'Osimertinib a démontré une amélioration de la survie globale de 7 mois et de survie sans progression de 9 mois par rapport à une molécule de première génération ⁴⁵.

b. Réarrangements ALK (anaplastic lymphoma kinase)

Il s'agit d'un réarrangement chromosomique entraînant la fusion du domaine kinase du gène *ALK* (présent sur le chromosome 2) avec une autre portion de gène, le plus souvent *EML4*. Ce réarrangement a été découvert en 2007 ⁴⁶ et est retrouvé dans 1 à 3% des CBNPC. Les patients concernés sont le plus souvent non-fumeurs et jeunes ⁴⁰.

La fusion des deux gènes conduit à la traduction d'une protéine chimérique porteuse du domaine kinase d'*ALK* activé de façon constitutive. (figure 4). Comme dans le cas des mutations *EGFR*, cette activation permanente va transmettre un signal incontrôlé de prolifération cellulaire.

Les essais randomisés PROFILE 1007, 1014 et 1029 ont démontré la supériorité du Crizotinib (ITK de 1ère génération) par rapport à une chimiothérapie en deuxième et en première ligne de traitement chez les patients atteints de CBNPC métastatique avec réarrangement *ALK*. ^{47 48 49}. Des études plus récentes ont montré l'intérêt d'ITK de 2^{ème} puis de 3^{ème} génération. Ces molécules présentent moins d'effets indésirables et ont une meilleure pénétration cérébro-méningée. Elles permettent une amélioration de la survie sans progression et un meilleur contrôle de la maladie au niveau cérébral. Ainsi, l'Alectinib et le Brigatinib sont utilisables en première ligne métastatique suite aux résultats positifs des études ALEX ^{50 51} et ALTA-1L ⁵² qui ont testé respectivement ces molécules en comparaison au Crizotinib en première ligne.

Les résultats spectaculaires obtenus dans les CBNPC *EGFR* muté ou *ALK* réarrangé avec les ITK ont conduit à la recherche systématique d'autres altérations oncogéniques sensibles à ces molécules. Plusieurs cibles ont ainsi été identifiées : réarrangements des gènes *ROS1*, *RET*, *NTRK* ou *NRG1* et mutations des gènes, *KRAS*, *BRAF*, *HER2* et *MET* par exemple.

c. Réarrangements de ROS 1

Découvert en 2007, les réarrangements du gène *ROS1* sont retrouvés dans 1% des CBNPC ⁵³. Ils concernent le plus souvent des adénocarcinomes survenant chez de jeunes non-fumeurs. Il existe une forte homologie entre les domaines kinases de *ALK* et *ROS1*. Certains ITK ciblant *ALK* sont donc également efficaces sur les réarrangements de *ROS1*. Actuellement seul le Crizotinib possède une autorisation de mise sur le marché (AMM) en première ligne pour les

CBNPC avancés ROS1 positifs ⁵⁴. Les données Françaises de l'étude ACSé ont confirmé récemment son efficacité ⁵⁵.

d. Mutations KRAS

La mutation *KRAS* p.G12C est retrouvée dans 10-15% des CBNPC, essentiellement chez des fumeurs ⁴⁰. Récemment, plusieurs inhibiteurs spécifiques de ces mutations ont été développés, dont en particulier le Sotorasib qui est disponible en France dans le cadre d'une autorisation temporaire d'utilisation (ATU).

e. Mutations BRAF

Détectées dans 2-4% des CBNPC ⁴⁰, la moitié sont des mutations p.V600E. Actuellement il est recommandé de prescrire une association de Dabrafenib et de Trametinib uniquement en 2ème ligne de traitement et plus, après échec d'une chimiothérapie et/ou immunothérapie en première ligne ⁵⁶.

f. Mutations de MET

Ces mutations concernent 2 à 5% des CBNPC. Les patients concernés sont plus âgés avec une proportion de fumeurs plus importante que pour les autres altérations moléculaires. Leur fréquence est plus élevée dans les tumeurs sarcomatoïdes ⁵⁷. L'altération se situe dans le site épissage de l'exon 14 de *MET*.

Des traitements spécifiques sont en cours d'évaluation notamment le Tepotinib ⁵⁸ ou le Capmatinib disponible en France dans le cadre d'ATU, ou le Savolitinib.

g. Mutations HER2

Il s'agit d'une insertion au sein de l'exon 20 pour laquelle plusieurs traitements sont en cours d'évaluation notamment le Pozotinib et le Trastuzumab-Deruxtecan. Aucun traitement spécifique n'est actuellement disponible en France en dehors d'essais cliniques.

h. Rearrangements rares

NRG1, *NTRK* ou *RET* ne seront pas détaillés dans ce travail.

Après la recherche d'altération moléculaires ciblables accessible à une thérapie ciblée la médecine personnalisée en cancérologie thoracique nécessite de connaître le niveau d'expression de la protéine PD-L1 par les cellules tumorales, dont l'expression est corrélée à l'efficacité des traitements par immunothérapie.

IV. Points de contrôle immunitaires et cancers pulmonaires

1. Cycle de l'immunité anti-tumorale

Le cycle naturel de l'immunité anti-tumorale⁵⁹ est présenté dans la figure 9.

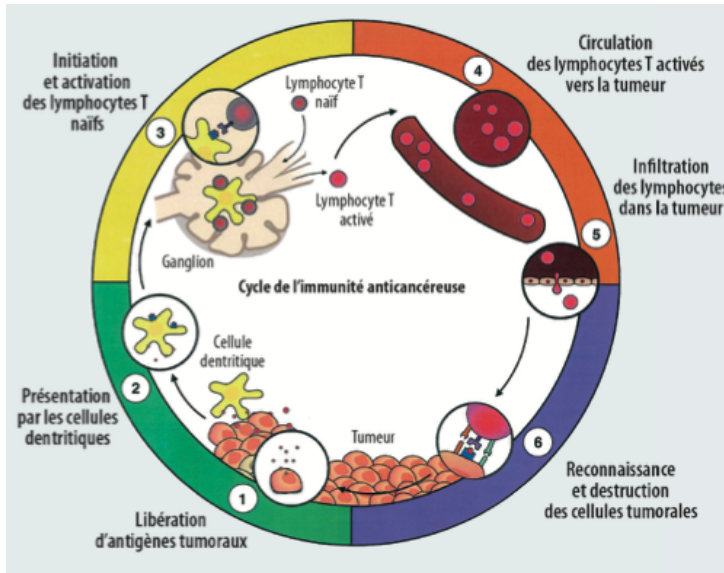


Figure 9 : Le cycle de l'immunité contre le cancer d'après Chen DS, Mellman
1- Libération des antigènes (Ag) tumoraux présent à la surface des cellules tumorales mourantes 2- Les cellules présentatrices d'Ag (CPA) dendritiques présentes au sein de l'environnement tumoral reconnaissent et captent ces antigènes libres puis migrent au sein des ganglions lymphatiques 3- Présentation par les CPA des fragments d'Ag tumoraux aux lymphocytes T (LT) naïfs permettant leur activation 4- Expansion clonale des LT activés spécifiques de la tumeur, migration jusqu'au site tumoral via le système sanguin. 5- Infiltration des LT dans la tumeur 6- Reconnaissance et destruction par les LT activés des cellules tumorales identifiées.

Cette activité anti-tumorale immunitaire est régulée par un réseau de voies de signalisation activatrices et inhibitrices appelées points de contrôle ou check-point immunitaires composés de récepteurs et de ligands (figure 10).

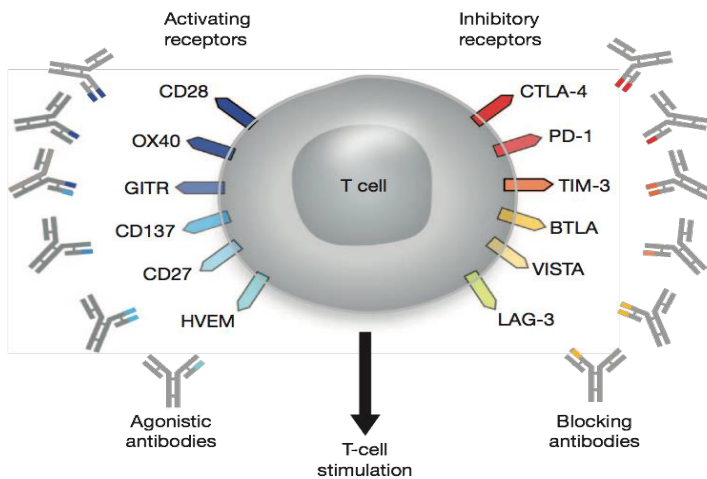


Figure 10 : Récepteurs membranaires régulant la réponse immunitaire à la surface du lymphocyte T.

Au cours de son développement la tumeur développe plusieurs mécanismes d'échappement au système immunitaire. Il s'agit en particulier de l'activation ou de l'inhibition de ces checkpoints immunitaires. La description de ces mécanismes a permis le développement d'inhibiteurs de checkpoints immunitaires dont le but est de restaurer une activité immunitaire.

2. Point de contrôle PD-1/PD-L1

PD-1/PD-L1 est une des voies de signalisation inhibitrice responsable de la modulation de la réponse immunitaire adaptative de notre organisme. Ce point de contrôle physiologique se compose d'un récepteur nommé PD-1 (programmed death ligand 1), exprimé à la surface des lymphocytes T et de deux ligands : les protéines transmembranaires PD-L (programmed death receptor) 1 et 2 (figure 11).

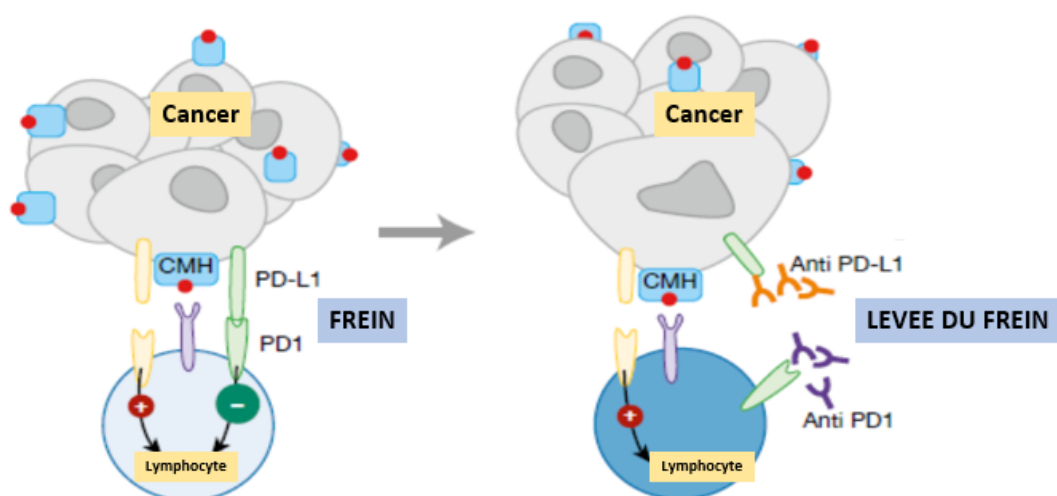


Figure 11 : La liaison PD-1/ PD-L1 : véritable cible thérapeutique

L'activation de ce point de contrôle par la liaison ligand/récepteur joue un rôle physiologique d'épuisement des lymphocytes T en cas d'activation prolongée, permettant une prévention de l'auto-immunité. La voie PD-1/ PD-L1 est fréquemment activée dans le CBNPC et la liaison entre PD-1 et PD-L1 constitue une cible thérapeutique majeure. Des inhibiteurs de cette voie ont donc été développés.

3. Inhibiteurs de checkpoints immunitaires anti PD-1/PD-L1

Il s'agit d'anticorps thérapeutiques dirigés contre PD-1 ou PD-L1 (tableau 3).

DCI	Nom commercial	Laboratoire	Anti PD-1/PD-L1
Nivolumab	OPDIVO®	Bristol-Myers Squibb	Anti PD-1
Pembrolizumab	KEYTRUDA®	Merck & Co	Anti PD-1
Atezolizumab	TECENTRIQ®	Genentech	Anti PD-L1
Durvalumab	IMFINZI®	Astra-Zeneca	Anti PD-L1
Avelumab	BAVENCIO®	EMD Serono	Anti PD-L1

Tableau 3 : Principales Immunothérapies disponibles ce jour anti PD-1 et PD-L1 dans le CBNPC

L'efficacité de ces traitements est, dans certains cas, corrélée au niveau d'expression de la protéine PD-L1 par les cellules tumorales. En pratique, la prescription de certaines de ces molécules est conditionnée par le niveau d'expression de PD-L1 (tableau 4). Ce niveau d'expression est mesuré en immunohistochimie (IHC) (Cf infra).

	Indication	Seuil PD-L1
NIVOLUMAB	CBNPC stade IV, 2ème ligne	Aucun
PEMBROLIZUMAB	CBNPC stade IV, 1ère ligne - Monothérapie - Chimio-immunothérapie	≥50% Aucun
	CBNPC stade IV, 2ème ligne	≥1%
ATEZOLIZUMAB	CBNPC stade IV (non épidermoïde), 1ère ligne - Chimio immunothérapie	Aucun
	CBNPC stade IV, 2ème ligne	Aucun
DURVALUMAB	CBNPC stade III, post-radiochimiothérapie	≥1%

Tableau 4: Seuils d'expression de PD-L1 retenus pour les indications de traitement par anti-PD-1/PD-L1 dans le CBNPC

Le Nivolumab **n'a pas d'indication en première ligne à ce jour.** Les résultats de l'essai CheckMate-026⁶⁰ qui compare le Nivolumab en première ligne versus une chimiothérapie à base de sel de platine chez des patients avec une tumeur exprimant le PD-L1 dans au moins 1 % des cellules tumorales est négatif pour son objectif principal la survie sans progression.

Il est indiqué en **deuxième ligne quel que soit le taux de PD-L1**, d'après les résultats des études CheckMate-017 et CheckMate-057.^{61 62}

Le Pembrolizumab est indiqué en **monothérapie en première ligne de traitement métastatique** pour les CBNPC une expression de **PD-L1 sur $\geq 50\%$** des cellules tumorales.

Dans l'essai de phase III Keynote 024⁶³ le Pembrolizumab a été comparé à une chimiothérapie standard par doublet à base de platine en première ligne de traitement, chez des patients atteints de CBNPC métastatiques avec PD-L1 $\geq 50\%$. Le Pembrolizumab présentait un taux de réponse supérieur (45 % vs. 28 %) et une amélioration de la survie sans progression (10,3 vs. 6 mois) et de la survie globale à 6 mois (80 % vs. 72 %). La tolérance du traitement était également meilleure.

Toujours en **première ligne métastatique, mais quel que soit le niveau d'expression de PD-L1**, le Pembrolizumab peut être utilisé **en association** à un doublet de chimiothérapie à la suite des données des essais KEYNOTE 189⁶⁴ et KEYNOTE 407⁶⁵.

Le Pembrolizumab peut également être utilisé en **deuxième ligne pour les tumeurs avec PD-L1 $\geq 1\%$** , chez des patients ayant reçu un doublet par chimiothérapie en première ligne en s'appuyant sur les résultats de l'essai Keynote 010⁶⁶.

L'Atezolizumab est indiqué en **première ligne pour les carcinomes non épidermoïdes**, quel que soit le niveau d'expression de PD-L1, en association avec du Carbopaltine-paclitaxel et Bevacizumab (étude IMPOWER 150)⁶⁷. Il n'est cependant pas remboursé dans cette indication en France. Il peut également être utilisé en **deuxième ligne, quel que soit le taux de PD-L1** (étude OAK)⁶⁸.

Le Durvalumab est prescrit après une radio-chimiothérapie concomitante pendant 1 an, d'après les résultats de l'étude PACIFIC^{69 70}.

Toutes ces molécules sont également en cours d'évaluation dans le traitement des CBNPC localisés⁷¹.

V. Analyses en anatomopathologie

1. Qui est concerné par la recherche de biomarqueurs tumoraux ?

Selon les recommandations françaises, avant de démarrer une première ligne de traitement systémique l'expression de PD-L1 doit être systématiquement recherchée pour tous les patients atteints d'un cancer bronchique de stade avancé. Les translocations ALK et ROS1 ainsi que les mutations *EGFR* et *KRAS* doivent être systématiquement recherchées pour les carcinomes **non épidermoïdes avancés** et les carcinomes **épidermoïdes avancé du non-fumeur**. Certaines altérations moléculaires peuvent également être recherchées avant de démarrer une première ligne comme *BRAF*, *MET exon 14*, *RET*, et la fusion *NTRK* (Figure 12).

Les autres altérations sont à rechercher au minimum avant de débiter une seconde ligne. (fusion *NRG1*, autres mutations de *MET* et statut (*ERBB2*) *HER2*).

	Avant L1	Avant L2
PDL1	IHC	
<i>EGFR</i>		
<i>KRAS</i>		
<i>BRAF</i>		
<i>HER2</i>		
<i>MET</i> ex14		
Autres MET		
ALK	IHC	
<i>ROS1</i>		
<i>RET</i>	si dispo	si dispo
<i>NTRK</i>		
<i>NRG1</i>		si dispo

Légende

- Avoir le résultat systématiquement
- En option
- IHC Immuno-Histochimie
- Technique habituelle/disponible si vi de

Figure 12 : Proposition de panel minimal en biologie moléculaire à réaliser pour les carcinomes non épidermoïdes avancés et les carcinomes épidermoïdes avancé du non-fumeur. *Source : Référentiel Auvergne Rhône-Alpes en oncologie thoracique (AURA) L1= première ligne L2= deuxième ligne*

Dans un avenir proche la recherche de mutation *EGFR* sera également nécessaire chez les patients atteints de CBNPC de stade IB à IIIA opérés. En effet, l'essai ADAURA⁷² a montré une amélioration de la survie sans récurrence grâce à un traitement adjuvant par Osimertinib pendant 3 ans dans les CBNPC non-épidermoïdes de stades IB, II et IIIA réséqués avec mutation activatrice de l'*EGFR*.

Plusieurs recommandations internationales préconisent la recherche d'altérations moléculaires telles que *EGFR*, ALK, *ROS1* *BRAF*, *HER2(ERBB2)* *RET* *MET* et *NTRK* pour tous les nouveaux diagnostics de cancer pulmonaires⁷³.

2. Comment analyser ces biomarqueurs ?

a. Expression de PD-L1

La technique la plus utilisée pour rechercher l'expression de PD-L1 est l'IHC. Cette protéine est exprimée sur la membrane cellulaire des cellules cancéreuses. Il existe une certaine hétérogénéité spatiale de son niveau d'expression ⁷⁴ (figure 13).

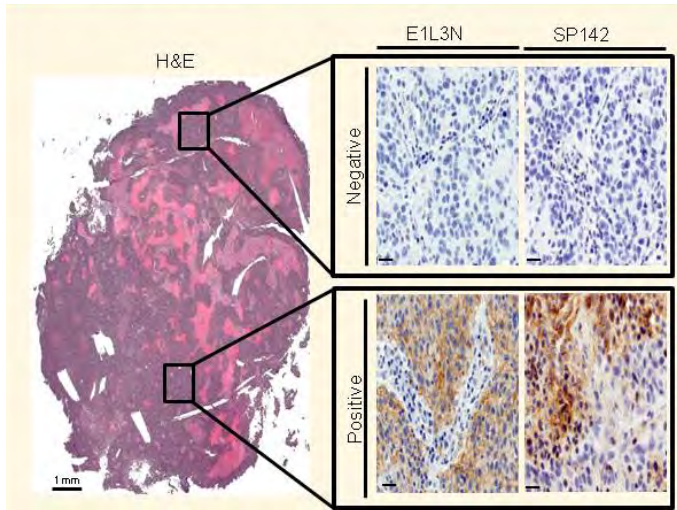


Figure 13 : Hétérogénéité de l'expression de PDL1 au sein de la tumeur et variabilité en fonction de l'anticorps utilisé pour sa détection *Source : ASCO 2016*

Il est également décrit une hétérogénéité d'expression entre site tumoral primitif et secondaire avec en moyenne 25 % de discordance entre les différents prélèvements ⁷⁵. De plus, ce marquage peut être difficile à interpréter. Les variations dans les résultats d'analyse peuvent être liées : au type d'échantillon tissulaire (biopsie chirurgicale, ponction sous scanner, biopsie bronchique, cytoponction), au moment du prélèvement (pré-thérapeutique, après chimiothérapie...), à l'ancienneté de l'échantillon, aux conditions de fixation et d'archivage et à l'anticorps utilisé pour la détection de PD-L1. (Figure 13) ⁷⁶.

Une étude récente retrouve une bonne concordance (pouvant atteindre 92%) entre le marquage des cellules tumorales étudié sur des petites biopsies réalisées par différent moyens diagnostiques versus une pièce opératoire ⁷⁷.

Le groupe PATTERN de pathologistes thoraciques français a proposé en 2018 des recommandations concernant les étapes d'analyse et d'interprétation du marquage PD-L1 ⁷⁸. Il est recommandé d'utiliser des tests (ou kits) validés cliniquement sur des plateformes dédiées. (tests SP263 sur automate Ventana, 22C3 et 28.8 sur automate Dako par exemple) qu'il faut valider et étalonner régulièrement bien que certains kits artisanaux puissent être également utilisés sous réserve de contrôles fréquents ⁷⁹.

L'évaluation de la qualité de la biopsie et de la qualité de la persévération du prélèvement est indispensable avant toute interprétation. La présence de très nombreuses cellules immunitaires positives, les macrophages notamment, peut gêner considérablement l'analyse. (Figure 14 E et F).

Tout marquage membranaire linéaire, complet ou non, quel que soit son intensité, est considéré comme positif. (Figure 14 A à D).

D'après les résultats de l'étude de Heymann⁸⁰, qui a démontré que l'expression de PD-L1 était comparable entre petites biopsies et pièces opératoires ainsi que cytologie par cytobloc si les lames d'IHC analysées comportaient plus de 100 cellules tumorales si ce seuil n'était pas atteint les résultats devaient être émis sous réserve (risque important de faux négatifs et de faux positifs).

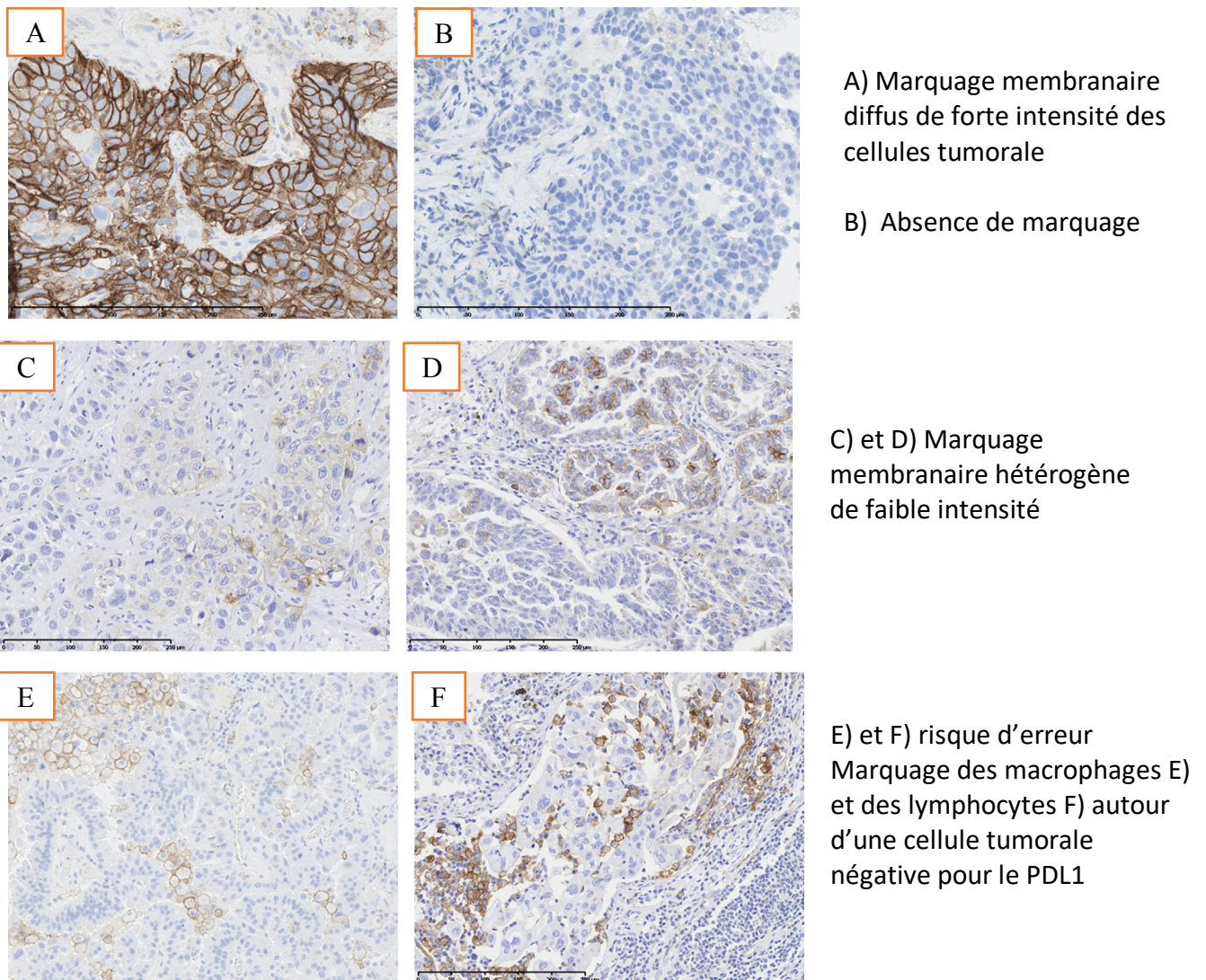


Figure 14 : Aspects courants des marquages PD-L1 en routine : *Recommandations par le groupe PATTERN : Sylvie Lantuejoul et al*

Le pourcentage de cellules tumorales positives exprimant le PD-L1 doit être évalué selon des seuils de positivité fixés à 1% et 50% (figure 15). Des modèles ont été proposés pour s'affranchir de l'hétérogénéité intra tumorale et conclure à un seuil de positivité le plus fiable possible (figure 16).

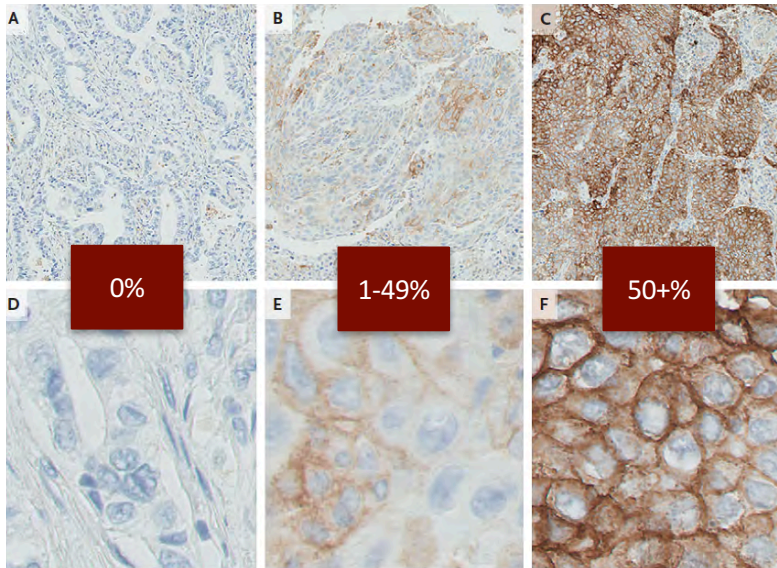


Figure 15 : Exemple de seuils de fixations du PD-L1 en immunohistochimie *Garon et al. N Engl, J Med 2016 ;372 :2019*

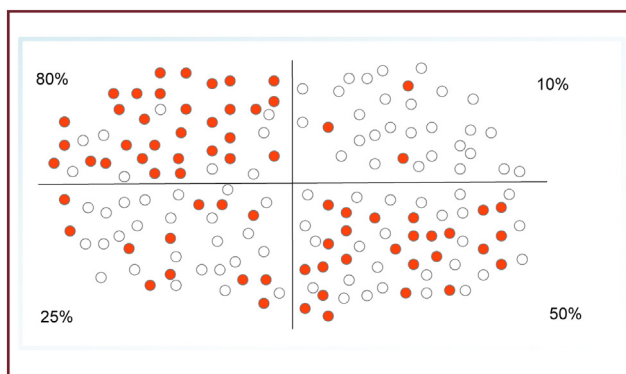


Figure 16 Exemple de méthode permettant de quantifier l'expression de PD-L1 quand elle est hétérogène au sein d'une même tumeur. Additions des pourcentages finaux $(80+10+25+50) / 4 = 40\%$

Recommandations par le groupe PATTERN : Sylvie Lantuejoul et al

Cette interprétation semi-quantitative est donc délicate et peut engendrer une disparité de résultat en fonction des lecteurs. Des discordances relatives au seuil de positivité peuvent atteindre 10 à 18 % selon les séries⁸¹.

b. Mise en évidence des mutations

Sur les prélèvements tissulaires ces recherches sont contraintes par la fragmentation de l'ADN inhérente à l'inclusion des tissus en paraffine. Les techniques de biologie moléculaire pour la recherche de mutations sont basées sur la réaction de PCR (Polymerase Chain Reaction) qui consiste en une photocopie de l'ADN en des milliers d'exemplaires.

Le séquençage Sanger, méthode historique de référence n'est pas adapté à de petits échantillons comme ceux issus des biopsies bronchiques dont la cellularité tumorale est souvent faible. Des techniques alternatives, plus rapides et plus sensibles (réalisable à partir de 10% de cellules mutées) permettent une détection sans a priori de l'ensemble des mutations d'un exon donné (HRM, analyse de fragment) ou d'une détection ciblée des mutations les plus fréquentes (techniques de PCR en temps réel, pyrosequençage ou SnapShot) ⁸².

Plus récemment des techniques plus performantes de séquençage haut débit dites NGS (Next Generation Sequencing) ont été utilisées. L'analyse par NGS d'un panel ciblé de gènes (NGS ciblé) permet la détermination en une seule analyse du statut mutationnel de dizaines de gènes ⁸³. Ces techniques peuvent reposer sur une analyse de l'ADN ou de l'ARN.

c. Cas des réarrangements chromosomiques

Concernant les réarrangements chromosomiques, plusieurs techniques peuvent être utilisées : détection de la protéine chimérique de fusion en IHC (figure 17) , séquençage ADN ou ARN, hybridation in situ en fluorescence (FISH) (Figure 18).

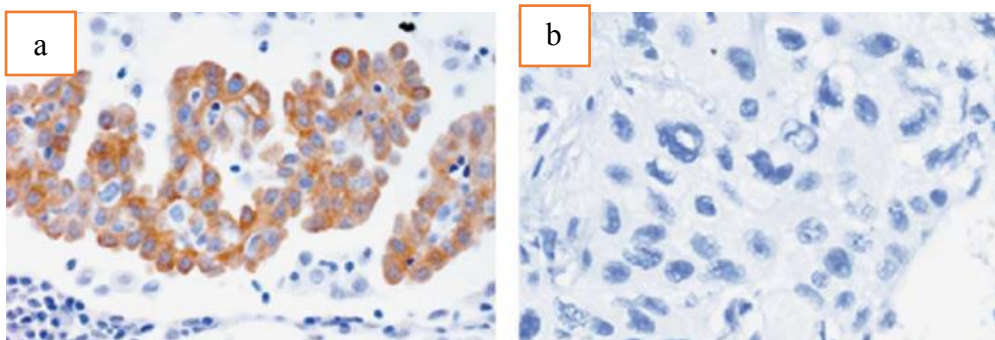


Figure 17 : Exemple de marquage de la protéine ALK en IHC a) réarrangement positif (surexpression protéique) b) pas de réarrangement (expression normale)

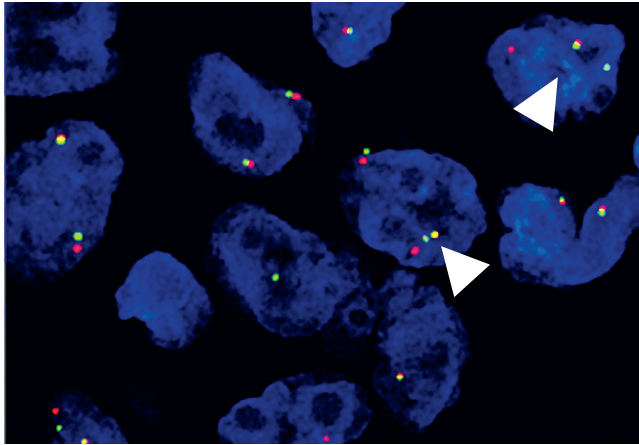


Figure 18 : Mise en évidence de la présence d'un réarrangement *ALK* à l'aide d'une sonde FISH de séparation. *Source* : A. McLeer-Florin

Les techniques d'IHC sont plus rapides et moins coûteuses. Pour la détection des translocations *ALK* et *ROS1*, elles présentent une très bonne sensibilité et sont donc généralement utilisées en première intention. Néanmoins la spécificité pour *ROS1* est insuffisante et une technique de confirmation (séquençage ou FISH) est nécessaire.⁷³

Pour les autres réarrangements chromosomique, l'analyse est le plus souvent faite par séquençage ARN, mais la FISH peut également être utilisée.

De multiples techniques sont donc à mettre en œuvre pour obtenir l'ensemble des informations nécessaires au traitement optimal du CBNPC, tout particulièrement dans sa forme non-épidermoïde. Une difficulté majeure est que chacune de ces techniques requiert une certaine quantité de tissu tumoral, quantité limitée par la taille des biopsies.

3. Du diagnostic histologique aux analyses moléculaires

L'European expert group a actualisé en 2018 les recommandations concernant la qualité des prélèvements bronchiques⁸⁴. Ainsi, il est recommandé de réaliser 5 biopsies au minimum pour assurer une bonne sensibilité diagnostique et 5 biopsies supplémentaires pour réaliser l'ensemble des analyses en immunohistochimie et biomoléculaire nécessaires au génotypage et phénotypage. En effet, dans l'étude de *Gellert et al.*⁸⁵ la chance d'avoir au moins une biopsie bronchique positive est de 65 % lorsqu'une seule biopsie est effectuée, 68 % lorsque 2 biopsies sont effectuées et respectivement 75 %, 83 %, 96 % et 100 % pour 3, 4, 5 et 6 biopsies.

Les prélèvements de petites tailles obtenus par exemple par mini-sonde demandent une attention particulière afin de pouvoir en extraire le maximum d'informations. Les étapes pré analytiques sont essentielles.

La période d'ischémie froide correspond au temps qui s'écoule entre l'extraction du corps humain et la mise au contact du fixateur, doit être réduite au maximum. Les biopsies doivent être fixées immédiatement dans du formol neutre tamponné à 10 % en respectant un temps déterminé en fonction du prélèvement afin d'éviter une sous ou sur-fixation. Une décalcification des prélèvements est à éviter des que possible, l'altération des acides nucléique quelle engendre pouvant être délétère pour les analyse complémentaires d'immunohistochimie (IHC) ou de biologie moléculaire (BM). Il est recommandé d'inclure en paraffine les fragments dans plusieurs cassettes et de réaliser au décours plusieurs lames blanches à la suite afin d'éviter une recoupe du bloc dans un second temps ce qui causerait une perte de matériel conséquente.

Il faut en effet essayer d'anticiper les analyse à réaliser afin de prévoir un nombre de lame suffisant pour réaliser successivement et dans les plus courts délai les analyses : histochimiques (coloration des mucines) immunohistochimiques diagnostiques (TTF1 et p40) et theranostiques (ALK, ROS1 et PDL1) qui pourront être suivi d'une analyse par FISH et éventuellement garder un peu de matériel pour une éventuelle inclusion ans un essai thérapeutique. Du matériel supplémentaire sera ensuite nécessaire en fonction de l'histologie et du stade clinique pour réaliser dans certains cas des analyses en biologie moléculaire à la recherche de drivers oncogéniques ciblables (figure 19).

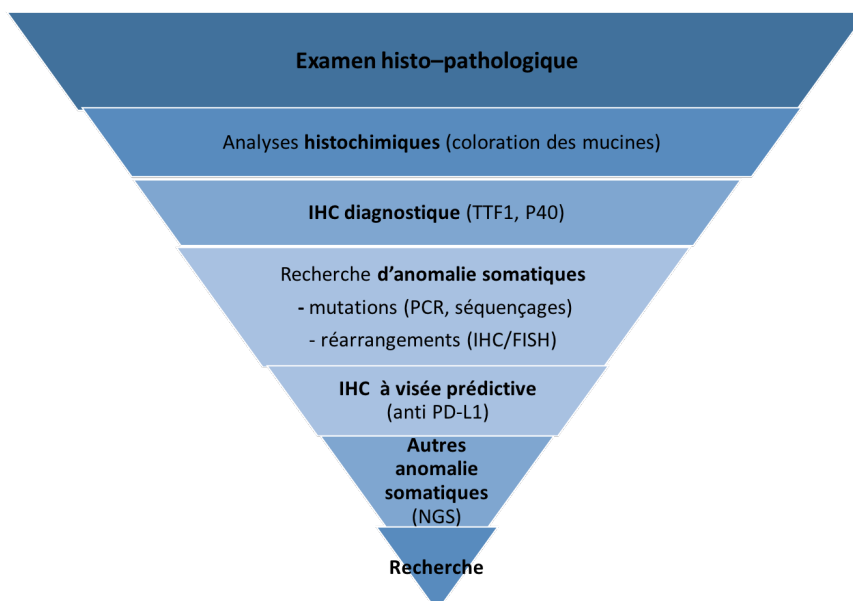


Figure 19 : Schématisation des analyses possiblement nécessaires sur prélèvements de tissus tumoral pour une prise en charge d'un cancer pulmonaire en 2021, IHC= immunohistochimie.

VI. Repères dans le traitement des CBNPC

1. Stade I et II

Une chirurgie d'exérèse complète anatomique, comportant un curage ganglionnaire complet est recommandée chez les patients accessibles à un traitement chirurgical ^{86 87}. Des traitements péri-opératoires (chimiothérapie, radiothérapie) sont parfois nécessaires.

Pour les patients inopérable une radiothérapie à visée curative en conditions stéréotaxiques pour les tumeurs N0 est recommandée en première intention.

2. Stades III

Deux attitudes peuvent être proposées en fonction de la résecabilité de la tumeur et de l'opérabilité du patient : chirurgie d'exérèse avec curage ganglionnaire médiastinal complet, précédée ou suivie de 3 à 4 cycles de chimiothérapie à base de platine, ou radiochimiothérapie, suivie d'un an d'immunothérapie par Durvalumab.

3. Formes métastatiques - stade IV en l'absence de driver oncogénique ciblable

a. Protocoles thérapeutiques de première ligne (patients PS 0 ou 1)

La prise en charge est résumée dans la figure 20 ci-dessous.

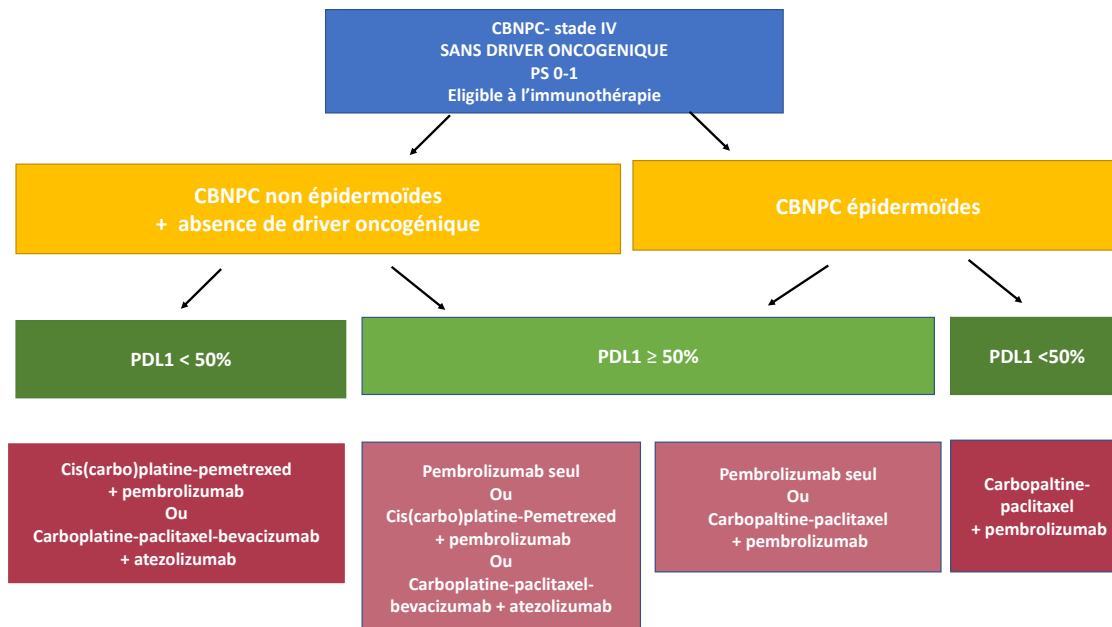


Figure 20 : Algorithme actuel de traitement des CBNPC de stade IV sans addiction oncogénique accessible à un traitement systémique par immunothérapie.

CBNPC= carcinome bronchique non à petites cellules

En cas de contre-indication à l'un de ces traitements seul ou combiné, une chimiothérapie en monothérapie est indiquée. Aucun protocole de chimiothérapie n'a démontré une supériorité par rapport à un autre ^{88,89}.

b. Protocoles thérapeutiques de deuxième ligne

Le choix des molécules de deuxième ligne dépend de l'histologie, du statut PS du malade ainsi que des molécules reçues en première ligne. Si un patient a reçu une immunothérapie en monothérapie il est recommandé de débiter une chimiothérapie par sel de platine.

Pour les patients ayant reçu en première ligne un doublet de chimiothérapie seul, le traitement de référence repose sur une immunothérapie. Enfin pour ceux ayant été traités par immunothérapie et chimiothérapie il est conseillé de prescrire une chimiothérapie en monothérapie.

VII. Analyses sur biopsies de nodules pulmonaires périphériques : état des lieux des connaissances

1. Rendement diagnostique

Une méta-analyse récente de 2017 portant sur 7 872 lésions (57 études) ⁹⁰ retrouve un rendement diagnostique global pour la MNS de 70,6%. Les études qui comportaient une aide au guidage (bronchoscopie virtuelle, électromagnétique ont été exclu, celles utilisant un repérage par fluoroscopie étaient retenues). Pour 1067 lésions ≤ 2 cm et 2107 lésions > 2 cm les taux étaient de 60,5 % et 75,7 % respectivement. Le rendement diagnostique était meilleur en cas de signal échographie central versus tangentiel (78,7 % vs 52 %) et en cas de présence d'un signe de la bronche apprécié sur le scanner (76,5 % vs 52,4 %). Le taux de complications global était de 2,8 %, avec 82 pneumothorax dont 13 nécessitant un drainage (0,2 %).

2. Recherche des altérations moléculaires

Plusieurs études ont examiné la possibilité de rechercher les mutations d'*EGFR* en particulier sur des biopsies réalisées par ponction sous TDM et retrouvent un taux de réussite autour de 90%. ^{91 92 93 94}, mais avec des taux de complications plus importants.

Une étude retrospective menée en 2014 par Shiau *et al* concernant 2404 échantillons c'est intéressée au taux de succès de recherche d'*EGFR* sur différents types de petits prélèvements (réalisés par biopsies bronchique ou ponction sous TDM notamment). Le taux d'échec était de 5,4% tous prélèvements confondus. Aucune différence significative n'était retrouvée entre les

prélèvements d'origine cytologique ou histologique. Parmi les prélèvements histologiques un taux de cellularité tumorale important (>30%) était associé à un meilleur rendement.⁹³

Nous avons mené au CHU de Rouen en 2015 une étude rétrospective montrant que l'analyse moléculaire de plusieurs gènes (*EGFR*, *ALK*, *HER2*, *BRAF*, *PIK3CA*, *c-MET*, *ROS1*) était possible dans 80% des cas sur des prélèvements histologiques et cytologiques réalisés par MNS avec une aiguille à biopsie de 1,5mm⁹⁵.

Une étude coréenne de 2019 concernant des prélèvements réalisés par MNS avec une aiguille de 1,8 mm, confirme la possibilité de recherche de mutations d'*EGFR*, translocation *ALK* et expression de PD-L1 sur 92 prélèvements qui concluent à un adénocarcinome bronchique dans respectivement 98 %, 100 % et 94 % des cas⁹⁶.

Kim *et al* en 2019 ont comparé pour la première fois le résultat d'analyses moléculaires sur des prélèvements issus de R-EBUS avec le gold standard chirurgical. Une concordance de 97% et 100% a été retrouvée pour *EGFR* et *ALK* respectivement.²⁴

Oki *et al* ont prouvé également la faisabilité de rechercher les anomalies de *EGFR*, *ALK* et *KRAS* dans 89%, 95% et 91% des cas sur des biopsies obtenues par un bronchoscope ultrafin associé à une aiguille à biopsies 1,5mm. La concordance avec les résultats obtenus sur des biopsies chirurgicales était également excellente (respectivement de 98% 100% et 98%)⁹⁷.

Concernant l'étude des biomarqueurs sur des **prélèvements cytologiques** (obtenus par brossage bronchique ou aspiration/rinçage du cathéter), Ellison *et al* ont récemment démontré que des échantillons cytologiques peuvent être utilisés avec succès pour la mise en évidence de mutation *EGFR* à condition que des méthodes de tests sensibles soient utilisés.⁹⁸ Des études de faisabilité sur brosses cytologiques obtenues par R-EBUS montraient une faisabilité de la recherche d'*EGFR* avec une bonne concordance par rapport aux biopsies. 86,6% pour Sanchez *et al*,⁹⁹ 88,7% pour Yu *et al*¹⁰⁰ et 94% pour Tsai *et al*¹⁰¹, en particulier en utilisant des tests plus sensibles que les techniques standard de séquençage Sanger.

3. Expression de PD-L1

Kitazono *et al* ont rapporté que la recherche du PD-L1 en IHC avait un bon taux de concordance de 92% entre 79 des échantillons réséqués chirurgicalement appariés avec des biopsies de petites tailles (EBUS-TBNA, ponction sous TDM ou biopsies transbronchiques)⁷⁷.

Kim *et al* ont étudié également la concordance de la recherche de la protéine PD-L1 avec les 3 tests commercialisés actuellement (22C3, SP142, and SP263) sur 46 petites biopsies

bronchiques obtenue par différents moyens non invasifs dont 57% de R-EBUS comparé au gold standard chirurgical a été évalué chez et retrouve une bonne corrélation (96 % et 73 % en utilisant les seuils de ≥ 1 % et ≥ 50 %, respectivement).

L'étude portée par Ilie *et al* est plutôt pessimiste et retrouve un fort taux de discordance de 48% entre 160 échantillons reséqués chirurgicalement appariés avec des biopsies réalisées de façon non invasive pour la détection de PD-L1 en IHC (clone SP142 Ventana)^{102,104}. Li *et al* en comparant biopsies chirurgicales et biopsies de petits prélèvements concluent à une discordance globale de 18,9%. Le taux était plus bas 18,4% pour un PDL1 <1% versus 56,7% et 43,3% pour des seuils de PDL1 de 1-49% et >50% respectivement, attribué à l'hétérogénéité tumorale¹⁰³.

L'échoendoscopie radiale semble être l'une des meilleure approche diagnostique pour l'exploration de nodules pulmonaires en particulier périphériques. La recherches de biomarqueurs prédictifs de la réponse aux thérapies ciblés ou de la réponse aux points de contrôles immunitaires est aujourd'hui indispensable pour tout diagnostic de cancer pulmonaire non a petite cellule à un stade avancé. Nous soutenons dans ce travail l'hypothèse que la recherche en immunohistochimie et en biologie moléculaire de l'ensemble des biomarqueurs tumoraux est possible sur des prélèvements bronchiques de petites tailles prélevés par endoscopie bronchique avec repérage par mini-sonde.

En effets les études publiées jusqu'à lors se sont souvent intéressé à la faisabilité de la de la recherche d'une altération unique^{24,92,93} et rares sont ceux qui ont étudié la recherche globale de tous les biomarqueurs au décours de prélèvements issus d'un unique examen semi-invasif.

MATERIEL ET METHODES

I. Méthodologie de l'étude et plan expérimental

L'objectif de notre étude est d'évaluer la faisabilité de l'analyse de l'ensemble des marqueurs theranostiques sur des biopsies de petite taille réalisées par R-EBUS.

Nous avons donc mené une étude rétrospective observationnelle mono-centrique s'intéressant à tous les patients ayant bénéficié d'une fibroscopie bronchique avec R-EBUS pour le bilan d'une ou plusieurs lésion(s) pulmonaire(s) entre janvier 2017 et décembre 2019 au CHU de Rouen.

1. Critères de jugement principal et secondaires

Le critère de jugement principal était la faisabilité de l'analyse de l'ensemble des biomarqueurs thérapeutiques pertinents à partir des prélèvements réalisés par MNS (expression de PD-L1 pour tout CBNPC, PD-L1 et analyse moléculaire incluant au minimum ALK, ROS1, *EGFR*, *BRAF* et *KRAS* en cas de CBNPC non épidermoïde).

Les critères de jugements secondaires étaient :

- faisabilité de l'analyse de l'expression de PD-L1 en cas de diagnostic de CBNPC
- facteurs de risque d'échec de l'analyse de l'expression de PD-L1 en cas de diagnostic de CBNPC.
- concordance entre le niveau d'expression de PD-L1 mesuré sur les prélèvements réalisés par MNS et le niveau d'expression de PD-L1 mesuré sur pièce opératoire.
- valeur prédictive du niveau d'expression de PD-L1 mesuré sur les prélèvements réalisés par MNS sur la réponse au traitement par immunothérapie le cas échéant.
- faisabilité de l'analyse de chacune des altérations moléculaires en cas de CBNPC non épidermoïde : translocations ALK et ROS1, mutations *EGFR*, *BRAF*, *KRAS*, *HER2*, *MET*.
- faisabilité de l'analyse moléculaire par NGS ADN en cas de diagnostic de CBNPC non épidermoïde.
- facteurs de risque d'échec de l'analyse moléculaire en cas de diagnostic de CBNPC non épidermoïde.
- sensibilité de la bronchoscopie par MNS pour le diagnostic de CBNPC.
- identification des facteurs de risque d'échec de MNS en cas de diagnostic de CBNPC.

2. Recueil de données

Les données cliniques et en particulier les compte-rendu d'endoscopie, de chirurgie et des analyses anatomo-pathologique, moléculaire et microbiologique ont été collectées à partir des éléments disponibles dans la base de données électroniques du CHU de Rouen, des dossiers médicaux du CHU de Rouen. Lorsque les médecins référents étaient extérieurs au CHU de Rouen, ils ont été interrogés afin de connaître le devenir des patients à distance de l'examen, et l'obtention d'un diagnostic ultérieur lorsque celui-ci n'était pas obtenu par l'endoscopie initiale, les traitements reçus et le statut vital. Les scanners thoraciques réalisés avant l'examen endoscopique ont été revus.

a. Recueil des caractéristiques du patient

L'âge, le sexe et l'antécédent personnel de réalisation d'une fibroscopie classique avant d'être adressé pour cette exploration endoscopique par MNS ont été relevés.

Pour les patients dont la recherche de PD-L1 avait été réalisable, des données supplémentaires ont été recueillies : statut tabagique, stade de la maladie, traitements, survie.

b. Recueil des caractéristiques du nodule

Les caractéristiques scannographiques de chaque nodule ont été étudiées : taille, distance à la plèvre, composante en verre dépoli pur ou non, localisation lobaire et présence d'un signe de la bronche menant au centre ou en périphérie de la lésion.

c. Interprétation des résultats de la mini-sonde

Tous les prélèvements réalisés au cours de l'examen par R-EBUS ont été analysés.

Si au moins un des prélèvements avait permis de conclure à un diagnostic (bénin comme malin), la mini-sonde était considérée comme positive et contributive.

Si au contraire aucun des prélèvements réalisés ne permettait d'aboutir à un diagnostic, la mini sonde était considérée comme non contributive ou négative. Pour certains de ces patients un diagnostic de certitude avait pu être obtenu secondairement.

Les nodules ayant régressé spontanément ou sous traitements anti-infectieux ou anti inflammatoire ont été considérés bénin. Au contraire, un diagnostic malin avait parfois été porté à la suite d'une autre procédure (seconde endoscopie, biopsie transpariétale, chirurgie) ou selon un faisceau d'argument clinique et biologique.

Enfin, un certain nombre de nodules restaient sans diagnostic de certitude et ont été exclus de l'analyse pour le calcul de la sensibilité. Il s'agissait en particulier de patients perdus de vue ou de nodules stables dans le temps, sans autre procédure diagnostique contributive.

II. Procédures

1. Procédure R-EBUS

Chaque bronchoscopie était précédée d'un repérage du nodule sur un scanner thoracique en coupe fine (0,625mm), datant de moins d'un mois, à l'aide d'un logiciel de repérages virtuel endobronchique. Deux logiciels étaient utilisés : Lungpoint bronchus® (figure 21) et Superdimension Navigation System ®. Ils étaient utilisés indifféremment selon les habitudes du praticien. Il n'y avait pas de repérage par fluoroscopie ni de guidage virtuel ou de guidage électromagnétique associé à la mini-sonde.

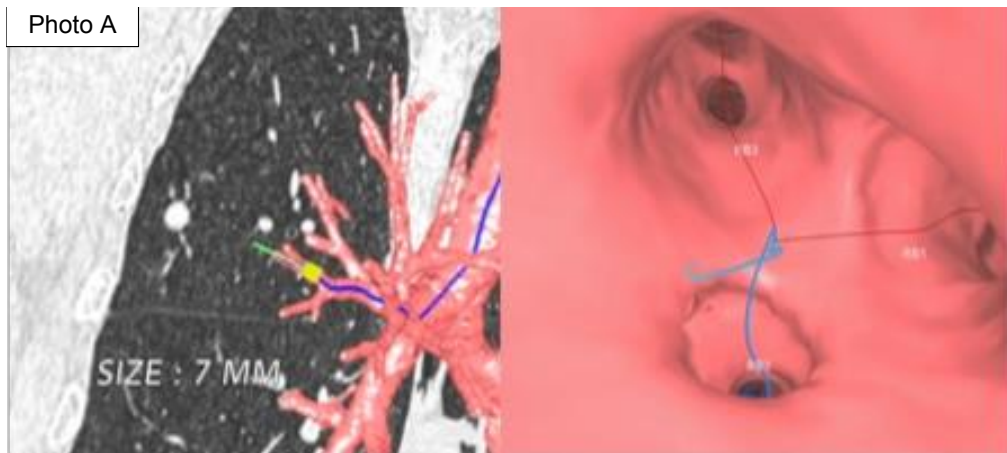


Figure 21 : Repérage de la lésion par le logiciel « Lungpoint bronchus »

L'endoscopie se déroulait au CHU de Rouen, le plus souvent sous anesthésie locale en salle d'endoscopie et parfois sous anesthésie générale au bloc opératoire. Le choix de la technique d'anesthésie dépendait du patient (antécédent de toux incoercible, anxiété majeure...) ou de la procédure (R-EBUS + EBUS-TBNA, pose de chambre implantable concomitante...).

Le matériel utilisé comportait : un endoscope de 4 mm de diamètre externe, avec canal opérateur de 2 mm (BF-MP60F ; Olympus®, Tokyo, Japan) ainsi qu'un cathéter-guide de 1,9 mm de diamètre associé à une sonde d'échographie de 1.4 mm de diamètre (UM-S20-17S, 20MHz ; Olympus®) (Figure 22).



Figure 22

A) Cathéter guide

B) Sonde d'échographie

Une fois que le fibroscope avait atteint la bronche sous-segmentaire la plus distale et a priori la plus proche de la lésion selon les données de la navigation virtuelle pré-endoscopique, la mini-sonde était introduite au sein de son cathéter puis guidée jusqu'à repérage du nodule.

Après repérage de la lésion, la mini-sonde était retirée du guide du cathéter guide, par lequel les instruments de prélèvements étaient ensuite introduits. Les instruments utilisés étaient une pince à biopsies de 1,5mm et une brosse cytologique (Figure 23).

Un nouveau repérage par MNS était parfois réalisé entre deux prélèvements (en particulier en cas de toux importante). Un mini-lavage était parfois réalisé via le cathéter-guide en fin d'examen.

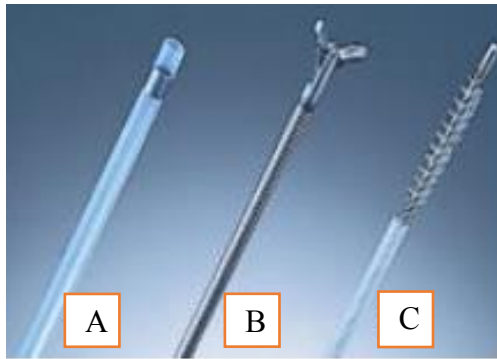


Figure 23

A) Cathéter guide

B) Pince à biopsies

C) Brosse cytologique

2. Procédure d'analyse histologique

Les biopsies étaient immédiatement fixées dans du formol 10% tamponné au formaldéhyde 4% puis inclus en paraffine. Le bloc FFPE (formalin-fixed, paraffin embedded) était ensuite coupé au microtome afin de réaliser une coloration HES (hématoxyline, éosine et safran) et, en cas de présence de cellules malignes, un marquage en IHC des antigènes P40 et TTF1 afin de différencier les carcinomes épidermoïdes (p40+ TTF1-) des non-épidermoïdes (le plus souvent p40- TTF1+).

Si les biopsies n'apportaient pas de diagnostic, les prélèvements cytologiques (brosse et/ou rinçage du cathéter) étaient analysés. Un étalement sur lame puis une coloration par May-Grünwald Giemsa étaient réalisés. La faible cellularité ne permettait dans aucun cas la réalisation de cytobloc.

Certains prélèvements montraient des cellules atypiques (malignes), sans morphologie permettant de préciser le sous-type de cancer. Ces résultats ont été classés comme malin et en fonction du contexte clinique une analyse moléculaire et IHC pouvait être réalisée.

Si le diagnostic de carcinome épidermoïde était porté, une lame histologique complémentaire était réalisée pour marquage de l'antigène PD-L1 en IHC. Pour tous les autres CBNPC et pour les prélèvements considérés malins sans plus de précision, 6 lames étaient réalisées : 3 pour la recherche en IHC de l'expression de PD-L1 et des translocations ALK et ROS1 et 2 au minimum pour l'analyse moléculaire. Dans certains cas des analyses complémentaires étaient également réalisées (FISH pour confirmation d'une translocation par exemple).

3. Procédure d'analyse immunohistochimique (PDL1 ALK ROS1) et FISH (ALK et ROS1)

a. Expression de PDL1

Dans notre centre, depuis février 2017 pour tous les CBNPC la recherche de l'expression de PD-L1 est réalisée par IHC. Pendant cette période les anticorps utilisés étaient les clones E1L3N (Cell Signaling technology) et QR1 (Diagomics) plus récemment. Les marquages étaient réalisés sur un automate Ventana BenchMark (Roche).

Le pourcentage de cellules tumorales marquées était précisé (<1%, 1-49% ou ≥ 50%), de même que le nombre de cellules tumorales évaluables (<50, 50-100, >100). Si le nombre de cellules tumorales évaluables était <100, le résultat était rendu sous réserve

b. Translocations ALK et ROS1

Pour tout CBNPC non épidermoïde, la recherche de translocation ALK était systématique pour toute la période de l'étude, celle de la translocation ROS1 est devenu systématique à partir de mai 2018. Les anticorps utilisés étaient : CDx Ventana ALK (D5F3) (Roche ©, Bâle, Suisse) et ROS1 D4D6 Rabbit 164 # 3287 (Cell Signaling Technology ©, 165 Danvers , Massachusetts).

Pour la détection ALK et ROS1, la positivité a été définie comme un signal cytoplasmique, quelle que soit l'intensité de la coloration ou le pourcentage de cellules tumorales colorées.

Pour les prélèvements ALK faiblement positifs, dits équivoques (1+ ou 2+), et pour tous les prélèvements ROS1 positifs (1+ 2+ et 3+) une confirmation par technique de FISH était réalisée (sondes Vysis ALK Break Apart et ZytoLight SPEC ROS1 Dual Color Break apart, cliniSciences, Nanterre, France). Au moins 100 noyaux étaient analysés, un cas était considéré positif quand 15% de noyaux néoplasique présentaient un réarrangement.

4. Procédure d'analyse en biologie moléculaire (BM)

Toutes les analyses moléculaires étaient réalisées au Laboratoire de Génétique Somatique des Tumeurs (LGST, service d'anatomie et cytologie pathologiques du CHU de Rouen). Pour l'analyse moléculaire, une zone sélectionnée par le praticien comportant la plus grande proportion de cellules tumorales était macro-disséquée sur une section de 10 µm à partir de lames non colorées issues du bloc FFPE. L'extraction de l'ADN était réalisée avec le kit Maxwell 16 LEV RNA FFPE (Promega, Madison, Wisconsin).

Une première analyse était systématiquement réalisée par :

- Pyroséquençage des exons 18 à 21 de l'*EGFR*
- Analyse de fragments des exons 19 et 20 de l'*EGFR* et de l'exon 20 d'*HER2*

- Analyse par extension de primer (SNAPshot, ABIPrism, Life Technologies, Carlsbad, CA USA) de codons des gènes *KRAS* (codons c.34G, c.35G, c.37G, c.38G, c.181C, c.182A, c.183A), *EGFR* (codons c.2155G, c.2156G, c.2369C, c.2573T, c.2582T) et *BRAF* (codon c.1799T)

Le seuil de sensibilité de ces techniques était de 5% d'allèle muté.

Une seconde recherche d'anomalies moléculaires somatiques, par séquençage ADN de nouvelle génération (NGS ADN, c'est-à-dire une technique de séquençage ADN multiplexée à haut débit) était effectuée systématiquement quel que soit le résultat de la première analyse.

Pour l'analyse NGS ADN, une librairie des fragments d'ADN présents dans l'échantillon tumoral analysé était préparée avec le kit Tumor Hotspot MASTR Plus (Agilent ©, Santa Clara, California) puis le séquençage a été réalisé sur séquenceur MiSeq (Illumina ©, San Diego, California). Les gènes suivants étaient séquencés : *AKT1* (exon 3), *ALK* (exons 20–29), *BRAF* (exons 11,15), *CDKN2A* (exons 1–3), *CTNNB1* (exon 3), *DDR2* (exons 3–18), *EGFR* (exons 18–21), *ERBB2* (exons 19–21), *ERBB4* (exons 10–12), *FGFR2* (exons 7, 10, 12), *FGFR3* (exons 7, 9, 14, 15), *H3F3A* (exon 2), *HIST1H3B* (exon 1), *HRAS* (exons 2–4), *IDH1* (exon 4), *IDH2* (exon 4), *KIT* (exons 8, 9, 10, 11, 13, 14, 17, 18), *KRAS* (exons 2–4), *MAP2K1* (exons 2, 3), *MET* (exons 2, 10, 14–20), *NRAS* (exons 2–4), *PDGFRA* (exons 12, 14, 18), *PIK3CA* (exons 2, 3, 10, 11, 21), *PIK3KR1* (exons 11, 12, 13), *PTEN* (exons 1–9) et *STK11* (exons 1–9).

Les résultats étaient analysés avec les logiciels BWA-GATK©, VarScan2© et Alamut HT©.

La sensibilité de cette analyse NGS ADN est estimée à 2,5% d'allèles variants. Cette technique est donc plus sensible et plus exhaustive, mais elle nécessite plus de temps et aussi plus de tissu tumoral, raisons pour lesquels nous conservons une analyse en deux temps permettant d'obtenir rapidement un résultat contributif pour les analyses essentielles à la décision thérapeutique de première ligne.

III. Analyses statistiques

Les variables continues sont reportées en médiane, 1er et 3ème interquartiles. Les variables catégorielles sont reportées en proportions et pourcentages. Les analyses de survie étaient effectuées à l'aide de l'estimateur de Kaplan-Meier et les comparaisons intergroupes via le test du logrank. Un seuil de 0.05 est retenu pour évaluer la significativité des résultats. L'ensemble des tests est de formulation bilatérale. Les logiciels utilisés sont IBM SPSS Statistics 25 et GraphPad Prism 8.4.2.

L'étude a reçu un avis favorable du Comité d'Evaluation des Recherches sur Données Existantes ou Hors Loi Jarde (CERDE-HLJ) du CHU de Rouen.

RESULTATS

I. Population globale

1. Caractéristiques des patients

Sur la période de janvier 2017 à décembre 2019, 1026 patients ont eu une fibroscopie par mini-sonde au CHU de Rouen et ont été inclus dans l'étude (figure 24).

Pour 67 patients (67/1026, 7%) la mini sonde était non contributive et aucun diagnostic n'avait pu être obtenu au décours : soit les patients ont été perdus de vue (30/1026, 3%) soit les nodules étaient restés stables au cours du suivi ultérieur (37/1026, 4%).

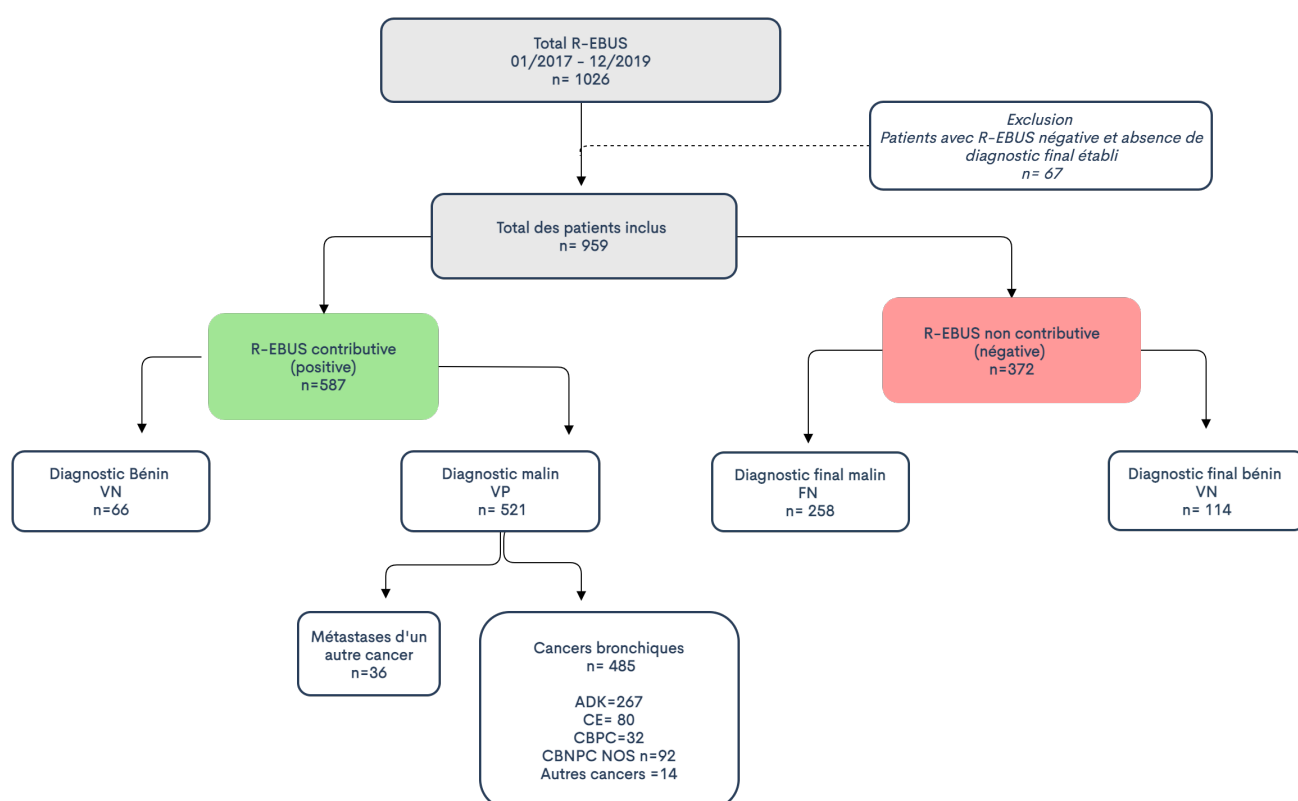


Figure 24 Diagramme de flux : VP = vrais positifs VN= vrais négatifs FP = faux positifs FN = faux négatifs. NOS= not otherwise specified (CBNPC indéterminés)

La durée médiane de de suivi était de 877 jours.

Parmi les 959 patients avec un diagnostic final, l'âge médian était de 65,9 ans. Il s'agissait majoritairement d'hommes (62,5%), Parmi les patients chez qui cette donnée était disponible, 448/799 (56%) avaient déjà eu une bronchoscopie standard avant d'être adressé pour une mini-sonde.

2. Caractéristiques des nodules

Les lésions pulmonaires concernées étaient principalement situées dans les lobes supérieurs droits (33%) et supérieurs gauches (29%) (Figure 25).

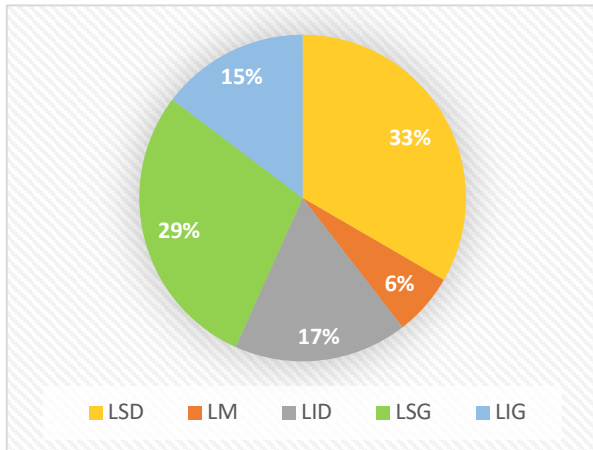


Figure 25 : Répartition lobaire des lésions pulmonaires

La médiane du grand diamètre et du petit diamètre des lésions pulmonaires était respectivement de 30 mm et de 21 mm. La médiane de la distance par rapport à la plèvre était de 10 mm. Les nodules étaient en verre dépoli pur dans 7,3% des cas (25/340). Un signe de la bronche était présent dans 71% des cas (360/508).

3. Caractéristiques des procédures

Les fibroscopies ont été réalisées sous anesthésie locale pour 71% des cas. Dans 81% des cas (781/959) la lésion était repérée en échographie, avec un signal circonférentiel pour 60% des cas (469/781), tangentiel pour 19% (150/781) et non décrit pour 21% (162/781).

Des biopsies ont pu être réalisées chez 773 patients (81%). Parmi les 186 patients chez qui aucune biopsie n'a été réalisée, 87% (162/186) correspondaient à des lésions non repérées en echoendoscopie. Lorsque des biopsies étaient réalisables leur nombre médian était de 4. Le nombre de biopsies est rapporté dans le tableau 5.

Nombre de fragments	0	1-3	4-6	>6	Inconnu	
Nombre de patients	15	278	382	92	6	773
%	2	36	49	12	0,8	100

Tableau 5 : Nombre de biopsies réalisées

Une brosse cytologique a été réalisée pour 761 patients (79%) et une aspiration de cathéter chez 408 patients (43%).

4. Résultats de la mini-sonde

Les résultats sont rapportés dans la figure 24 ci-dessus. La mini-sonde a été contributive pour 587 patients (587/959, 61%) et non contributive pour 372 examens (372/959, 39%). Parmi les diagnostics contributifs posés le résultat était bénin dans 11% des cas (66/587) et malin pour 89% (521/587) patients.

Les 66 diagnostics bénins posés par mini-sonde étaient : infection bactérienne (n=21), mycobactéries non tuberculeuses (n=10), tuberculose (n=9), sarcoïdose (n=9), aspergillose (n=6), granulome (n=5), pneumonie organisée (n=4), pneumopathie à la cordarone (n=1) et vascularite (n=1).

Les diagnostics malins étaient : cancer broncho-pulmonaire (93%, 485/521), lésions secondaires de cancers solides ou hématologiques (7%, 36/521).

Les 36 lésions secondaires retrouvées étaient des métastases de cancer du sein (n=10), urologique (n=7), digestif (n=6), ORL (n=3), mélanome (n=3), lymphome de Hodgkin (n=2), sarcome d'Ewing (n=1), tumeur cérébrale (n=1) et cancer ovarien (n=1).

La répartition histologique des 485 cancers bronchiques primitifs est présentée dans le tableau 6.

Types histologiques de cancers bronchiques	n	%
Adénocarcinome	267	55
Carcinome épidermoïde	80	16
Carcinome bronchique à petites cellules	32	7
CBNPC NOS	92	19
Autres	14	3
TOTAL	485	100

Tableau 6 : Types histologiques des 485 cancers broncho-pulmonaires diagnostiqués par mini-sonde. NOS= not otherwise specified (CBNPC indéterminé).

Parmi les 521 diagnostics malins posés par mini-sonde, 13,8% (72/521) ont été établis à partir de prélèvements cytologiques uniquement, dont 68 sur une brosse bronchique et 4 sur un rinçage de cathéter.

II. Rentabilité diagnostique de la mini-sonde

La mini-sonde n'a pas permis d'établir de diagnostic pour 372 patients (372/959, 39%). Parmi ces examens non contributifs un diagnostic malin a finalement été posé pour 258 lésions (258/372, 69 %) et un diagnostic bénin pour 114 patients (114/372, 31%).

Les techniques de prélèvements ayant permis de conclure finalement à un diagnostic définitif sont rapportées dans la figure 26.

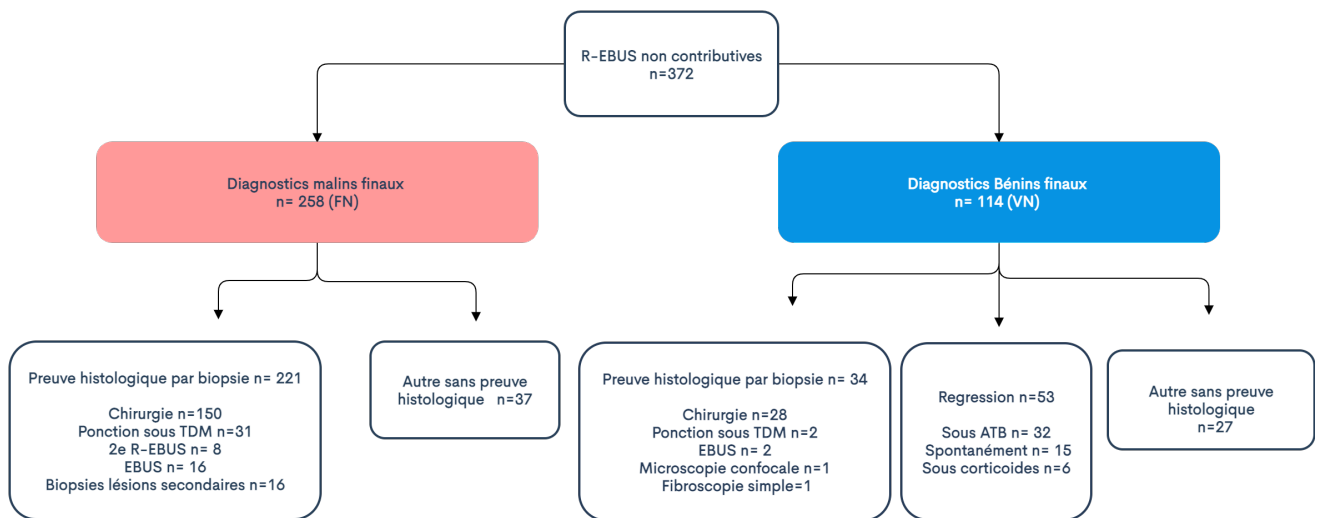


Figure 26 : Analyse des R-EBUS non contributives

Méthodes d'investigations ayant permis d'établir un diagnostic définitif après échec d'un R-EBUS. FN=faux négatifs VN =vrais négatifs ATB = antibiotiques

Parmi les diagnostics malins finaux 221 (86%) ont été établis en biopsiant la même lésion une deuxième fois ou une adénopathie satellite : par chirurgie pour 58%, ponction sous TDM pour 31%, 2^e minisonde 3% ou EBUS-TBNA 6% ou en biopsiant une lésion secondaire concomitante dans 6% des cas. Trente-sept lésions (37/221,14%) ont été considérées comme malignes sans preuve histologique formelle selon un faisceau d'arguments cliniques et biologiques.

Parmi les 108 diagnostics bénins établis secondairement (Tableau 7), 53 (53/114,46%) étaient des lésions qui avaient régressés spontanément sous traitement antibiotique ou corticoïde, 34/114 (30%) ont été établis suite à une deuxième biopsie du nodule ou des adénopathies satellites (28 par chirurgie, 2 par biopsie sous TDM, 2 par EBUS-TBNA, 1 par microscopie confocale, 1 par médiastinoscopie). Pour 27/114 (24%), le diagnostic a été établi sans preuve histologique, selon un faisceau d'arguments biologiques et cliniques.

7	Aspergillose
6	Tuberculose
5	Pneumopathies organisés
4	Bactériologie divers
4	Sarcoïdose
4	Nécroses post-radique
4	Mycobactérie non tuberculeuses
4	Granulomes
3	Vascularites
3	Hamartochondrome
2	Infarctus pulmonaires
2	Cicatrices fibro-élastique
2	Parasitologie
2	Amylose

1	Asbestose
1	Plaque pleurale fibro-hyaline nodulaire
1	Léiomyome utérin
1	Nécrose post immunothérapie
1	Pachypleurite bénigne
1	Sclerohyalinose
1	Pneumopathie cordarone
2	Autre

Tableau 7 : Détails des mini-sonde négatives dont la lésion correspondait finalement à une pathologie bénigne (Vrai négatifs).

1. Sensibilité

La sensibilité de la mini-sonde à effectuer à un diagnostic de cancer est donc de 67% (521/779, 67%) cf tableau 8.

	Pathologie maligne	Pathologies bénigne	Total
MNS contributive	521 (Vrais positifs)	0 (Faux positifs)	587
MNS non contributive	258 (Faux négatifs)	114 (Vrais négatifs)	372
			959

Tableau 8 : rentabilité diagnostique de la mini-sonde bronchique : MNS = mini-sonde FN=faux négatif FP=faux positifs VN=vrai négatifs et FN=faux négatifs.

2. Facteurs prédictifs de succès pour le diagnostic de cancer

	Vrai positifs n=521	Faux négatifs n=258	Analyse univariée, valeur p	Analyse multivariée, valeur p
LOCALISATION (n=779)	n= 521	n=258		
- Lobes supérieurs	335 (64 %)	158 (61%)	0.017	
- Autres lobes	186 (36%)	100 (39%)		
ANESTHESIE (n=779)	n= 521	n=258		
- Locale	388 (74,5%)	160 (62%)	0.0003	0.15
- Générale	133 (25,5%)	98 (38%)		
TYPE DE SIGNAL (n= 779)	n= 521	n= 258		
- Pas de repérage	13 (2,5%)	98 (38%)	<0.000001	0.07
- Repérage	508 (97,5%)	160 (62%)		
Dont :	n= 414	n= 126	<0.000001	0.08
- Circonférentiel	338 (82%)	74 (59%)		
- Tangentiel	76 (18%)	52 (41%)		
Mesures médianes (mm)				
- Grand diamètre	n= 262 33	n= 141 23	<0.00001	0.72
- Petit diamètre	n= 258 23,5	n=141 17	<0.0001	0.83
- Distance à la plèvre	n= 255 9,5	n= 137 11	0.81	
SIGNE DE LA BRANCHE (n=412)	n= 261	n = 151		
- Oui	221 (85%)	78 (52%)	<0.000001	0.06
- Non	40 (15%)	73 (48%)		
Biopsies réalisées (n= 779)	n= 521	n= 258		
- Oui	514 (99%)	149 (58%)	<0.000001	0.44
- Non	7 (1,3 %)	109 (42%)		
NOMBRE DE BIOPSIES (n=648)	n= 507	n = 141		
- 1-3	157 (31%)	68 (48%)	0.0001	0.001
- 4-6	270 (53%)	64 (45%)		
- > 6	80 (16%)	9 (6%)		

Tableau 9 : Caractéristiques des patients vrais positifs (VP) et faux négatifs (FN)

En analyse univariée, une valeur $p < 0,005$ est considérée significative (correction de Bonferroni pour 10 tests avec un risque alpha de 5%).

En analyse univariée, les facteurs associés de manière statistiquement significative à une meilleure rentabilité diagnostique pour le cancer étaient : la réalisation de l'examen sous anesthésie locale, la dimension plus élevée de la lésion (petit et/ou grand diamètre), la présence d'un signe de la bronche, le repérage de la lésion en échographie, la présence d'un signal échographique circonférentiel, la réalisation de biopsies, et un nombre plus élevé de biopsies lorsque celles-ci étaient réalisées.

En analyse multivariée, seul le nombre de biopsies réalisées était associé de manière statistiquement significative à une meilleure rentabilité diagnostique pour le cancer. (Tableau 9).

III. Analyse des biomarqueurs

Pour 402 patients (402/445, 90%), des analyses de biomarqueurs ont été réalisées (figure 31). Il s'agissait en particulier de tous les adénocarcinomes (expression de PD-L1 et analyse moléculaire), des carcinomes épidermoïdes (expression de PD-L1) et de certains CBNPC indéterminés NOS (expression de PD-L1 et analyse moléculaire).

1. Expression de PD-L1

La recherche de l'expression de PD-L1 était indiquée pour 402 patients.

L'analyse était contributive pour 325 patients (325/402, 80,8%), dont 217/402, (53,9%) avec un résultat remplissant tous les critères de qualité et 108/402 (26,8%) pour lesquels une réserve était émise sur le résultat en raison d'un nombre de cellules analysables inférieur à 100 (figure 27). Le résultat était : négatif pour 188/325 patients (57,8%), entre 1 et 49% pour 69/325 (21%) et $\geq 50\%$ pour 68/325 (21%).

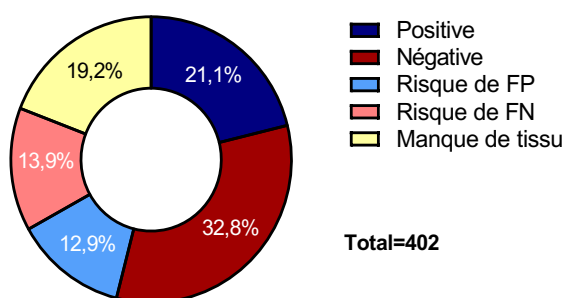


Figure 27 : Possibilité de recherche de PDL1 en immunohistochimie : FP = faux positif et FN = faux négatif

2. Recherche de translocation ALK et ROS1

La recherche de translocation *ALK* par IHC était indiquée chez 315 patients. Elle a été possible avec certitude dans 22/315, 70,5% des cas, douteuse avec un risque de faux négatif pour 23/315, 7,3% et impossible par faible cellularité pour 70/315, 22,2% des prélèvements.

Neufs patients (2,9%) avaient une IHC *ALK* positive, dont 8 avec un résultat nécessitant une confirmation par FISH (IHC positive 1+ ou 2+). Parmi eux la FISH était négative pour 5/8, positive pour 2/8, et non réalisable pour 1/8. (Figure 28).

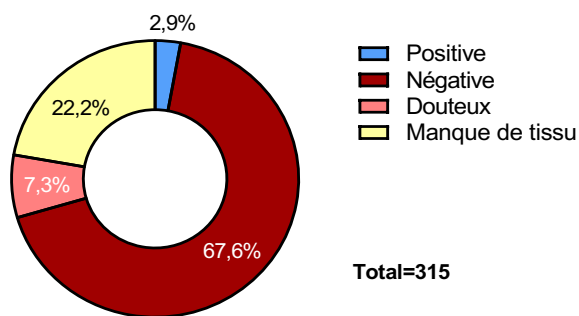


Figure 28 : Possibilité de recherche de ALK en IHC

La recherche de translocation *ROS1* par IHC a été réalisée de façon systématique pour tous les diagnostics de CBNPC non-épidermoïdes à partir de mai 2018. Dans notre cohorte, 229 patients étaient concernés. Cette analyse a été possible avec certitude pour 151/229, 66% des patients, douteux pour 12/229, 5,2% et impossible par manque de tissus dans 66/229, 28,8% des cas.

Parmi les 15 cas positifs en IHC, 11 nécessitaient une confirmation par FISH. La FISH était négative pour 10/15 et non réalisable pour 1/15. (Figure 29)

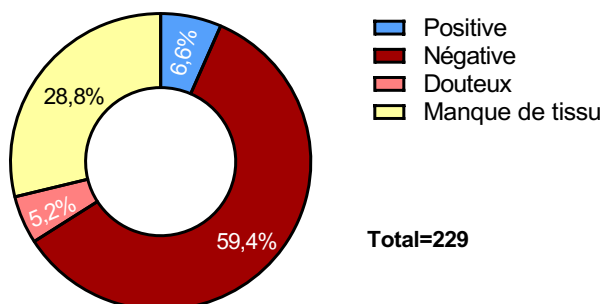


Figure 29 : Possibilité de recherche de ROS1 en IHC

3. Analyse moléculaire

Une analyse moléculaire était indiquée pour 317 patients.

L'analyse a été réalisée par les techniques de première ligne (SNAPshot, analyses de fragment et pyroséquençage) chez les 317 patients, et une analyse NGS complémentaire a été demandée pour 302 d'entre eux.

L'analyse de première ligne a pu être réalisée chez 309/317 patients (97,5%). Le résultat était rendu avec réserve (risque de faux négatif) chez 31/317 patients (9,8%). Il était positif pour 69/317 (22%) et négatif pour 55/317 (17%). Pour 154/317 (48%) d'entre eux l'analyse était possible mais le résultat était inconnu. Seuls 8 patients (2,5%) n'ont pas pu avoir d'analyse moléculaire du fait d'un manque de matériel. (Tableau 10)

	n=	%
Positif	69	22
Négatif	55	17
Douteux risque de faux négatif	31	9
Positif mais résultat inconnu	154	49
Impossible	8	3
TOTAL	317	100

Mutations identifiées	n= 69
EGFR	22
- ex 18	1
- ex 19	10
- ex 20	2
- ex 21	9
KRAS ex 2	44
BRAF ex 15	2
ERBB2/HER2 ex 20	1

Tableau 10 : Résultats de l'analyse moléculaire de première ligne.

L'analyse NGS était réalisable pour 254/302 (84%), avec un résultat positif pour 186/302 (62%), négatif pour 56/302 (18%) et émis avec réserve (risque de faux négatif) pour 12/302 (4%). (Tableau 11)

	n=	%
Positif	186	61,5
Négatif	56	18,5
Douteux risque de faux négatif	12	4
Impossible	48	16
TOTAL	302	100

Tableau 11: Résultats du NGS ADN

Les anomalies moléculaires identifiées par les analyses de première ligne sont présentées dans le tableau 10 celles identifiées par NGS dans la figure 30 et dans le tableau 1 en annexe.

Parmi les 69 mutations identifiées par analyse moléculaires de première ligne, 43 ont eu également une analyse par NGS ADN, dont les résultats étaient concordants à 100%.

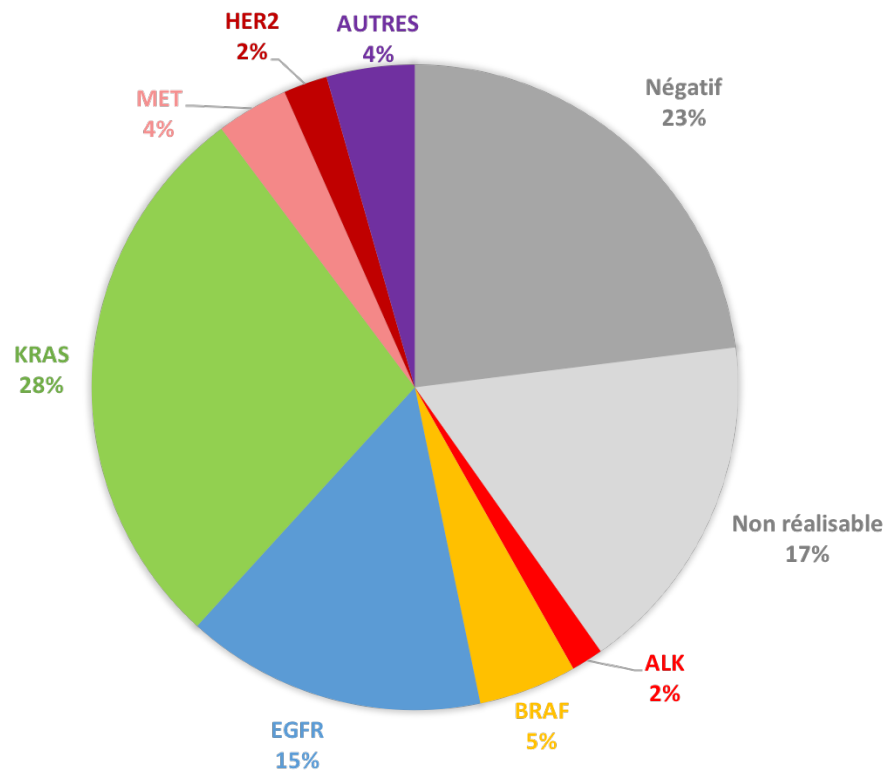


Figure 30 : Résultats de l'analyse NGS ADN réalisée sur 302 CBNPC non-épidermoïdes diagnostiqués par minisonde. (NB : il s'agit ici de mutations du gène *ALK* et non des translocations qui sont mises en évidence par IHC).

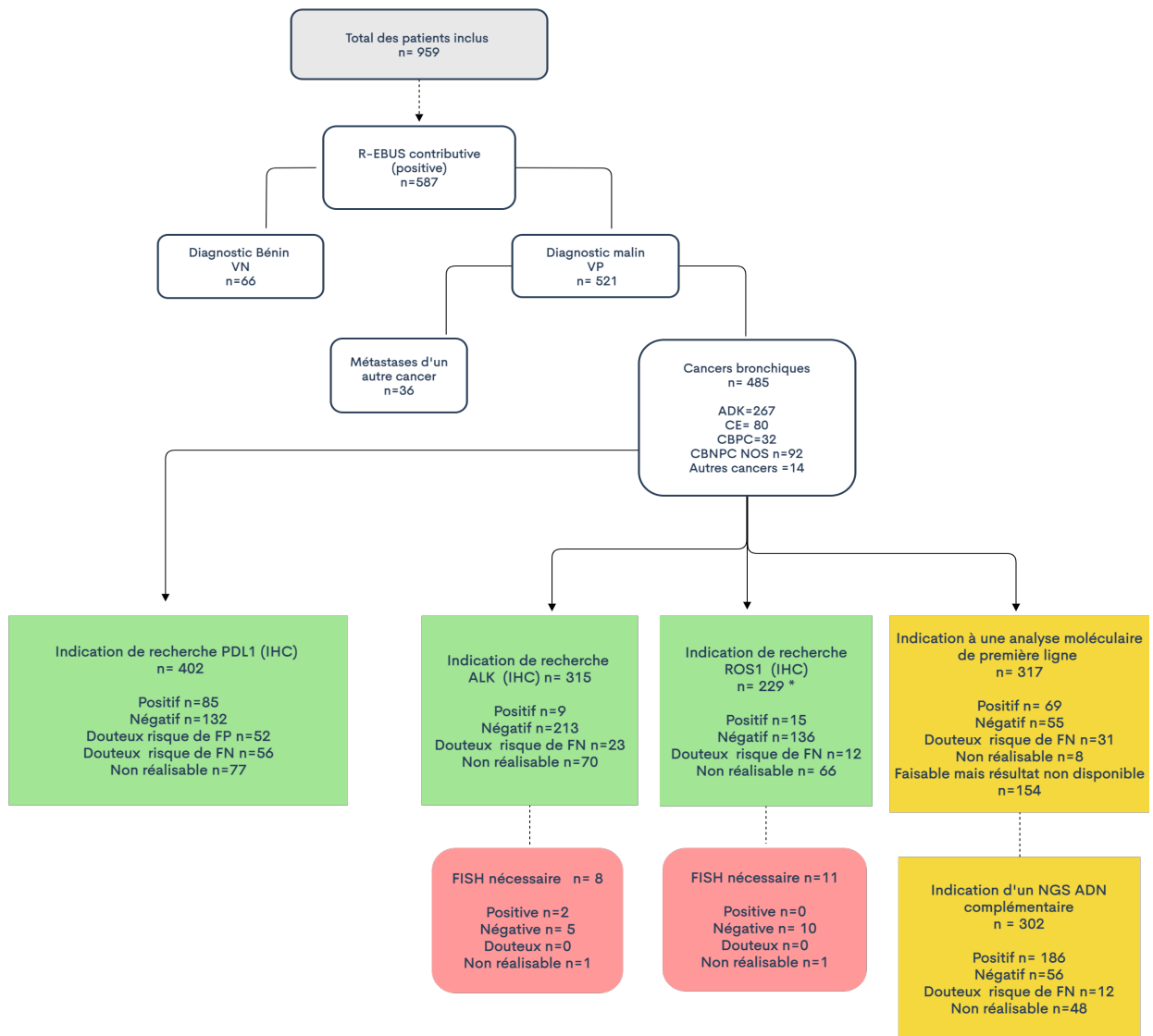


Figure 31 : Possibilité de réaliser les analyses moléculaires IHC= immunohistochimie
FISH = histochimie par fluorescence in situ VN= vrai négatif, VP =vrai positifs
NOS = not otherwise specified (cancer bronchique indéterminé).

Soixante-et onze prélèvements cytologiques (brosse et rinçage de cathéter) ont permis de conclure à un diagnostic de CBNPC alors que les biopsies étaient négatives ou inexistantes. Les analyses en IHC n’ont jamais pu être réalisées sur ces prélèvements. Une analyse moléculaire de première ligne a pu être faite dans 46/48 (95,7%) des cas où elle était pertinente. Une analyse par NGS était indiquée pour 43 patients et a pu être réalisé dans 37/43 (86%) des cas.

IV. Concordance de la mesure d'expression de PD-L1 sur biopsies bronchiques par mini-sonde et sur pièce opératoire

1. Fiabilité de l'expression de PDL1 sur les biopsies

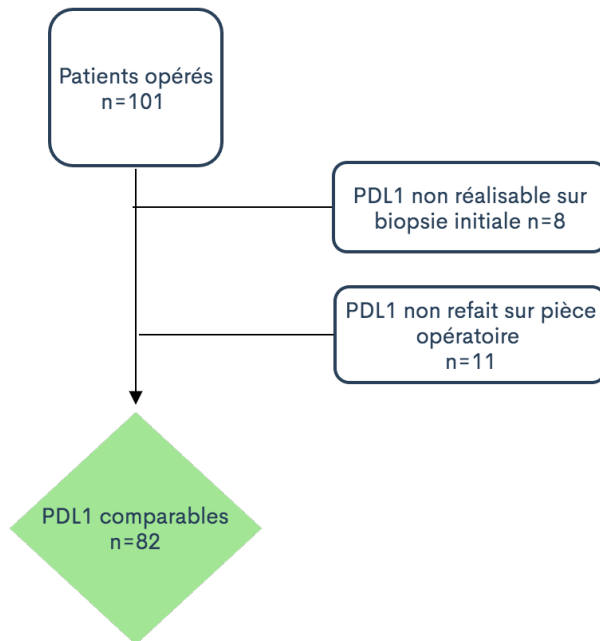


Figure 32 : Nombre de patients comparables pour l'expression de PDL1 sur biopsies par mini-sonde versus sur pièce opératoire.

			Expression de PD-L1 mesurée sur pièce opératoire			Total
			0%	1-49%	> 50%	
Expression de PD-L1 mesurée sur biopsie par mini-sonde	0%	Effectif	35	15	1	51
		% du total	42,7%	18,3%	1,2%	62,2%
	1-49%	Effectif	6	7	2	15
		% du total	7,3%	8,5%	2,4%	18,3%
	> 50%	Effectif	0	3	13	16
		% du total	0,0%	3,7%	15,9%	19,5%
Total		Effectif	41	25	16	82
		% du total	50,0%	30,5%	19,5%	100,0%

Tableau 12 : Concordance entre l'expression de PD-L1 mesurée sur biopsie obtenue par mini-sonde et sur pièce opératoire.

La concordance entre les seuils d'expression de PD-L1 (3 seuils cliniquement pertinent : <1%, 1 à 49% et $\geq 50\%$) sur biopsie par MNS et sur pièce opératoire a pu être réalisée dans notre étude pour 82 échantillons (Figure 32). Le résultat était identique pour 67,1 % des cas. L'expression de PD-L1 était sous-estimée pour 21,9% des cas et surestimé pour 11% des cas. Aucun des cas analysés comme PD-L1 $\geq 50\%$ sur biopsie par MNS n'était analysé comme PD-L1 négatif sur pièce opératoire. Un cas analysé comme PD-L1 négatif sur biopsie par MNS avait une expression $\geq 50\%$ sur la pièce opératoire. (Tableau 12).

V. Valeur prédictive du marquage de PD-L1 sur la réponse à l'immunothérapie

Treize patients pour lesquels la MNS avait porté un diagnostic de CBNPC avec PD-L1 $\geq 50\%$ ont reçu un traitement par Pembrolizumab en première ligne métastatique. Parmi les patients évaluables pour la réponse tumorale, le taux de réponse était de 5/12 (42%). La médiane de survie sans progression est de 540 jours (IC95% [0- 1168,457]), la médiane de survie globale de 662 jours (IC95 [467-857]). (Figure 33)

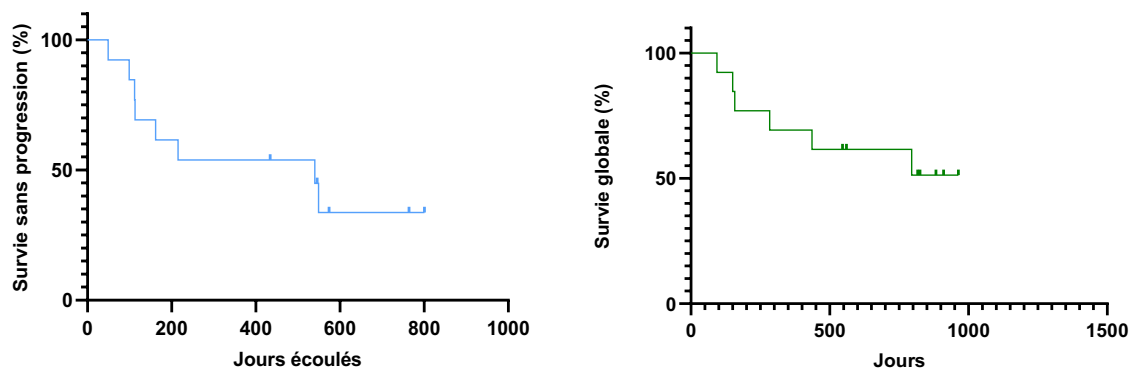


Figure 33 : Survie sans progression et survie globale des patients avec CBNPC stade IV, PDL1 $\geq 50\%$ ayant reçu un traitement par Pembrolizumab en 1ère ligne de traitement.

Cinquante huit patients atteint d'un CBNPC métastatique diagnostiqué par MNS ont reçu une immunothérapie en monothérapie, en deuxième ligne ou plus, quel que soit leur statut PDL1. Le taux de réponse était de 21,8 % (12/55). La médiane de survie sans progression était de 123 jours (IC95% [59-186]) et la médiane de survie globale de 562 jours (IC95% [490-633]). (Figure 34).

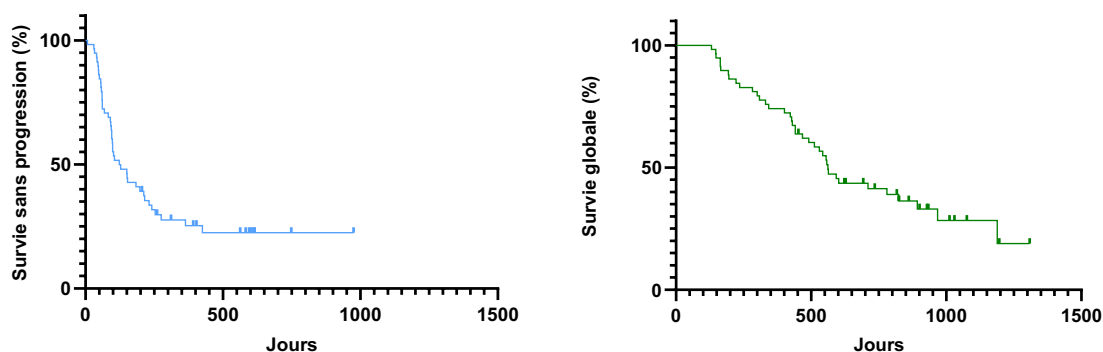


Figure 34 : Survie globale et sans progression des patients avec CBNPC stade IV diagnostiqué par MNS, quel que soit leur statut PD-L1 et ayant reçu une immunothérapie en monothérapie (hors Pembrolizumab première ligne chez les patients PDL1 \geq 50%).

DISCUSSION

La réalisation d'analyses complémentaires en immunohistochimie ou biologie moléculaire à la recherche d'expression de PD-L1 et de drivers oncogéniques est indispensable pour guider le traitement des CBNPC non opérables. Les avancées thérapeutiques récentes en particulier dans le domaine des thérapies ciblées exigent une connaissance précise du génome tumoral. La bronchoscopie par mini-sonde radiale (R-EBUS) par son faible coût, sa facilité d'utilisation et son faible taux de complication s'est rapidement imposée comme technique diagnostique majeure, en particulier pour les nodules pulmonaires périphériques.

Dans notre étude, le rendement diagnostique pour les pathologies malignes en R-EBUS est de 67%. Ces résultats sont comparables à ceux présentés dans une méta analyse récente où la sensibilité concernant 4605 lésions malignes était de 72,4%⁹⁰. Cette sensibilité est un peu moins bonne que dans certaines études plus récentes. Dans l'étude de Seong Mi moon *et al* la sensibilité diagnostique d'une pathologie maligne atteint 76%⁹⁶, mais les patients dont la lésion n'avait pas été visualisée en mini-sonde étaient exclus, tandis que nous les avons inclus dans notre analyse. Si nous excluons ces patients, la sensibilité dans notre étude s'élève à 77%.

Un facteur important pour l'amélioration de la rentabilité diagnostique est le nombre de biopsies réalisées. Ce nombre était en moyenne de 4,2 dans notre étude. De récentes recommandations européennes conseillent la réalisation de 10 biopsies au total dont 5 pour le diagnostic⁸⁴. Ce nombre paraît peu réalisable en pratique, en raison de l'allongement du temps de procédure et du risque de saignement. Néanmoins un objectif de réalisation de 6 à 8 biopsies pourrait être fixé.

Par ailleurs, la majorité des études portant sur la sensibilité de la mini-sonde ne compte comme faux négatifs que les patients ayant une preuve histologique de maladie cancéreuse, contrairement à notre étude où nous avons choisi d'inclure comme faux négatifs 37 patients sans preuve histologique formelle.

Comme expliqué plus haut, la gestion des prélèvements est cruciale pour optimiser leur utilisation en vue de l'analyse histologique et des analyses complémentaires par IHC et biologie moléculaire. La répartition des biopsies en 2 lots dès leur réalisation pourrait permettre d'améliorer leur utilisation en réalisant 2 blocs FFPE, le premier servant au diagnostic histologique et aux analyses en IHC, le second étant gardé en réserve pour l'analyse moléculaire.

L'originalité de notre étude réside sur le recueil de données de l'ensemble de biomarqueurs sur un même prélèvement de petite taille alors que la plupart des études ne relèvent que la possibilité de réaliser un ou deux techniques au plus^{93,24,99}. Dans notre étude, tous les biomarqueurs pertinents pour un prélèvement donné ont pu être déterminés avec succès pour 191 patient parmi les 253 patients atteint d'un adénocarcinome bronchique.

La recherche de l'expression de PD-L1 était réalisable dans 80% des cas. Une étude menée par l'équipe de Tsunoda¹⁰⁴ *et al* incluant 84 CBNPC diagnostiqués par R-EBUS retrouvait un taux de faisabilité de la recherche d'expression de PD-L1 de 87%. Notre résultat un peu inférieur peut s'expliquer par le fait que nous avons considéré que la recherche d'expression de PD-L1 était pertinente y compris pour des prélèvements de valeur cytologiques, comportant très peu de cellules tumorales. Si l'on se limite aux prélèvements biopsiques pour lesquels un diagnostic de certain de CBNPC était rapporté, le taux de faisabilité de la recherche d'expression de PD-L1 était de 92% dans notre étude.

Dans notre étude, l'expression de PD-L1 était <1% dans 57,8% des cas, 1-49% pour 21% et ≥50% pour 21%. Cette répartition est globalement comparables à celle d'autres séries¹⁰⁵. En particulier, le pourcentage de spécimens avec expression de PD-L1≥50 % des cellules tumorales était similaire à celui rapporté dans l'essai clinique initial de phase 1 qui a formellement validé l'utilisation de l'expression de PD-L1 comme biomarqueur de la réponse clinique à l'inhibition de PD-1 dans les CBNPC (23 %) ¹⁰⁶.

La concordance entre la mesure d'expression de PD-L1 sur les biopsies réalisées par R-EBUS et cette même mesure réalisée sur une pièce opératoire, évaluée chez 82 patients était de 67%. On observe une tendance à la sous-estimation sur les petites biopsies par R-EBUS. Le niveau d'expression de PD-L1 était inchangé chez 6 des 7 patients ayant reçu une

chimiothérapie entre le prélèvement par r-EBUS et la chirurgie. Kitazono *et al*⁷⁷ ont rapporté un taux de concordance de 92% à partir de 79 échantillons réséqués chirurgicalement et appariés avec des biopsies, mais d'une part ces biopsies étaient réalisées par diverses techniques (dont biopsie bronchique standard, EBUS-TBNA et ponction transpariétale) et d'autre part le niveau d'expression de PD-L1 (1-49% versus $\geq 50\%$) n'était pas pris en compte dans l'évaluation du taux de concordance. Plus récemment, l'étude d'Ilie *et al.* retrouvait comme dans notre étude une tendance à la sous-estimation de l'expression de PD-L1 sur les prélèvements réalisés par R-EBUS¹⁰².

Ce point est particulièrement important pour les CBNPC de stade III non opérables, dans la mesure où, dans certains pays européens, l'indication de l'immunothérapie de consolidation par Durvalumab après radio-chimiothérapie est conditionnée à la mise en évidence d'un niveau d'expression de PD-L1 $\geq 1\%$. Récemment, une prise en charge à titre dérogatoire a été autorisée en France, permettant de proposer ce traitement même en l'absence d'expression de PD-L1 ou dans les cas où celle-ci n'aurait pas pu être déterminée.

La même difficulté pourrait se poser dans les années qui viennent pour les CBNPC opérables qui seraient éligibles à un traitement néo-adjuvant et/ou adjuvant incluant une immunothérapie. En effet les résultats préliminaires de l'essai Impower 010, évaluant l'Atézolizumab en situation adjuvante dans le CBNPC de stade IB-IIIa montrent un effet bénéfique du traitement uniquement en cas d'expression de PD-L1 $\geq 1\%$. Dans ce cadre et au vu des résultats de notre étude, une évaluation de l'expression de PD-L1 sur la pièce opératoire sera nécessaire dans les cas où cette expression était nulle sur les biopsies réalisées par R-EBUS avant la chirurgie. En situation néo-adjuvante, le conditionnement des futures indications d'immunothérapie à un niveau d'expression de PD-L1 est encore incertain.

Parmi les 13 patients avec un PD-L1 $\geq 50\%$ sur les biopsies réalisées par R-EBUS et ayant reçu un traitement par Pembrolizumab en première ligne métastatique, la médiane de survie globale était de 21,7 mois (IC95 [15,3-28,1]), similaire à celle rapportée dans l'étude Keynote 024⁶³ évaluant le Pembrolizumab en première ligne chez les patients PDL1 > 50% (26,3 mois, IC95 [18,3-40,4]) et à celle rapportée dans les études de « vie réelle » en dehors d'essais cliniques (par exemple 15,8 mois dans l'étude Danoise¹⁰⁷ 17,8 mois dans l'étude Japonaise¹⁰⁸). L'observation d'un résultat clinique similaire à celui attendu conforte la fiabilité de l'analyse du niveau d'expression de PD-L1 sur les prélèvements réalisés par R-EBUS. Ceci est important car une étude a montré que les résultats cliniques pouvaient différer en fonction du site tumoral sur lequel les biopsies ayant permis l'analyse d'expression de PD-L1 sont réalisées.

Ainsi le niveau d'expression de PD-L1, lorsqu'il est analysé à partir de biopsies osseuses ou ganglionnaires a une valeur prédictive de la réponse au traitement par immunothérapie inférieure à ce niveau lorsqu'il est analysé à partir de biopsies de la tumeur primitive. Dans notre étude, il semble que la valeur prédictive du niveau d'expression de PD-L1 \geq 50% sur la réponse à l'immunothérapie soit préservée.

Concernant les analyses par biologie moléculaire, elles ont été réalisables dans 97% des cas pour les techniques de première intention et 83% des cas pour le NGS ADN. Ces résultats sont tout à fait comparables aux études qui retrouvent un taux d'échec de réalisation du NGS autour de 20%^{109,110}. Quand le NGS était positif, le pourcentage des principaux drivers oncogéniques était comparable à celui attendu dans une population de patients majoritairement caucasiens atteints de CBNPC non épidermoïdes⁴⁰.

Un épuisement du matériel tumoral a empêché la réalisation du NGS chez 26% des patients pour qui les techniques de biologie moléculaire de première intention avaient été contributives. Ce chiffre peut nous questionner sur la stratégie à adopter. Pourquoi ne pas réaliser en premier lieu un NGS afin d'obtenir en une seule analyse l'ensemble des marqueurs d'intérêt ? D'une part nous ne savons pas si une telle approche permettrait d'obtenir un résultat dans >95% des cas comme c'est le cas avec les techniques que nous appliquons en première intention actuellement, et d'autre part se poserait le problème du délai avant l'obtention des résultats nécessaires à la décision thérapeutique de première ligne, vraisemblablement plus long en NGS.

Concernant la possibilité d'analyse sur des prélèvements cytologiques obtenu par mini-sonde, la biologie moléculaire pouvait être réalisée dans 95,7% par les techniques de première intention, et dans 83% par NGS dans un second temps. Ces résultats sont en accord avec l'étude de Tsai *et al*¹⁰¹ où la recherche d'EGFR était possible dans 95% des cas (80/84) ou celle de Sanchez *et al*⁹⁹ où elle possible dans 100% des cas. Ces résultats confirment l'intérêt de la réalisation de prélèvements cytologiques (brosse, aspiration de cathéter) ajoutés aux biopsies.

L'originalité de notre étude résulte dans la précision des résultats de chaque analyse. En effet, il reste souvent peu de matériel après les premières analyses diagnostiques histologiques sur de petits prélèvements bronchiques comme ceux effectués en R-EBUS. Cette faible cellularité tumorale est responsable de cas de faux négatifs voire de faux positif pour l'expression de PD-L1 notamment. De nombreuses recommandations sont parues afin d'établir des seuils reflétant la fiabilité des résultats. Eberhard *et al.* ont suggéré que la surface de section de la tumeur devait être de 1-2 mm,¹¹¹ de plus, en terme de nombre de cellules, >100 noyaux de

cellules tumorales doivent être évalués pour réaliser une FISH¹¹¹ ou pour la recherche de PD-L1 en IHC⁸⁰. *Lindeman et al.* ont recommandé que les cellules mutées constituent 20% de toutes les cellules lorsque les statuts de mutation de l'*EGFR* et de translocation de l'*ALK* sont évalués⁷³. En se basant sur la conclusion subjective de l'anatomopathologiste ou sur des critères objectifs (nombre de cellule tumorale analysable, nombre de cellules tumorales mutées) nous avons pu classer précisément les résultats des analyses contrairement à beaucoup d'études qui donnent les résultats de façon binaire.

La principale limite de notre étude est liée à son caractère rétrospectif. Cela est responsable d'un nombre important de biais en particulier pour certaines données scannographiques, manquantes pour un grand nombre de patients. Nous avons dû exclure des analyses de sensibilité les patients pour qui la mini-sonde était non contributive et pour lesquels aucun diagnostic n'avait pu être déterminé au cours du suivi ultérieur. Il s'agissait principalement de patients provenant de centres éloignés pour lesquels les données de suivi étaient parcellaires

De nombreuses pistes sont en cours d'étude afin **d'optimiser l'analyse des petits prélèvements bronchiques au laboratoire.**

La microdissection permet, sous contrôle de la vue et de l'expertise du pathologiste, de sélectionner une population ou une région cellulaire d'intérêt sur un prélèvement tissulaire afin de réaliser des analyses moléculaires sur le matériel biologique extrait.¹¹²

Pouvant être réalisé manuellement ou par laser, elle aurait un réel intérêt en cas de faible cellularité tumorale sur des prélèvements de petite taille afin de s'affranchir de l'hétérogénéité cellulaire caractérisant les tissus cancéreux¹¹³. Son avantage est donc double, diminuer la quantité de matériel prélevé et améliorer nettement la qualité de ce dernier. Cette technique à l'inconvénient d'allonger le temps d'analyse au laboratoire qui doit être le plus court possible afin de ne pas retarder la prise en charge.

Une autre piste consisterait à découper le bloc de paraffine original d'emblée en multiples lames. Cette technique permet indéniablement une épargne de matériel tissulaire par rapport au retraitement du bloc après obtention du diagnostic. Cependant, cette économie tissulaire se fait au dépens d'une bonne conservation des acides nucléiques et peut compromettre la réalisation d'analyses moléculaires ultérieures¹¹⁴.

Dans certains cas, lorsque le bloc tissulaire est épuisé, l'analyse moléculaire pourrait être réalisée à partir de lames faiblement colorées ayant servi pour les analyses en IHC. Ces lames seraient préalablement numérisées pour archivage. Les premières lames utilisées pour le diagnostic sont colorées avec de l'HES connu pour altérer l'ADN¹¹⁵, une analyse moléculaire secondaire est donc impossible sur ces dernières.

L'endoscopiste a également un rôle clé à jouer. Les biopsies quand elles sont assez nombreuses pourraient être disposées directement dans plusieurs pots d'analyses afin de permettre la réalisation de deux blocs de paraffine par la suite au laboratoire ce qui permet une meilleure conservation des acides nucléiques.

Quand les biopsies tissulaires sont insuffisantes une alternative pourrait être les **biopsies liquides**. Ce terme générique correspond à un ensemble de prélèvements non invasifs le plus souvent fait au niveau sanguin qui permettent d'étudier des éléments tumoraux qui auraient été relargués dans la circulation sanguine. Il peut s'agir de cellules tumorales entières (cellules tumorales circulantes), d'ADN (ADN tumoral circulant) d'ARN (micro-ARN et messagers) ou encore de protéines. ^{116,117,118}. Ce patrimoine circulant pourrait être un meilleur reflet de l'agressivité et de l'évolutivité biologique de la tumeur comparée à une biopsie unique de petite taille ¹¹⁸.

Seul l'analyse de l'ADN circulant possède actuellement des indications en routine ^{119,120,121}. Si le nombre de paires de base détecté est suffisant (> 1000) la sensibilité peut atteindre 65% avec une excellente spécificité ¹²². La qualité des résultats dépend alors grandement de la quantité d'ADN tumoral extrait du plasma, sachant que cette quantité varie selon la masse et la vitesse de progression tumorale.

Une étude Chinoise menée par Li *et al* a étudié la faisabilité de recherche d'altérations moléculaires cibles sur de petits prélèvements bronchiques après un échec de NGS (qui concernait 20% des patients de la série). Il est retrouvé un bénéfice à la réalisation d'une recherche sur ADN tumoral circulant ou un enchaînement de ARM-PCR et IHC et FISH dans un second temps. Le taux de positivité d'altération moléculaire ciblable passait ainsi de 59,7% à 70% ¹²³.

N'importe quelle mutation de type insertion, délétion ou substitution peut être diagnostiquée, toutefois, tous les réarrangements comme ALK ou ROS1, ne peuvent être détectés en routine en raison notamment du trop grand nombre de variants. Deux indications sont validées actuellement :

- la recherche de mutations somatiques initiales lorsque le matériel tumoral tissulaire est insuffisant
- le diagnostic d'une mutation de résistance T790M dans l'exon 20 de l'EGFR en cas de progression tumorale sous traitement par TKI de première ligne chez les patients mutés EGFR. ¹²⁴

Le risque de faux négatif est tout de même important et en cas de négativité une biopsie tissulaire doit être obtenue. ¹²²

Ces analyses ont un rôle très important à jouer à l'avenir afin de se substituer au génotypage tissulaire en cas de petits prélèvements, ou pour éviter la réalisation itérative de prélèvements semi-invasifs au cours de la prise en charge. Elles ont également une action complémentaire en cas d'hétérogénéité tumorale spatiale pour détecter de mutations parfois absentes de la zone tissulaire biopsiée.

En conclusion, le diagnostic de cancer broncho-pulmonaire suivi de la recherche de l'expression de PD-L1 ainsi que celle d'altérations moléculaires semble entièrement réalisable et fiable sur de petits prélèvements bronchiques obtenu par écho-endoscopie radiale par mini-sonde. Il convient d'attirer l'attention sur le fait que les prélèvements cytologiques peuvent également être très pertinents pour réaliser certaines techniques de biologie moléculaire consommatrices de matériel tumoral et qu'il ne faut pas les négliger. De nombreuses pistes sont en cours d'étude afin d'optimiser le diagnostic de cancers bronchiques par voie endoscopique ainsi que l'analyse des prélèvements au laboratoire. La recherche d'altérations moléculaires par biopsies de liquide semble très prometteuse en complément des techniques de biopsies classiques.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2018;68(6):394-424.
2. Agents Classified by the IARC Monographs, Volumes 1–128 – IARC Monographs on the Identification of Carcinogenic Hazards to Humans. Accessed January 18, 2021.
3. SPF. Survie des personnes atteintes de cancer en France métropolitaine 1989-2018 - Poumon. Accessed January 15, 2021
4. Goldstraw P, Chansky K, Crowley J, et al. The IASLC Lung Cancer Staging Project: Proposals for Revision of the TNM Stage Groupings in the Forthcoming (Eighth) Edition of the TNM Classification for Lung Cancer. *J Thorac Oncol.* 2016;11(1):39-51.
5. SPF. Estimations nationales de l'incidence et de la mortalité par cancer en France métropolitaine entre 1990 et 2018 - Tumeurs solides : Étude à partir des registres des cancers du réseau Francim. Accessed January 15, 2021.
6. Andler R, Guignard R, Spilka S, et al. [Smoking and vaping in France]. *Rev Mal Respir.* 2018;35(6):673-685.
7. Khuder SA. Effect of cigarette smoking on major histological types of lung cancer: a meta-analysis. *Lung Cancer.* 2001;31(2-3):139-148.

8. Walters S, Maringe C, Coleman MP, et al. Lung cancer survival and stage at diagnosis in Australia, Canada, Denmark, Norway, Sweden and the UK: a population-based study, 2004-2007. *Thorax*. 2013;68(6):551-564.
9. Grivaux M, Locher C, Bombaron P, et al. [Study KBP-2010-CPHG: inclusion of new cases of primary lung cancer diagnosed in general hospital pneumology departments between 1st January and 31 December 2010]. *Rev Pneumol Clin*. 2010;66(6):375-382.
10. Locher C, Debieuvre D, Coëtmeur D, et al. Major changes in lung cancer over the last ten years in France: the KBP-CPHG studies. *Lung Cancer*. 2013;81(1):32-38.
11. National Lung Screening Trial Research Team, Aberle DR, Adams AM, et al. Reduced lung-cancer mortality with low-dose computed tomographic screening. *N Engl J Med*. 2011;365(5):395-409.
12. National Lung Screening Trial Research Team. Lung Cancer Incidence and Mortality with Extended Follow-up in the National Lung Screening Trial. *J Thorac Oncol*. 2019;14(10):1732-1742.
13. de Koning HJ, van der Aalst CM, de Jong PA, et al. Reduced Lung-Cancer Mortality with Volume CT Screening in a Randomized Trial. *N Engl J Med*. 2020;382(6):503-513.
14. Couraud S, Cortot AB, Greillier L, et al. From randomized trials to the clinic: is it time to implement individual lung-cancer screening in clinical practice? A multidisciplinary statement from French experts on behalf of the French intergroup (IFCT) and the groupe d'Oncologie de langue française (GOLF). *Ann Oncol*. 2013;24(3):586-597.
15. Coureau G, Salmi LR, Etard C, Sancho-Garnier H, Sauvaget C, Mathoulin-Pélissier S. Low-dose computed tomography screening for lung cancer in populations highly exposed to tobacco: A systematic methodological appraisal of published randomised controlled trials. *Eur J Cancer*. 2016;61:146-156.
16. Leleu O, Vincent G, Auquier M, et al. Predictive factors for the participation of general practitioners in lung cancer screening by low-dose CT scan in the Somme department in northern France. *Respir Med Res*. 2020;77:95-99.
17. Rubins JB, Rubins HB. Temporal trends in the prevalence of malignancy in resected solitary pulmonary lesions. *Chest*. 1996;109(1):100-103. doi:10.1378/chest.109.1.100
18. Heerink WJ, de Bock GH, de Jonge GJ, Groen HJM, Vliegenthart R, Oudkerk M. Complication rates of CT-guided transthoracic lung biopsy: meta-analysis. *Eur Radiol*. 2017;27(1):138-148.
19. Tsukada H, Satou T, Iwashima A, Souma T. Diagnostic accuracy of CT-guided automated needle biopsy of lung nodules. *AJR Am J Roentgenol*. 2000;175(1):239-243.
20. Lim WH, Park CM, Yoon SH, et al. Time-dependent analysis of incidence, risk factors and clinical significance of pneumothorax after percutaneous lung biopsy. *Eur Radiol*. 2018;28(3):1328-1337.
21. Lee MH, Lubner MG, Hinshaw JL, Pickhardt PJ. Ultrasound Guidance Versus CT Guidance for Peripheral Lung Biopsy: Performance According to Lesion Size and Pleural Contact. *AJR Am J Roentgenol*. 2018;210(3):W110-W117.
22. Tomiyama N, Yasuhara Y, Nakajima Y, et al. CT-guided needle biopsy of lung lesions: a survey of severe complication based on 9783 biopsies in Japan. *Eur J Radiol*. 2006;59(1):60-64.
23. Hayama M, Izumo T, Matsumoto Y, Chavez C, Tsuchida T, Sasada S. Complications with Endobronchial Ultrasound with a Guide Sheath for the Diagnosis of Peripheral Pulmonary Lesions. *Respiration*. 2015;90(2):129-135.

24. Kim I, Eom JS, Kim AR, et al. Molecular analysis of small tissue samples obtained via transbronchial lung biopsy using radial probe endobronchial ultrasound. *PLoS One*. 2019;14(2):e0212672.
25. Baaklini WA, Reinoso MA, Gorin AB, Sharafkaneh A, Manian P. Diagnostic yield of fiberoptic bronchoscopy in evaluating solitary pulmonary nodules. *Chest*. 2000;117(4):1049-1054.
26. van 't Westeinde SC, Horeweg N, Vernhout RM, et al. The role of conventional bronchoscopy in the workup of suspicious CT scan screen-detected pulmonary nodules. *Chest*. 2012;142(2):377-384.
27. Steinfurt DP, Vincent J, Heinze S, Antippa P, Irving LB. Comparative effectiveness of radial probe endobronchial ultrasound versus CT-guided needle biopsy for evaluation of peripheral pulmonary lesions: a randomized pragmatic trial. *Respir Med*. 2011;105(11):1704-1711.
28. Hürter T, Hanrath P. Endobronchial sonography: feasibility and preliminary results. *Thorax*. 1992;47(7):565-567.
29. Chenna P, Chen AC. Radial probe endobronchial ultrasound and novel navigation biopsy techniques. *Semin Respir Crit Care Med*. 2014;35(6):645-654.
30. Ishida T, Asano F, Yamazaki K, et al. Virtual bronchoscopic navigation combined with endobronchial ultrasound to diagnose small peripheral pulmonary lesions: a randomised trial. *Thorax*. 2011;66(12):1072-1077.
31. Asano F, Eberhardt R, Herth FJF. Virtual bronchoscopic navigation for peripheral pulmonary lesions. *Respiration*. 2014;88(5):430-440. doi:10.1159/000367900
32. Gex G, Pralong JA, Combescure C, Seijo L, Rochat T, Soccac PM. Diagnostic yield and safety of electromagnetic navigation bronchoscopy for lung nodules: a systematic review and meta-analysis. *Respiration*. 2014;87(2):165-176.
33. Wang W, Yu L, Wang Y, et al. Radial EBUS versus CT-guided needle biopsy for evaluation of solitary pulmonary nodules. *Oncotarget*. 2018;9(19):15122-15131.
34. Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, 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(21):2129-2139.
35. Barlesi F, Mazieres J, Merlio J-P, et al. Routine molecular profiling of patients with advanced non-small-cell lung cancer: results of a 1-year nationwide programme of the French Cooperative Thoracic Intergroup (IFCT). *Lancet*. 2016;387(10026):1415-1426.
36. Herbst RS, Morgensztern D, Boshoff C. The biology and management of non-small cell lung cancer. *Nature*. 2018;553(7689):446-454.
37. Teixeira VH, Pipinikas CP, Pennycuick A, et al. Deciphering the genomic, epigenomic, and transcriptomic landscapes of pre-invasive lung cancer lesions. *Nat Med*. 2019;25(3):517-525.
38. Jackman D, Pao W, Riely GJ, et al. Clinical definition of acquired resistance to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 2010;28(2):357-360.
39. Solomon BJ, Cappuzzo F, Felip E, et al. Intracranial Efficacy of Crizotinib Versus Chemotherapy in Patients With Advanced ALK-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer: Results From PROFILE 1014. *J Clin Oncol*. 2016;34(24):2858-2865.
40. Barlesi F, Mazieres J, Merlio J-P, et al. Routine molecular profiling of patients with advanced non-small-cell lung cancer: results of a 1-year nationwide programme of the French Cooperative Thoracic Intergroup (IFCT). *Lancet*. 2016;387(10026):1415-1426.

41. Sharma SV, Bell DW, Settleman J, Haber DA. Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *Nat Rev Cancer*. 2007;7(3):169-181.
42. Pao W, Miller V, Zakowski M, et al. EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from “never smokers” and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(36):13306-13311.
43. Leduc C, Merlio JP, Besse B, et al. Clinical and molecular characteristics of non-small-cell lung cancer (NSCLC) harboring EGFR mutation: results of the nationwide French Cooperative Thoracic Intergroup (IFCT) program. *Ann Oncol*. 2017;28(11):2715-2724.
44. 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(8):2240-2247.
45. Soria J-C, Ohe Y, Vansteenkiste J, et al. Osimertinib in Untreated EGFR-Mutated Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*. 2018;378(2):113-125.
46. Soda M, Choi YL, Enomoto M, et al. Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature*. 2007;448(7153):561-566.
47. Solomon BJ, Mok T, Kim D-W, et al. First-line crizotinib versus chemotherapy in ALK-positive lung cancer. *N Engl J Med*. 2014;371(23):2167-2177
48. Shaw AT, Kim D-W, Nakagawa K, et al. Crizotinib versus chemotherapy in advanced ALK-positive lung cancer. *N Engl J Med*. 2013;368(25):2385-2394.
49. Wu Y-L, Lu S, Lu Y, et al. Results of PROFILE 1029, a Phase III Comparison of First-Line Crizotinib versus Chemotherapy in East Asian Patients with ALK-Positive Advanced Non-Small Cell Lung Cancer. *J Thorac Oncol*. 2018;13(10):1539-1548. doi:10.1016/j.jtho.2018.06.012
50. Gadgeel S, Peters S, Mok T, et al. Alectinib versus crizotinib in treatment-naive anaplastic lymphoma kinase-positive (ALK+) non-small-cell lung cancer: CNS efficacy results from the ALEX study. *Ann Oncol*. 2018;29(11):2214-2222.
51. Camidge DR, Dziadziuszko R, Peters S, et al. Updated Efficacy and Safety Data and Impact of the EML4-ALK Fusion Variant on the Efficacy of Alectinib in Untreated ALK-Positive Advanced Non-Small Cell Lung Cancer in the Global Phase III ALEX Study. *J Thorac Oncol*. 2019;14(7):1233-1243.
52. Camidge DR, Kim HR, Ahn M-J, et al. Brigatinib versus Crizotinib in ALK-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*. 2018;379(21):2027-2039.
53. Bergethon K, Shaw AT, Ou S-HI, et al. ROS1 rearrangements define a unique molecular class of lung cancers. *J Clin Oncol*. 2012;30(8):863-870.
54. Moro-Sibilot D, Cozic N, Pérol M, et al. Crizotinib in c-MET- or ROS1-positive NSCLC: results of the AcSé phase II trial. *Ann Oncol*. 2019;30(12):1985-1991.
55. Mazières J, Zalcman G, Crinò L, et al. Crizotinib therapy for advanced lung adenocarcinoma and a ROS1 rearrangement: results from the EUROS1 cohort. *J Clin Oncol*. 2015;33(9):992-999.
56. Planchard D, Besse B, Groen HJM, 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;17(7):984-993.
57. Schrock AB, Frampton GM, Suh J, et al. Characterization of 298 Patients with Lung Cancer Harboring MET Exon 14 Skipping Alterations. *J Thorac Oncol*. 2016;11(9):1493-1502.
58. Paik PK, Felip E, Veillon R, et al. Tepotinib in Non-Small-Cell Lung Cancer with MET Exon 14 Skipping Mutations. *N Engl J Med*. 2020;383(10):931-943.
59. Chen DS, Mellman I. Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle. *Immunity*. 2013;39(1):1-10.

60. Carbone DP, Reck M, Paz-Ares L, et al. First-Line Nivolumab in Stage IV or Recurrent Non–Small-Cell Lung Cancer. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa1613493>.
61. Brahmer J, Reckamp KL, Baas P, et al. Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Squamous-Cell Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*. 2015;373(2):123-135.
62. Borghaei H, Paz-Ares L, Horn L, et al. Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*. 2015;373(17):1627-1639.
63. Reck M, Rodríguez-Abreu D, Robinson AG, et al. Pembrolizumab versus Chemotherapy for PD-L1-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*. 2016;375(19):1823-1833
64. Zukin M, Barrios CH, Pereira JR, et al. Randomized phase III trial of single-agent pemetrexed versus carboplatin and pemetrexed in patients with advanced non-small-cell lung cancer and Eastern Cooperative Oncology Group performance status of 2. *J Clin Oncol*. 2013;31(23):2849-2853.
65. Paz-Ares L, Luft A, Vicente D, et al. Pembrolizumab plus Chemotherapy for Squamous Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*. 2018;379(21):2040-2051.
66. Herbst RS, Baas P, Kim D-W, et al. Pembrolizumab versus docetaxel for previously treated, PD-L1-positive, advanced non-small-cell lung cancer (KEYNOTE-010): a randomised controlled trial. *Lancet*. 2016;387(10027):1540-1550.
67. Atezolizumab for First-Line Treatment of Metastatic Nonsquamous NSCLC | NEJM. Accessed January 6, 2021.
68. Rittmeyer A, Barlesi F, Waterkamp D, et al. Atezolizumab versus docetaxel in patients with previously treated non-small-cell lung cancer (OAK): a phase 3, open-label, multicentre randomised controlled trial. *Lancet*. 2017;389(10066):255-265.
69. Antonia SJ, Villegas A, Daniel D, et al. Overall Survival with Durvalumab after Chemoradiotherapy in Stage III NSCLC. *N Engl J Med*. 2018;379(24):2342-2350.
70. Antonia SJ, Villegas A, Daniel D, et al. Durvalumab after Chemoradiotherapy in Stage III Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*. 2017;377(20):1919-1929.
71. Zhao Z, Gao Y, Xue Q, Gao S, He J. Safety and Efficacy of Neoadjuvant Immune Checkpoint Inhibitor Therapy in Patients with Resectable Non-small-Cell Lung Cancer: A Systematic Review. *Target Oncol*. 2021;16(4):425-434.
72. Wu Y-L, Herbst RS, Mann H, Rukazenzov Y, Marotti M, Tsuboi M. ADAURA: Phase III, Double-blind, Randomized Study of Osimertinib Versus Placebo in EGFR Mutation-positive Early-stage NSCLC After Complete Surgical Resection. *Clinical Lung Cancer*. 2018;19(4):e533-e536.
73. Lindeman NI, Cagle PT, Aisner DL, et al. Updated Molecular Testing Guideline for the Selection of Lung Cancer Patients for Treatment With Targeted Tyrosine Kinase Inhibitors: Guideline From the College of American Pathologists, the International Association for the Study of Lung Cancer, and the Association for Molecular Pathology. *J Mol Diagn*. 2018;20(2):129-159.
74. Rehman JA, Han G, Carvajal-Hausdorf DE, et al. Quantitative and pathologist-read comparison of the heterogeneity of programmed death-ligand 1 (PD-L1) expression in non-small cell lung cancer. *Mod Pathol*. 2017;30(3):340-349.
75. Kim S, Koh J, Kwon D, et al. Comparative analysis of PD-L1 expression between primary and metastatic pulmonary adenocarcinomas. *European Journal of Cancer*. 2017;75:141-149.
76. Haratake N, Toyokawa G, Tagawa T, et al. Positive Conversion of PD-L1 Expression After Treatments with Chemotherapy and Nivolumab. *Anticancer Res*. 2017;37(10):5713-

5717.

77. Kitazono S, Fujiwara Y, Tsuta K, et al. Reliability of Small Biopsy Samples Compared With Resected Specimens for the Determination of Programmed Death-Ligand 1 Expression in Non--Small-Cell Lung Cancer. *Clin Lung Cancer*. 2015;16(5):385-390.
78. Lantuejoul S, Adam J, Girard N, et al. Tests immunohistochimiques PD-L1 dans les cancers du poumon non à petites cellules : recommandations par le groupe PATTERN de pathologistes thoraciques. *Annales de Pathologie*. 2018;38(2):110-125.
79. Hirsch FR, McElhinny A, Stanforth D, et al. PD-L1 Immunohistochemistry Assays for Lung Cancer: Results from Phase 1 of the Blueprint PD-L1 IHC Assay Comparison Project. *Journal of Thoracic Oncology*. 2017;12(2):208-222.
80. Heymann JJ, Bulman WA, Swinarski D, et al. PD-L1 expression in non-small cell lung carcinoma: Comparison among cytology, small biopsy, and surgical resection specimens. *Cancer Cytopathol*. 2017;125(12):896-907.
81. Adam J, Le Stang N, Rouquette I, et al. Multicenter harmonization study for PD-L1 IHC testing in non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol*. 2018;29(4):953-958.
82. Beau-Faller M, Blons H, Domerg C, et al. A multicenter blinded study evaluating EGFR and KRAS mutation testing methods in the clinical non-small cell lung cancer setting--IFCT/ERMETIC2 Project Part 1: Comparison of testing methods in 20 French molecular genetic National Cancer Institute platforms. *J Mol Diagn*. 2014;16(1):45-55.
83. Drilon A, Wang L, Arcila ME, et al. Broad, Hybrid Capture-Based Next-Generation Sequencing Identifies Actionable Genomic Alterations in Lung Adenocarcinomas Otherwise Negative for Such Alterations by Other Genomic Testing Approaches. *Clin Cancer Res*. 2015;21(16):3631-3639.
84. Diagnostic procedures for non-small-cell lung cancer (NSCLC): recommendations of the European Expert Group. Accessed January 7, 2021.
85. Gellert AR, Rudd RM, Sinha G, Geddes DM. Fiberoptic bronchoscopy: effect of multiple bronchial biopsies on diagnostic yield in bronchial carcinoma. *Thorax*. 1982;37(9):684-687.
86. Planchard D, Popat S, Kerr K, et al. Metastatic non-small cell lung cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2018;29 Suppl 4:iv192-iv237.
87. Brunelli A, Charloux A, Bolliger CT, et al. ERS/ESTS clinical guidelines on fitness for radical therapy in lung cancer patients (surgery and chemo-radiotherapy). *Eur Respir J*. 2009;34(1):17-41.
88. Schiller JH, Harrington D, Belani CP, et al. Comparison of four chemotherapy regimens for advanced non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*. 2002;346(2):92-98.
89. Scagliotti GV, Parikh P, von Pawel J, et al. Phase III study comparing cisplatin plus gemcitabine with cisplatin plus pemetrexed in chemotherapy-naive patients with advanced-stage non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 2008;26(21):3543-3551.
90. Ali MS, Trick W, Mba BI, Mohananeey D, Sethi J, Musani AI. Radial endobronchial ultrasound for the diagnosis of peripheral pulmonary lesions: A systematic review and meta-analysis. *Respirology*. 2017;22(3):443-453.
91. Hsiao S-H, Chung C-L, Lee C-M, et al. Suitability of computed tomography-guided biopsy specimens for subtyping and genotyping of non-small-cell lung cancer. *Clin Lung Cancer*. 2013;14(6):719-725.
92. Solomon SB, Zakowski MF, Pao W, et al. Core needle lung biopsy specimens: adequacy for EGFR and KRAS mutational analysis. *AJR Am J Roentgenol*. 2010;194(1):266-

269.

93. Shiau CJ, Babwah JP, da Cunha Santos G, et al. Sample features associated with success rates in population-based EGFR mutation testing. *J Thorac Oncol.* 2014;9(7):947-956.
94. Tam AL, Kim ES, Lee JJ, et al. Feasibility of image-guided transthoracic core-needle biopsy in the BATTLE lung trial. *J Thorac Oncol.* 2013;8(4):436-442.
95. Guisier F, Salaün M, Lachkar S, et al. Molecular analysis of peripheral non-squamous non-small cell lung cancer sampled by radial EBUS. *Respirology.* 2016;21(4):718-726.
96. Sm M, J C, Bh J, et al. Diagnostic Performance of Radial Probe Endobronchial Ultrasound without a Guide-Sheath and the Feasibility of Molecular Analysis. Tuberculosis and respiratory diseases.
97. Oki M, Yatabe Y, Saka H, et al. Feasibility and accuracy of molecular testing in specimens obtained with small biopsy forceps: comparison with the results of surgical specimens. *Respiration.* 2015;89(3):235-242
98. Ellison G, Zhu G, Moulis A, Dearden S, Speake G, McCormack R. EGFR mutation testing in lung cancer: a review of available methods and their use for analysis of tumour tissue and cytology samples. *Journal of Clinical Pathology.* 2013;66(2):79-89.
99. Sánchez-Font A, Chalela R, Martín-Ontiyuelo C, et al. Molecular analysis of peripheral lung adenocarcinoma in brush cytology obtained by EBUS plus fluoroscopy-guided bronchoscopy. *Cancer Cytopathol.* 2018;126(10):860-871.
100. Yu K-L, Tsai T-H, Ho C-C, et al. The value of radial endobronchial ultrasound-guided bronchial brushing in peripheral non-squamous non-small cell lung cancer. *Sci Rep.* 2018;8(1):5837.
101. Tsai T-H, Yang C-Y, Ho C-C, et al. Multi-gene analyses from waste brushing specimens for patients with peripheral lung cancer receiving EBUS-assisted bronchoscopy. *Lung Cancer.* 2013;82(3):420-425.
102. Ilie M, Long-Mira E, Bence C, et al. Comparative study of the PD-L1 status between surgically resected specimens and matched biopsies of NSCLC patients reveal major discordances: a potential issue for anti-PD-L1 therapeutic strategies. *Ann Oncol.* 2016;27(1):147-153.
103. Li C, Huang C, Mok TS, et al. Comparison of 22C3 PD-L1 Expression between Surgically Resected Specimens and Paired Tissue Microarrays in Non-Small Cell Lung Cancer. *J Thorac Oncol.* 2017;12(10):1536-1543.
104. Tsunoda A, Morikawa K, Inoue T, et al. A prospective observational study to assess PD-L1 expression in small biopsy samples for non-small-cell lung cancer. *BMC Cancer.* 2019;19(1):546.
105. Wang S, Yu B, Ng CC, et al. The suitability of small biopsy and cytology specimens for EGFR and other mutation testing in non-small cell lung cancer. *Transl Lung Cancer Res.* 2015;4(2):119-125.
106. Garon EB, Rizvi NA, Hui R, et al. Pembrolizumab for the treatment of non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med.* 2015;372(21):2018-2028.
107. Cramer-van der Welle CM, Verschueren MV, Tonn M, et al. Real-world outcomes versus clinical trial results of immunotherapy in stage IV non-small cell lung cancer (NSCLC) in the Netherlands. *Sci Rep.* 2021;11(1):6306.
108. Tamiya M, Tamiya A, Hosoya K, et al. Efficacy and safety of pembrolizumab as first-line therapy in advanced non-small cell lung cancer with at least 50% PD-L1 positivity: a multicenter retrospective cohort study (HOPE-001). *Invest New Drugs.* 2019;37(6):1266-1273.

109. Turner SR, Buonocore D, Desmeules P, et al. Feasibility of endobronchial ultrasound transbronchial needle aspiration for massively parallel next-generation sequencing in thoracic cancer patients. *Lung Cancer*. 2018;119:85-90.
110. Al-Kateb H, Nguyen TT, Steger-May K, Pfeifer JD. Identification of major factors associated with failed clinical molecular oncology testing performed by next generation sequencing (NGS). *Mol Oncol*. 2015;9(9):1737-1743.
111. Eberhard DA, Giaccone G, Johnson BE, Non-Small-Cell Lung Cancer Working Group. Biomarkers of response to epidermal growth factor receptor inhibitors in Non-Small-Cell Lung Cancer Working Group: standardization for use in the clinical trial setting. *J Clin Oncol*. 2008;26(6):983-994.
112. Legrès L, Varna M, Bouhidel F, et al. Principe et applications de la microdissection laser en histopathologie. *Revue Francophone des Laboratoires*. 2010;2010(418):57-66.
113. Bertheau P, Meignin V, Janin A. [Microdissection on histologic and cytologic preparation: an approach to tissue heterogeneity]. *Ann Pathol*. 1998;18(2):110-119.
114. Thunnissen E, Kerr KM, Herth FJF, et al. The challenge of NSCLC diagnosis and predictive analysis on small samples. Practical approach of a working group. *Lung Cancer*. 2012;76(1):1-18.
115. Dejmek A, Zendehrokh N, Tomaszewska M, Edsjö A. Preparation of DNA from cytological material: effects of fixation, staining, and mounting medium on DNA yield and quality. *Cancer Cytopathol*. 2013;121(7):344-353.
116. Schwarzenbach H, Hoon DSB, Pantel K. Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nat Rev Cancer*. 2011;11(6):426-437.
117. Crowley E, Di Nicolantonio F, Loupakis F, Bardelli A. Liquid biopsy: monitoring cancer-genetics in the blood. *Nat Rev Clin Oncol*. 2013;10(8):472-484.
118. Levy B, Hu ZI, Cordova KN, Close S, Lee K, Becker D. Clinical Utility of Liquid Diagnostic Platforms in Non-Small Cell Lung Cancer. *Oncologist*. 2016;21(9):1121-1130.
119. Pailler E, Auger N, Lindsay CR, et al. High level of chromosomal instability in circulating tumor cells of ROS1-rearranged non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol*. 2015;26(7):1408-1415.
120. Pailler E, Adam J, Barthélémy A, et al. Detection of circulating tumor cells harboring a unique ALK rearrangement in ALK-positive non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 2013;31(18):2273-2281.
121. Breitenbuecher F, Hoffarth S, Worm K, et al. Development of a highly sensitive and specific method for detection of circulating tumor cells harboring somatic mutations in non-small-cell lung cancer patients. *PLoS One*. 2014;9(1):e85350.
122. Tissot C, Villar S, Olivier M, Couraud S. [Free circulating DNA as a tool for lung cancer patients management]. *Rev Pneumol Clin*. 2016;72(1):61-71.
123. Metastatic NSCLCs With Limited Tissues: How to Effectively Identify Driver Alterations to Guide Targeted Therapy in Chinese Patients - JTO Clinical and Research Reports.
124. Oxnard GR, Thress KS, Alden RS, et al. Association Between Plasma Genotyping and Outcomes of Treatment With Osimertinib (AZD9291) in Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol*. 2016;34(28):3375-3382.

ANNEXES

Classification histologique des carcinomes pulmonaires OMS 2015

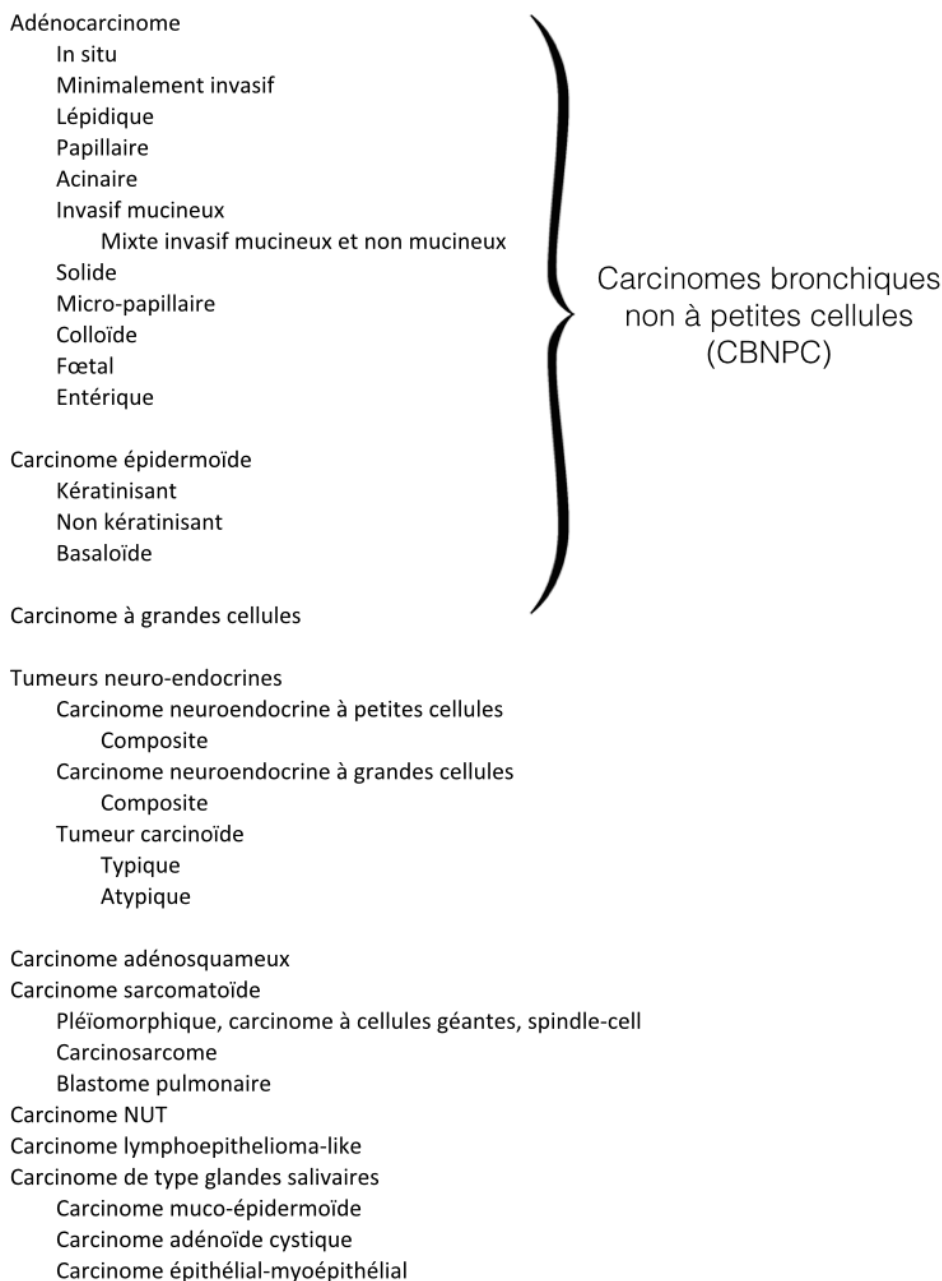


Figure 1 : Classification histologique des carcinomes pulmonaires (OMS 2015)

Mutations	n=
EGFR	43
- <i>ex 18</i>	3
- <i>ex 19</i>	23
- <i>ex 20</i>	3
- <i>ex 21</i>	14
KRAS	87
BRAF	15
ERBB2/HER2	7
ALK	5
CDKN2A	13
DDR2	15
ERB4	2
HIST1H3B	3
KIT	3
MAP	2
MET	11
PIK3R1	11
PTEN	4
STK11	45
CTNNB1	6
IDH1	2
FGFR2	1
H3F3A	1

Tableau 1 Résultat des mutations mise en évidence par NGS ADN sur 302 patients atteint d'un CBNPC.

RESUME

Introduction – L'échoendoscopie radiale semble être l'une des meilleures approches diagnostiques pour l'exploration de nodules pulmonaires en particulier périphériques. La recherche de biomarqueurs prédictifs de la réponse aux thérapies ciblées ou de la réponse aux points de contrôles immunitaires est aujourd'hui indispensable pour tout diagnostic de cancer pulmonaire non à petite cellule à un stade avancé. Nous soutenons dans ce travail l'hypothèse que la recherche en immunohistochimie (IHC) et en biologie moléculaire (BM) de l'ensemble des biomarqueurs tumoraux est possible sur des prélèvements bronchiques de petites tailles prélevés par endoscopie bronchique avec repérage par mini-sonde.

Matériels et Méthodes – Tous les patients ayant eu une endoscopie bronchique avec repérage par mini-sonde pour exploration d'une opacité pulmonaire au CHU de Rouen entre janvier 2017 et décembre 2019 ont été inclus. La faisabilité de la recherche des biomarqueurs en IHC ou en BM était classée en quatre catégories (positif, négatif, douteux et impossible à réaliser par manque de matériel). Le critère de jugement principal était la possibilité de rechercher l'ensemble des biomarqueurs tumoraux sur des prélèvements bronchiques réalisés par fibroscopie par mini-sonde.

Résultats – Neuf cent cinquante-neuf patients ont été inclus. Un cancer bronchique a été diagnostiqué pour 445 patients. Une recherche de biomarqueurs était nécessaire pour au moins 402 d'entre eux. La recherche de PD-L1 a été contributive dans 80,8% des cas (dont 26,8% avec réserve). Les translocations ALK et ROS1 ont pu être recherchées en IHC pour respectivement 77,8% (dont 7,3% avec réserve) des cas et 71,2% (dont 5% avec réserve) des cas. La biologie moléculaire de première ligne et le NGS ADN étaient réalisables pour 97,5% (dont 9,8% avec réserve) et 84% (dont 4% avec réserve) des patients. La sensibilité de l'endoscopie par mini-sonde à effectuer un diagnostic de cancer était de 67%. La concordance de l'expression de PD-L1 en IHC entre une biopsie par mini-sonde et une pièce opératoire était de 67,1 %. Treize patients pour lesquels la MNS avait porté un diagnostic de CBNPC avec PD-L1 \geq 50% ont reçu un traitement par Pembrolizumab en première ligne métastatique. Le taux de réponse était de 42%. La médiane de survie sans progression est de 540 jours (IC95% [0-1168,457]), la médiane de survie globale de 662 jours (IC95 [467-857]).

Conclusion – Le diagnostic de cancer broncho-pulmonaire suivi de la recherche de l'expression de PD-L1 ainsi que celle d'altérations moléculaires semble entièrement réalisable et fiable sur de petits prélèvements bronchiques obtenus par écho-endoscopie radiale par mini-sonde.

Mots clés : *cancer bronchique non à petites cellules ; drivers oncogéniques ; inhibiteurs de check-point immunitaires ; thérapies ciblées ; immunothérapie anti-PD-1/PD-L1.*