جامعة سيدي محمد بن عبد الله بفاس
UNIVERSITÉ SIDI MOHAMED BEN ABDELLAH DE FES

كلية العلوم والتقنيات فاس
FACULTÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE FÈS

N° d'ordre : 20/2023

Centre des Etudes Doctorales : Sciences et Techniques et Sciences Médicales
Formation Doctorale : Sciences Médicales et Recherche Translationnelle
Discipline : Biologie
Spécialité* : Génétique / Biologie moléculaire
Laboratoire : Laboratoire médicale de recherche biomédicale et translationnelle

Thèse pour l'obtention de DOCTORAT

Les aspects morphologiques, immunohistochimiques et moléculaires du cancer bronchique non à petites cellules non épidermoïde

Préparée par : Mme Sara BOUKANSA

Soutenue le 20/03/2023 devant le jury :

Nom et Prénom	Grade	Etablissement	Qualité
Mohamed SMAHI	PES	Faculté de médecine et de pharmacie de Fès	Président
Nawfel MELLAS	PES	Faculté de médecine et de pharmacie de Fès	Rapporteur
Mehdi KARKOURI	PES	Faculté de médecine et de pharmacie de Casablanca	Rapporteur
Basma EL KHANOUSSI	PES	Faculté de médecine et de pharmacie de Rabat	Rapporteur
Mounia SERRAJ	PES	Faculté de médecine et de pharmacie de Fès	Examinateur
Badre Eddine ALAMI	Pr Agrégé	Faculté de médecine et de pharmacie de Fès	Examinateur
Zineb BENBRAHIM	Pr Agrégé	Faculté de médecine et de pharmacie de Fès	Examinateur
Laila BOUGUENOUCH	Pr Agrégé	Faculté de médecine et de pharmacie de Fès	Examinateur
Hinde EL FATEMI	PES	Faculté de médecine et de pharmacie de Fès	Directeur de thèse

Résumé de la thèse

Le cancer de poumon est le deuxième type de cancer le plus fréquent après le cancer du sein au Maroc. Au cours des 10 dernières années, différentes altérations moléculaires pilotes, responsables du développement des tumeurs pulmonaires dépendantes d'oncogènes, ont été identifiées, notamment dans le sous-groupe des patients atteints d'adénocarcinome. En parallèle de nombreux progrès ont été réalisés dans les stratégies thérapeutiques du CBNPC métastatique, en particulier le développement des thérapies ciblées. Cette thèse a pour objectif d'établir le profil moléculaire du CBNPC (les mutations EGFR et la translocation ALK), de dégager les caractéristiques des patients porteurs de ces anomalies moléculaires et de suivre leur évolution.

Il s'agit d'une étude prospective porté sur 302 patients atteints d'un CBNPC primitif. Les données cliniques et anatomopathologiques de chaque patient ont été obtenues à partir des dossiers médicaux et des dossiers publiés sur le serveur HOSIX de l'hôpital CHU Hassan II de Fès. La recherche de l'expression de la protéine de fusion ALK a été réalisée par immunohistochimie sur l'automate Ventana BenchMark à l'aide de l'anticorps (VENTANA anti-ALK (D5F3)) pour 69 cas. Après l'extraction d'ADN à partir du tissu fixé et inclus en paraffine, la détection de la mutation EGFR a été réalisée par PCR classique suivie du séquençage Sanger pour 155 cas, par une PCR en temps réel en utilisant le Kit therascreen EGFR RGQ PCR pour 152 cas et par pyroséquençage en utilisant le Kit therascreen EGFR Pyro pour 35 cas. Les résultats obtenus ont été analysés à l'aide du logiciel IBM SPSS Statistic 21.

Dans cette étude, la moyenne d'âge des patients inclus était de 60,34 ans. Une nette prédominance masculine a été observée avec un pourçentage de 72,8%. 59,60% des patients étaient des tabagiques chroniques dont la majorité étaient de sexe masculin. La plupart des patients 95,2% présentaient des métastases au moment du diagnostic. Dans notre série, 69 tumeurs sur 302 (22,8%) étaient EGFR muté. Une double mutation au niveau de deux exons différents d'EGFR a été révélée chez deux patients donc 71 mutations EGFR ont été détectée dans une série de 302 patients. Pour la distribution des mutations selon les exons, l'exon 19 représente l'exon le plus muté (71,83%) suivie de l'exon 21 (18,30%), l'exon 20 (8,45%) et

l'exon 18 (1,40%). La délétion E746_A750del au niveau de l'exon 19 était le type mutationnel le plus fréquent (33,8%) dans notre population. Les mutations communes du gène EGFR (del19 et L858R), représentaient (81,69%) de toutes les mutations. Les mutations rares représentaient un pourcentage de (18,3%). Dans notre série, les mutations du gène EGFR tendent à être plus fréquentes chez les femmes que chez les hommes (36,58 % contre 17,72%, p=0,001) et chez les non-fumeurs que chez les fumeurs (67,18% contre 32,22%, p<0,0001). Le sous-type histologique d'adénocarcinome pulmonaire a été réalisé chez 196 patients. Une corrélation significative a été observée entre les mutations EGFR et l'architecture acinaire et papillaire et une association négative avec le sous-type solide. Presque tous les patients (98%) dont les tumeurs étaient EGFR mutés présentaient une expression positive du TTF1. Dans cette étude, les résultats obtenus ont montré que, la présence d'une mutation EGFR était considéré comme un facteur de bon pronostic. La médiane de survie globale chez les cas avec EGFR muté était supérieure à celle du groupe WT. Dans notre série, 3 cas sur 69 ont été ALK réarrangés soit une fréquence de 4,34%. Les patients avec ALK positif étaient plus susceptibles d'être jeunes et de sexe féminin. Avec une différence proche de la signification (p=0,08), la fréquence des cas ALK transloqué était plus élevée chez les non-fumeurs. Aucune corrélation significative entre la présence d'une translocation ALK et les différents sous-types histologiques et immunohistochimiques d'adénocarcinome pulmonaire n'a été révélée. Aucune différence significative n'a été retrouvée pour la SG entre les groupes ALK positif et négatif, cependant le groupe ALK positif a présenté une médiane de survie globale de 15 mois et qui est inférieure à celle du groupe ALK négatif (21 mois).

Cette étude, a permis de de dégager les différents caractéristiques clinico-pathologiques, morphologiques et immunohistochimiques des patients EGFR muté et ALK réarrangé et d'identifier l'impact de ces deux altérations sur la survie des patients atteint d'un CBNPC dans le contexte Marocain.

Mots clés :

Cancer bronchique non à petites cellules, EGFR mutation, translocation ALK, séquençage Sanger, PCR en temps réel, pyroséquençage, région Nord-Est, Maroc.

Abstract

After breast cancer, lung cancer is the most common cancer in Morocco. During the last ten years, different driver molecular alterations causing the development of oncogene-dependent lung tumors have been identified, mainly in the subset of patients with adenocarcinoma. In parallel, many advances have been achieved in therapeutic strategies for metastatic NSCLC, including the development of targeted therapies. This thesis aims to define the molecular profile of NSCLC (EGFR mutations and ALK translocation), highlight the characteristics of patients with these molecular abnormalities, and follow their evolution.

A prospective study was conducted among 302 patients with primary NSCLC. The clinical and anatomopathological data of each patient were obtained from the medical records and the records published on the HOSIX server of the Hassan II Hospital of Fez. ALK fusion protein expression was performed using immunohistochemistry on the Ventana BenchMark machine using the antibody (VENTANA anti-ALK (D5F3)) for 69 cases. After DNA extraction from formalin fixed paraffin-embedded tissues, EGFR mutation detection was performed by Sanger sequencing for 155 cases, by real-time PCR using the therascreen EGFR RGQ PCR Kit for 152 cases, and by pyrosequencing using the therascreen EGFR Pyro Kit for 35 cases. The results obtained were analyzed using IBM SPSS Statistic 21 software.

In this study, the average age of the patients included was 60.34 years. A clear male predominance was observed with a percentage of 72.8%. 59.60% of the patients were chronic smokers, the majority of whom were males. Most of the patients (95.2%) had adanced disease at the time of diagnosis. In our series, 69 tumors out of 302 (22.8%) were EGFR mutated. A double mutation at two different exons of EGFR gene was found in two patients, so 71 EGFR mutations were detected in a series of 302 patients. For the distribution of mutations according to exons, exon 19 was the most mutated exon (71.83%) followed by exon 21 (18.30%), exon 20 (8.45%), and exon 18 (1.40%). The E746_A750del deletion at exon 19 was the most frequent mutational type (33.8%) in our population. Rare EGFR mutations accounted for a percentage of (18.3%). In our series, EGFR gene mutations tend to be more frequent in women than in men (36.58% vs. 17.72%, p=0.001) and in non-smokers than in smokers (67.18% vs. 32.22%, p<0.0001). Histological subclassification of lung ADC was

recorded for 196 patients. A significant correlation was observed between EGFR mutations and acinar and papillary major predominant subtypes and a negative association with the solid major pattern. Almost all patients (98%) with EGFR-mutated tumors had positive TTF1 expression. Our results showed that the presence of an EGFR mutation was considered a good prognostic factor. The median overall survival in cases with mutated EGFR was superior to that of the WT group. In our series, 3 cases out of 69 were ALK-rearranged (4.34%). ALK-positive patients were more likely to be young and female. With a difference close to significance (p=0.08), the frequency of ALK-rearranged cases was higher in non-smokers. No significant correlation between the presence of ALK rearrangement and the different histological and immunohistochemical subtypes of lung adenocarcinoma was revealed. No significant difference was found for OS between the ALK-positive and ALK-negative groups. However, the ALK-positive group had a median overall survival of 15 months, lower than that of the ALK-negative group (21 months).

This study allowed us to identify the clinicopathological, morphological, and immunohistochemical characteristics of EGFR-mutated and ALK-rearranged patients and, to define the impact of these alterations on the survival of patients with NSCLC in the Moroccan context.

Keywords :

Non-small cell lung cancer, EGFR mutation, ALK translocation, Sanger sequencing, real-time PCR, pyrosequencing, North-East region, Morocco.

Dédicaces

*A mon cher **Papa**, merci pour votre soutien sans faille, pour m'avoir poussée à affronter mes peurs et pour ne pas m'avoir laissé abandonner dans les moments difficiles. Vous avez toujours cru en moi. Je vous aime et ce travail n'aurait jamais vu le jour sans vous Papa. Merci pour tout.*

Remerciements :

A Madame le Professeur El Fatemi Hinde, Professeur d'enseignement supérieur à la faculté de Médecine et de Pharmacie de FES.

Un premier mot de gratitude est dû à mon directeur de thèse, professeur ***EL FATEMI HINDE***, pour son engagement dans ce travail de recherche sur le cancer de poumon. Elle m'a offert un repos clinique pour chaque difficulté et un mentorat engageant qui ne s'est jamais démenti depuis qu'elle m'a accueilli dans le laboratoire d'anatomie pathologique il y a près de six ans. Son expérience déroutante dans le choix de la bonne voie a été déterminante pour atteindre ce point. Elle m'a également inspiré une incursion intellectuelle dans les nombreuses profondeurs du profil moléculaire du cancer de poumon, ainsi qu'un retour sur le long chemin entre la science fondamentale et une meilleure santé.

Cher professeur, pour moi vous êtes un modèle à suivre dans ma carrière professionnelle.

Au président du jury,

Professeur Mohamed Smahi, Professeur de chirurgie thoracique à la faculté de Médecine et de pharmacie de Fès,

Je tiens à vous remercier chaleureusement mon Professeur de m'avoir fait l'honneur de présider ce jury de thèse. Soyez assuré de ma sincère reconnaissance et de mon plus profond respect.

Au Membres du jury,

Professeur Nawfel Mellas, Professeur d'oncologie médicale à la faculté de Médecine et de pharmacie de Fès,

Je tiens à vous remercier chaleureusement mon Professeur d'avoir accepté de faire partie de ce jury et de juger mon travail en tant que rapporteur. Soyez assurée de toute ma reconnaissance et de tout mon respect.

Professeur Karkouri Mehdi, Professeur d'anatomie pathologique à la faculté de médecine et de pharmacie de Casablanca,

Je vous remercie grandement Professeur d'avoir accepté de juger ce travail en tant que rapporteur. Je vous en suis très reconnaissante et soyez assurée de de mon plus profond respect.

Professeur El Khannoussi Basma, Professeur d'anatomie pathologique à la faculté de médecine et de pharmacie de Rabat,

Je vous remercie infiniment Professeur d'avoir accepté de juger ce travail en qualité de rapporteur. Soyez assuré de ma plus sincère reconnaissance et de mon plus profond respect.

Professeur Serraj Mounia, Professeur de pneumo-phtisiologie à la faculté de Médecine et de pharmacie de Fès,

Je vous remercie chaleureusement Mon professeur d'avoir accepté de juger ce travail en qualité d'examinatrice et pour le temps que vous avez consacré pour l'évaluation de ce travail. Soyez assuré de ma plus sincère reconnaissance et de mon plus profond respect.

Professeur Alami Badre Eddine, Professeur d'oncologie médicale à la faculté de Médecine et de pharmacie de Fès,

Je vous remercie chaleureusement cher professeur d'avoir accepté de juger ce travail en participant en qualité d'examinateur et pour le temps que vous avez consacré pour l'évaluation de ce travail. Soyez assuré de ma plus sincère reconnaissance et de mon plus profond respect.

Professeur Benbrahim Zineb, Professeur d'oncologie médicale à la faculté de Médecine et de pharmacie de Fès,

Je vous remercie grandement cher professeur de m'avoir fait l'honneur de juger ce travail en participant en qualité d'examinatrice et pour le temps que vous avez consacré pour l'évaluation de ce travail. Soyez assurée de toute ma gratitude, et ma reconnaissance la plus sincère et de tout mon grand respect envers vous.

Professeur Bouguenouch Laila, Professeur de génétique Médicale à la faculté de Médecine et de pharmacie de Fès,

Je vous remercie chaleureusement cher professeur d'avoir accepté de juger ce travail en participant en qualité d'examinatrice et pour le temps que vous avez consacré pour l'évaluation de ce travail. Soyez assurée de toute ma gratitude, et ma reconnaissance la plus sincère et de tout mon grand respect envers vous.

Un grand merci à tous les professeurs de l'unité anatomie pathologique *Pr* ***Chbani Laila,*** *Pr* ***Hammas Nawal et*** *Pr* ***Tahiri Laila*** pour leur aide et gentillesse. Qu'elles soient rassurées de toute ma profonde reconnaissance et de tout mon respect

Je remercie ***le centre American MOFFIT*** *et* ***le centre hospitalier universitaire Hassan II de Fès***, pour le support et le financement du projet de la recherche de la mutation EGFR dans notre contexte.

La présente thèse s'inscrit dans le cadre d'un projet intitulé « Fréquence de la mutation de l'Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) dans le cancer pulmonaire non à petites cellules non épidermoïde au Maroc », dont le promoteur est Moffit Cancer Center.

Je tiens à exprimer ma plus profonde gratitude envers : *Pr* ***Zineb Benbrahim*** et *Pr* ***Nawfel Mellas*** chefs du projet «Fréquence de la mutation de l'Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) dans le cancer pulmonaire non à petites cellules non épidermoïde au Maroc», pour leur vision, leur leadership et leur soutien indéfectible tout au long de cette étude. Leur expertise, leur persévérance et leur passion pour la recherche ont été une source d'inspiration pour moi et ont contribué grandement au succès de ce projet.

Je souhaite également remercier chaleureusement toute l'équipe de réunion de concertation pluridisciplinaire d'oncologie thoracique : *Pr* ***Zineb Benbrahim***, *Pr* ***Nawfel Mellas***, *Pr* ***Mounia Serraj***, *Pr* ***Bouchra Amara***, *Pr* ***Mohamed Smahi***, *Pr* ***Yassine Ouadnouni***, *Pr* ***Badr-Eddine Alami*** pour leur excellente collaboration et pour leur soutien tout au long de cette étude. Leurs conseils éclairés, leur disponibilité et leur expertise ont été d'une grande aide pour moi et ont grandement contribué à la qualité des résultats obtenus.

Je suis honorée d'avoir pu travailler avec des professionnels aussi compétents et dévoués. Leurs contributions ont été inestimables et ont permis de faire avancer la recherche en oncologie au Maroc. Je leur suis profondément reconnaissante et je leur exprime mon plus grand respect.

Je tiens à exprimer ma plus profonde gratitude envers *Pr* ***Laila Bouguenouch***. Sa grande expertise dans le domaine de génétique et biologie moléculaire et son soutien indéfectible ont été une source d'inspiration pour moi tout au long de cette étude. Sa disponibilité et sa patience pour répondre à mes questions ont grandement contribué à la qualité des résultats obtenus.

Un merci sincère à mon "*maestro* de paillasse", Dr ***Sanae El Bardai*** dont la vaste expérience post-doctorale a permis de surmonter le grand nombre des obstacles rencontrés dans le diagnostic moléculaire du cancer de poumon, qui n'auraient pas été surmontés sans ses efforts. Son exigence d'un travail de haut niveau et ses efforts incessants m'ont permis, d'apprécier la "science d'équipe" et de savoir quand et comment fixer mes propres objectifs.

Un grand merci à tous les résidents du laboratoire d'anatomie pathologique : ***Amal Douida, Asmae Mazti, Imane Gouzi, Imane fadllah, Amal Moadin, Rafiq Bentayeb, Sanae Ait Brahim, Sanae Mokran, Hasna, Meryem Zeryouhi, khawla*** **et** ***Souhayla***. Je vous souhaite une vie pleine de succès et de réussite.

Un grand Merci à toutes l'équipe des techniciens du service d'anatomie pathologique : Mr ***Aissaoui, Redouan, Nadia, Naziha, Meryem, Safae, Najoua, Ikram, Sara*** et à ***Mme Naima Bouguerine***, majore du service. Merci chers collègues pour votre soutien, aide, conseils et gentillesse.

Un grand merci à mes fantastiques amis : Mme ***Zakia Boujadi*** et Mlle ***Houda Tziouat***, secrétaires du service d'anatomie pathologique. J'ai toujours partagé avec vous des faits amusants et des histoires intéressantes. Merci pour votre diffusion continue de l'énergie positive.

Un grand merci à ***Fatimazehra Iben Ghazal*** et ***Tarik Fazazi,*** la secrétaire et le brancardier du service d'anatomie pathologique. Merci pour votre gentillesse, et surtout Tarik merci pour tous les efforts que tu as fournis chaque jour pour la recherche et la collecte des produits consommables et du matériel dont j'avais besoin.

Un grand merci à toute l'équipe de l'unité de génétique et oncogénétique : ***Said Tghanint, Meriem Abassi, Hanane Sayel, Ihssane el Bouchikhi, Oussama Kettani, Badr-Eddine Lmakhzan, Fatima Zohra Moufid, Ihsane El otmani, Khaoula Fizazi, Samira*** **et** ***Ikram***. J'ai partagé avec vous des moments inoubliables. Je vous remercie tous pour votre soutien et d'avoir créé un environnement de travail agréable et chaleureux.

Un merci chaleureux pour les doctorants et docteurs : ***Sara Louati, Nada Senhaji, Ghizlane Kouaiti, Salma El Hassouni, Lidya*** **et** ***Maha*** pour l'excellent environnement de travail que vous avez créé et pour vos réponses toujours utiles pour les différentes questions de laboratoire.

Un grand merci pour tous mes amis : ***Salma Gragui, Mohammed Ahagoud, Hanae Daha Belghiti, Haitham Lyoubi, Zineb Benaboud***, merci de m'aider à me concentrer sur d'autres choses que la thèse. Merci pour nos longues promenades et pour tous les bons moments qu'on a partagé.

Enfin, les bons scientifiques ont besoin d'un bon café et de collègues avec qui le partager. ***Fatima El Agy*** a été toujours sage et encourageante, Les PCRs et les séquençages

étaient très amusants et le laboratoire était un endroit plus chaleureux avec toi ma copine intime. Merci d'avoir fait de ces six dernières années une période incroyable de ma vie pleine d'amitié.

Le dernier mot est dû à ceux qui me sont les plus proches et les plus chères à mon cœur. La gratitude la plus sincère va à ***mon mari mes parents et mes sœurs*** qui ont eu la patience de m'écouter, me supporter et me soutenir tout au long de ces six ans.

Mes très chers parents, aucune dédicace, aucun mot ne pourrait exprimer à leur juste valeur la gratitude et l'amour que je vous porte. Vous m'avez toujours donné la force pour persévérer et prospérer dans la vie. Chaque ligne de cette thèse chaque mot et chaque lettre vous expriment la reconnaissance, le respect, l'estime et le merci d'être mes parents.

Mes sœurs, mille merci pour votre affection, votre aide et votre soutien qui ont marqué tous les stades de ma vie. Je vous remercie énormément et j'espère que vous trouverez dans cette thèse l'expression de mon affection pour vous. Je vous souhaite et vos enfants (***Adam et Nabae***) un avenir florissant et une vie pleine de bonheur. Que dieu vous protège.

Mon mari, c'était vraiment amusant qu'on partage la même situation, tous des thésards. Merci pour ton soutien, ta patience et l'intérêt que tu as toujours porter à l'égard de mes études. Merci pour ton aide autant pour la formation scientifique que pour le soutien moral.

Table de matière :

Introduction générale

Partie bibliographique :

I. Rappel histologique : 27
II. La carcinogénèse pulmonaire : 28
III. La pathogénèse du CBNPC : 29
IV. Le diagnostic positif du CBNPC : 32
IV.1 Clinique : 32
IV.2 Imagerie : 33
IV.3 Endoscopie : 35
IV.4 Anatomie pathologique : 35
IV.4.1 Classification histologique des adénocarcinomes pulmonaires : 35
IV.4.2 La démarche diagnostique anatomo-pathologique : 40
V. Testing moléculaire : 45
V.1 Thérapies : 45
V.2 Techniques moléculaires : 49
V.2.1 Séquençage Sanger : 50
V.2.2 PCR en temps réel : 50
V.2.3 Pyroséquençage : 51
V.2.4 Détection des fusions des gènes : 51
V.2.5 Le séquençage de nouvelle génération : 52
V.2.6 La biopsie liquide : 55
VI. Biomarqueurs : 59
VI.1 Le récepteur à l'EGF : 59
VI.1.1 Les voies de signalisation du récepteur à EGF : 60
VI.1.2 Dérégulation et la carcinogenèse du gène EGFR : 62
VI.1.3 Les mutations du gène EGFR : 63
VI.1.4 Mutations de résistance : 65
VI.2 Anaplastic Lymphoma Kinase (ALK) : 69
VI.2.1 Le rôle fonctionnel d'ALK : 70
VI.2.2 Activation physiologique du récepteur ALK : 70
VI.2.3 Translocation du gène ALK : 71
VI.2.4 Mutations de résistance : 76
VI.3 ROS1 : 77
VI.4 BRAF : 78

VI.5 NTRK : 79
VI.6 RET : 80
VI.7 MET : 81
VI.8 KRAS : 83
VI.9 HER2 : 85

Patients, Matériel et Méthode :

I. Méthodologie de la recherche bibliographique : 88
II. Patients : 89
II.1 Population de l'étude : 89
II.2 Type de l'étude : 89
II.3 Critères d'inclusion et d'exclusion : 89
II.4 Aspects Ethiques : 90
II.5 Données cliniques et anatomopathologiques des patients : 90
III. Etape pré-analytique : 91
III.1 Examen à l'état frais : 91
III.2 La fixation : 91
III.3 Examen macroscopique : 91
III.4 Prétraitement dans l'Histokinette : 91
III.5 Inclusion en paraffine : 92
III.6 Microtomie : 92
III.7 Coloration des coupes par Hématoxyline-Eosine-Safran (HES) : 93
III.8 Etude histologique et détermination du pourcentage de cellules tumorales : 94
IV. Etude immunohistochimique : 95
IV.1 Principe d'immunohistochimie : 95
IV.2 Détermination de l'expression de l'anticorps anti-ALK : 95
IV.2.1 Protocole expérimentale : 96
IV.2.2 Interprétation des lames : 96
V. Etude moléculaire : 97
V.1 Extraction d'ADN tumoral à partir du tissu fixé et inclus en paraffine : 97
V.1.1 Déparaffinage : 97
V.1.2 Lyse du tissu (digestion) : 97
V.1.3 Arrêt de la digestion et isolation d'ADN : 98
V.1.4 Lavage de l'ADN des contaminants résiduels : 98
V.1.5 Elution et quantification de l'ADN : 98
V.2 Dosage de l'ADN : 98

V.3 Recherche des mutations du gène EGFR : 99
V.3.1 Séquençage Sanger : 99
V.3.2 Techniques plus sensibles basé sur la PCR : 109
V.3.3 Pyroséquençage : 112
VI. Analyse statistique : 120
VI.1 Analyse descriptive : 120
VI.2 Etude analytique : 120
VI.3 Analyse de survie : 121

Résultats :

I. Analyse descriptive : 123
I.1 Description de la population de l'étude : 123
I.1.1 Schéma de l'étude : 123
I.1.2 Distribution des patients selon l'âge : 124
I.1.3 Distribution des patients selon le sexe : 124
I.1.4 Distribution des patients selon le statut tabagique : 125
I.1.5 Répartition selon la symptomatologie : 125
I.1.6 Répartition selon le type de prélèvement : 126
I.1.7 Répartition selon la technique de prélèvement : 126
I.1.8 Répartition selon le type de tumeur : 127
I.1.9 Répartition selon siège de la tumeur : 128
I.1.10 Répartition selon la taille de la tumeur primitif : 128
I.2 Aspect histologique de la tumeur : 129
I.2.1 Type histologique : 129
I.2.2 Répartition selon le sous type histologique : 129
I.2.3 Répartition selon l'atypie cellulaire : 130
I.2.4 Répartition selon le stroma réaction : 131
I.2.5 Répartition selon l'infiltration lymphocytaire : 131
I.2.6 Répartition selon la nécrose : 132
I.2.7 Répartition selon le stade : 132
I.2.8 Répartition selon les sites métastatiques : 133
I.3 Aspect immunohistochimique de la tumeur : 133
I.3.1 Le TTF1 : 133
I.3.2 La CK7 : 134
I.3.3 La P63 : 134
I.3.4 La P40 : 135

I.3.5 La CK5/6 : 135
I.3.6 La CK20 : 136
I.3.7 Anaplasic Lymphoma Kinase ALK : 136
I.4 Aspect moléculaire de la tumeur : 138
I.4.1 Pourcentage de cellules tumorales et concentration d'ADN : 138
I.4.2 Séquençage SANGER : 139
I.4.3 PCR en temps réel : 140
I.4.4 Pyroséquençage : 142
I.4.5 Comparaison entre les techniques moléculaires : 143
I.4.6 Fréquence des mutations EGFR dans toute la population : 144
I.4.7 Distribution selon les exons : 144
I.4.8 Sous-type mutationnel : 145
I.4.9 Fréquence des mutations rares : 147
II. Analyse de corrélation : 149
II.1 Analyse de corrélation entre les mutations EGFR et les différents paramètres clinicopathologiques et histologique : 149
II.1.1 Association entre les mutations EGFR et les paramètres clinicopathologiques : 149
II.1.2 Association entre les mutations EGFR et les paramètres histologiques de la tumeur : 152
II.1.3 Association entre les différents biomarqueurs moléculaires : 156
II.1.4 Comparaison des caractéristiques clinicopathogiques des patients avec exon 19Del et L858R : 157
II.1.5 Comparaison des caractéristiques clinicopathologiques des patients avec les mutations fréquentes et rares : 159
II.2 Analyse de corrélation entre le réarrangement ALK et les différents paramètres clinicopathologiques et histologiques : 161
III. Analyse de survie : 163
III.1 Survie globale et survie sans rechute : 163
III.2 Survie globale et facteurs Clinicopathologiques : 164
III.3 Survie globale et caractéristiques histologiques : 165
III.4 Survie globale et biomarqueurs moléculaires : 167
Discussion :
I. Epidémiologie du cancer de poumon : 171
II. Caractéristiques, clinique et histologique du CBNPC : 172
III. Caractéristiques moléculaires du CBNPC : 177
III.1 Testing EGFR : 177
III.1.1 Prévalence des mutations EGFR : 179

III.1.2 Sous-type mutationnel fréquent : 180
III.1.3 Mutation rare : 181
III.1.4 Corrélation entre les caractéristiques clinicopathologiques, survie et les mutations EGFR : 182
III.2 La translocation ALK : 188
III.2.1 Fréquence du réarrangement ALK : 188
III.2.2 Corrélation entre le réarrangement ALK et les caractéristiques clinicopathologiques et la survie des patients : 189

Liste des abréviations :

A
ADN : Acide désoxyribonucléotide
ADNfc : ADN libre circulant
ADNtc : ADN tumoral circulant
ALK : Lymphome Kinase Anaplasique
ARMS : amplification-Refractory Mutation System
ATP : Adénosine triphosphate
ATS : American Thoracic Society
B
BRAF : v-Raf murine sarcoma viral onco-gene homolog B
C
CHU : Centre Hospitalier Universitaire
CBNPC : Cancer Bronchique Non à Petites Cellules
CDKN2A : Cyclin Dependent Kinase inhibitor 2A
CP : Cancer de Poumon
CPC : Carcinome à Petites Cellules
CTLA-4 : Antigène associé aux lymphocytes T cytotoxiques-4
E
EGFR : Récepteur du facteur de croissance épidermique
ERS : European Respiratory Society
F
FDA : Food and Drug Administration
H
HER2 : Human epidermal growth factor receptor 2
HES : Hématxyline-Eosine-Safran
HLA-A : Human Leucocyte Antigen codés par le locus HLA-A
I
IASLC : International Association for the Study of Lung Cancer
IHC : Immunohistochimie
IRM : Imagerie par Résonance Magnétique
J
JAK-STAT : Janus Kinase- Signal Transducers and Activators of Transcription
K
KRAS : v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma
M
MAM : Meprin, A5 protein, and receptor protein tyrosine phosphatase
MAPK : Protéine Kinase activée par des Agents Mitogènes
MET : Mesenchymal-Epithelial Transition
MLL2 : Histone-Lysine N-Methyltransferase 2D
N
NCCN : National Comprehensive Cancer Network
NGS : Séquençage de nouvelle génération
NOS : Carcinome non à petites cellules Non Spécifié
NOTCH1 : Neurogenic locus notch homolog protein 1
NTRK : Neurotrophic Tyrosine Receptor Kinase
P
PCR : Réaction de Polymérisation en Chaine
PD-1 : Mort cellulaire programmée-1
PD-L1 : Ligand de la mort cellulaire programmée-1
PI3K : Phosphatidylinositol 3-Kinase
PLC : phospholipase C
PTEN : Phosphatase and Tensin Homolog
R

RAS-ERK : Ras-Extracellular signal-Regulated Kinase
RB1 : Rétinoblastome transcriptional corepressor 1
RET : Rearranged during Transfection
ROS1 : ROS proto-oncogène 1
S
SG : Survie Globale
SSR : Survie Sans Rechute
T
TDM : Tomographie assistée par ordinateur
TEP-CT : Tomographie par Emission de Positons
TNM : Tumeur, Ganglion et Métastase
W
WT : Wild Type

Liste des figures :

Figure 1 : Représentation schématique des différentes étapes de la carcinogenèse d'adénocarcinome pulmonaire [18] 29
Figure 2 : Adénocarcinome pulmonaire 30
Figure 3 : Carcinome épidermoïde 31
Figure 4 : Les principaux types histologiques de cancer du poumon 32
Figure 5 Taux de mutation distincts dans les sous-types invasifs d'adénocarcinome pulmonaire [38] 40
Figure 6 : Marquage immunohistochimique du facteur-1 de transcription de la thyroïde 41
Figure 7 : Marquage immunohistochimique de l'anticorps anti-CK7 42
Figure 8 : Marquage immunohistochimique de l'anticorps anti-P40 et anti-P63 42
Figure 9 : Algorithme pour le sous-typage histopathologique du CBNPC dans les petits échantillons biopsiques 43
Figure 10 : Approches utilisées par le pathologiste visant à éviter le gaspillage des tissus [44] 44
Figure 11 : Fréquence des facteurs oncogènes dans le CBNPC [63] 46
Figure 12 : Chronologie illustrant le développement des stratégies thérapeutiques du cancer de poumon non à petites cellules [62] 48
Figure 13 : 2022 paradigme de traitement du CBNPC avancés à biomarqueurs moléculaires positifs [67] 49
Figure 14 : Les étapes du séquençage nouvelle génération 52
Figure 15 : La technique NGS dans le cancer bronchique non à petites cellules 54
Figure 16 : Les options de dépistage moléculaire du cancer du poumon [83] 54
Figure 17 : Avantages et inconvénients de la biopsie liquide dans le diagnostic moléculaire du CBNPC 56
Figure 18 : Algorithme de test diagnostic potentiel pour le cancer de poumon non à petites cellules avancé intégrant la biopsie liquide 57
Figure 19 : Proposition d'algorithme pour l'analyse moléculaire du CBNPC dans la pratique de routine 58
Figure 20 : La structure du gène EGFR et les domaines protéiques qu'il code 60
Figure 21 : Les récepteurs de la famille HER/ERBB et ses ligands 61
Figure 22 : Les voies de signalisation clés activées par le récepteur à EGF 62
Figure 23: Mutation du domaine tyrosine kinase dans le CBNPC 64
Figure 24 : Localisation des différentes mutations EGFR et leur valeur prédictive de la réponse aux thérapies ciblées 65
Figure 25 : Mécanismes de résistance dépendants et indépendants d'EGFR 66
Figure 26 : Mécanisme d'action de l'amivantamab dans les insertions de l'exon 20 du récepteur à l'EGF 68
Figure 27 : Structure du récepteur ALK 70
Figure 28 : Le rôle de médiateur du gène (ALK) dans la signalisation par les voies PI3/AKT, RAS/MAPK, phospholipase Cy (PLCy) et Janus Kinase (JAK)-signal transducteur et l'activateur de transcription (STAT) 72
Figure 29 : La translocation ALK-EML4, illustrant la fusion de la partie aminoterminale d'EML4 avec la région codant pour le domaine tyrosine kinase du gène ALK 73
Figure 30 : Les différents variants du réarrangement ALK-EML4 74
Figure 31 : Voie d'activation de la translocation ALK-EML4 75
Figure 32 : Les mutations du domaine kinase du lymphome kinase anaplasique (ALK) 77
Figure 33 : CRF utilisé dans l'étude 90
Figure 34 : Appareil d'inclusion, laboratoire de pathologie moléculaire, CHU Hassan II de Fès 92

Figure 35 : Microtome, laboratoire de pathologie moléculaire, CHU Hassan II de Fès 93
Figure 36 : Appareil de coloration HES, laboratoire de pathologie moléculaire, CHU Hassan II de Fès 94
Figure 37 : Délimitation de la zone tumorale, laboratoire de pathologie moléculaire, CHU Hassan II de Fès 95
Figure 38 : Principe d'immunohistochimie 95
Figure 39 : Lame immunohistochimique d'un cas ALK négatif avec un témoin positif, laboratoire de pathologie moléculaire, CHU Hassan II de Fès 96
Figure 40 : Extraction d'ADN 97
Figure 41 : Qubit 3. Fluorometer 99
Figure 42 : Les étapes de la PCR 102
Figure 43 : Le Kit utilisé pour la PCR classique 103
Figure 44 : Programme de la PCR du gène EGFR, laboratoire de pathologie moléculaire, CHU Hassan II de Fès 104
Figure 45 : Migration sur gel d'agarose 2%, laboratoire de pathologie moléculaire, CHU Hassan II de Fès 105
Figure 46 : Produit utilisé pour la purification du produit PCR 106
Figure 47 : Séquenceur Applied Biosystems™ 3500 Dx, laboratoire de pathologie moléculaire, CHU Hassan II de Fès 107
Figure 48 : Electropherogramme, laboratoire de pathologie moléculaire, CHU Hassan II de Fès 107
Figure 49 : Analyse de séquence par BLASTn 108
Figure 50 : L'alignement de la séquence cible en correspondance avec les séquences similaires 109
Figure 51 : Sonde d'hybridation scorpion 110
Figure 52 : Thermocycleur de real-time PCR Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM, laboratoire de pathologie moléculaire, CHU Hassan II de Fès 111
Figure 53 : Principe du pyroséquençage 113
Figure 54 : Illustration du test EGFR 114
Figure 55 : La station PyroMark Q24, laboratoire de pathologie moléculaire, CHU Hassan II de Fès 117
Figure 56 : PyroMark Q24, laboratoire de pathologie moléculaire, CHU Hassan II de Fès 118
Figure 57 : Schéma de l'étude 123
Figure 58 : Les sous-types histologique d'adénocarcinome pulmonaire 130
Figure 59 : Coupe histologique d'un adénocarcinome pulmonaire représentant une atypie cellulaire sévère 131
Figure 60 : Coupe histologique d'un adénocarcinome pulmonaire représentant un infiltrat lymphocytaire dense 132
Figure 61 : Coupe histologique d'un adénocarcinome pulmonaire représentant une nécrose tumorale 132
Figure 62 : Expression de l'anticorps anti-ALK dans le cancer de poumon (a : x100 ; b : x400), laboratoire de pathologie moléculaire, CHU Hassan II de Fès 137
Figure 63 : Concentration d'ADN 139
Figure 64 : Electrophérogramme de la délétion E746_A750del 146
Figure 65 : Electrophérogramme de la mutation L858R 146
Figure 66 : Electrophérogramme de la mutation S768I 147
Figure 67 : Electrophérogramme de l'insertion D770_N771insG 147
Figure 68 : Survie globale et survie sans progression (mois) 163
Figure 69 : Survie globale en fonction des caractéristiques clinicopathologiques (a) l'âge, (b) le sexe, (c) le statut tabagique 164

Figure 70 : Survie globale en fonction des caractéristiques histologiques (a) sous-type acinaire, (b) sous-type papillaire, (c) sous-type solide, (d) sous-type mixte acinaire et papillaire, (e) sous-type mixte acinaire et solide 166
Figure 71 : Survie globale en fonction des caractéristiques histologiques (a) atypie cellulaire, (b) stroma réaction, (c) infiltrat lymphocytaire, (d) nécrose 167
Figure 72 : Survie globale en fonction de la présence de mutation EGFR (a) survie en fonction du statut EGFR (b) survie en fonction du type de mutation (c) survie des patients avec EGFR muté (d) survie des patients avec EGFR WT 168
Figure 73 : Survie globale en fonction de la présence d'un réarrangement ALK 169

Liste des tableaux

Tableau 1 : Huitième édition de la stadification TNM du cancer de poumon 34
Tableau 2 : Huitième édition de la stadification TNM du cancer de poumon 34
Tableau 3 : Classification des adénocarcinomes selon l'OMS 2021 36
Tableau 4 : Avantages et inconvénients de la technologie NGS 53
Tableau 5 : Séquences des couples d'amorces utilisées pour l'amplification par PCR du gène EGFR 100
Tableau 6 : Température adoptée pour chaque exon après la mise au point 101
Tableau 7 : Protocole de la PCR 103
Tableau 8 : Programme PCR de l'exon 18 - 21 du gène EGFR 103
Tableau 9 : Protocole de la réaction de séquence 106
Tableau 10 : Protocole de purification 106
Tableau 11 : Protocole de test de contrôle 111
Tableau 12 : Protocole des tests de mutation 112
Tableau 13 : Mix réactionnel pour la PCR 115
Tableau 14 : Programme de la PCR 115
Tableau 15 : Protocol d'immobilisation 116
Tableau 16 : Dilution des amorces de séquençage 116
Tableau 17 : LOB et LOD déterminé pour chaque mutation 119
Tableau 18 : Comparaison des techniques moléculaires 143
Tableau 19 : Sous-types mutationnels 145
Tableau 20 : Fréquence des mutations rares 148
Tableau 21 : Caractéristiques des cas EGFR muté 151
Tableau 22 : Association des différents biomarqueurs moléculaires 156
Tableau 23 : Caractéristiques clinicopathologiques des tumeurs avec délétion exon 19 et avec la mutation L858R 157
Tableau 24 : Comparaison des caractéristiques clinicopathologiques des patients portants des mutations fréquentes et des mutations rares 159
Tableau 25 : Association entre la présence d'une translocation ALK et les paramètres clinicopathologiques des patients 162
Tableau 26 : Corrélation entre la survie globale et les paramètres clinicopathologiques 164
Tableau 27 : Corrélation entre la survie globale et les biomarqueurs immunohistochimique 169

Introduction générale

Après avoir été une maladie pratiquement inconnue à la fin du XIXe siècle, le cancer du poumon (CP) est devenu le cancer le plus fréquent dans le monde [1]. En un peu plus de cent ans, ce type de cancer est désormais une épidémie moderne responsable de plus de 3 millions de décès chaque année dans le monde [1].

Au Maroc, il représente le deuxième type de cancer le plus fréquent après le cancer du sein. Il s'agit de la première tumeur maligne qui touche la population masculine et, la sixième chez les femmes. Cependant, conformément aux statistiques mondiales, le cancer du poumon est la cause principale responsable du décès liée au cancer au Maroc [2].

Malgré les progrès spectaculaires que reconnue le CP en termes de traitement, le pronostic vital des patients reste sombre avec un taux de survie globale à 5 ans ne dépassant pas 14 %. Une chirurgie curative n'est réalisée que dans les stades précoces de la maladie (stade I ou II), mais le diagnostic est le plus souvent porté à un stade avancé de la maladie (stade IV). Jusqu'à présent, il n'existe aucune approche reconnue pour le dépistage du CP.

La compréhension des voies cellulaires et moléculaires qui régissent la genèse et la progression du cancer bronchique non à petites cellules (CBNPC) a considérablement évoluée au cours de la dernière décennie. En parallèle, des ciblages thérapeutiques intelligents ont été réalisés avec la découverte de plusieurs cibles moléculaires et le développement des thérapies ciblées [3].

La détection des mutations activatrices du gène du récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR) et leur association avec la réponse aux inhibiteurs de la tyrosine kinase (ITKs) tels que Gefitinib et l'Orletinib de première génération, l'Afatinib de deuxième génération et l'osimertinib de troisième génération, a permis l'identification d'un groupe spécifique de patients, qui peuvent bénéficier d'un traitement plus efficace par ces thérapies ciblées [4].

La présence d'une mutation au niveau du gène EGFR est corrélée à une réponse majeure aux inhibiteurs de tyrosine kinase de l'EGFR. Les inhibiteurs réversibles des tyrosines kinases de l'EGFR ont l'avantage d'avoir peu d'effets secondaires et leur administration est non invasive, il est donc indispensable de détecter ces mutations afin de prescrire le traitement le plus adapté.

Une autre protéine a été révélée corrélée à la réponse aux ITKs est la protéine de fusion impliquant le gène ALK (anaplastic lymphoma kinase) et le gène EML4 (echinoderm

microtubule associated protein like 4). La translocation EML4-ALK dans le cadre des CBNPC a pour la première fois été mise en évidence en 2007 dans environ 3 à 7 % des cas [5]. Comme pour les mutations d'EGFR, les patients avec tyrosine kinase ALK activée possèdent une bonne sensibilité aux ITKs permettant une stratégie de sélection des tumeurs ALK positives [6].

Objectifs de la thèse

Le statut de mutation des deux oncogènes, EGFR et ALK, a montré un changement notable dans le phénotype de la maladie du CBNPC. Compte tenu de l'importance clinique de ces deux altérations moléculaires, la détection de ces biomarqueurs est devenue cruciale pour la mise en place d'une prise en charge personnalisée des patients.

Cette thèse est le fruit d'une étude prospective réalisée au sein du laboratoire d'anatomie pathologique du CHU Hassan II de Fès en collaboration avec Moffid Cancer Center sur une période étalée entre Novembre 2017 et Juin 2022. Elle a porté, in situ, la détection des mutations du gène EGFR et du réarrangement ALK dans le CBNPC afin de déterminer le profil épidémiologique, clinique et histologique des patients présentant ces altérations.

L'objectif principal de cette étude est d'établir pour la première fois au Maroc le profil moléculaire du cancer bronchique non à petites cellules et de déterminer son impact sur le pronostic et l'évolution des patients atteints d'adénocarcinome pulmonaire.

Objectifs spécifiques :

- Rapporter l'expérience du CHU Hassan II de Fès dans la détection des mutations EGFR par différentes méthodes basées sur la PCR dans une cohorte marocaine de 302 patients présentant un adénocarcinome pulmonaire.
- Identification des cas remaniés pour le gène ALK par une étude immunohistochimique chez 69 patients.
- Déterminer les caractéristiques clinico-pathologiques et le profil morphologique des patients EGFR muté et ALK réarrangé.
- Identifier l'impact des mutations EGFR et ALK sur la survie des patients atteint d'un CBNPC.

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Rappel histologique :

La trachée est tapissée par des cellules cylindriques ciliées mélangées à de nombreuses cellules en gobelets sécrétant du mucus.

Les bronches se divisent en deux parties, l'une à droite et l'autre à gauche de la trachée et subissent des divisions consécutives, leur diamètre diminue également. La bronche est tapissée d'un épithélium respiratoire qui est entouré d'une couronne de cartilage hyalin. La partie cartilagineuse diminue également lorsque la bronche se divise pour former des bronchioles.

Les bronchioles sont dépourvues de cartilage et de glandes sous-muqueuses. La muqueuse est plutôt soutenue par des fibres élastiques et la sous-muqueuse présente des faisceaux incomplets de muscles lisses qui entourent la muqueuse.

Le type d'épithélium dans les bronchioles est un peu différent, et présente plutôt des transitions. Le revêtement est simple cylindrique, devenant progressivement cuboïdal lorsque le diamètre diminue. Les cellules ciliées persistent, mais les cellules en gobelet disparaissent au niveau des bronchioles terminales. De plus au niveau des bronchioles terminales, on note des "cellules de Clara". Ce sont des cellules non-ciliées avec une surface apicale bombée. La fonction des cellules de Clara est de sécréter des protéines surfactants. Ces sécrétions peuvent être impliquées dans le métabolisme xénobiotique des carcinogènes et des substances toxiques pour les poumons.

Les alvéoles, les canaux alvéolaires, les bronchioles respiratoires et les vaisseaux sanguins forment l'unité principale de la fonction pulmonaire, également appelée acini.

Sur les coupes en paraffine, les alvéoles ressemblent à une structure en nid d'abeille et apparaissent comme des espaces vides bordés de parois fines qui forment des sacs ouverts ou des polygones fermés. Les alvéoles ressemblent à la structure d'un rayon de miel. Elles sont tapissées d'un épithélium pavimenteux (cellules alvéolaires de type 1) dont la fonction est de permettre les échanges gazeux avec les capillaires de la paroi alvéolaire. Les cellules cuboïdales (cellules alvéolaires de type 2) dont la fonction principale est la production et l'élimination du surfactant. On observe également de nombreux macrophages qui tapissent la

surface alvéolaire. L'interstitium alvéolaire contient de nombreux capillaires, des fibroblastes, du collagène et des fibres élastiques.

II. La carcinogénèse pulmonaire :

La vie de la cellule épithéliale bronchique normale nécessite un équilibre de nombreux gènes qui contrôlent la prolifération et/ou la différenciation cellulaire, et qui freinent le cycle cellulaire et/ou induisent l'apoptose [7]. Le cancer bronchique est dû à des altérations génétiques qui perturbent l'équilibre physiologique entre stimulation et inhibition de la prolifération cellulaire. Cette transformation est la résultante d'un long processus multi-étapes qui peut prendre plusieurs années [8]. Les mutations somatiques de l'ADN cellulaire sont à la base de presque tous les cancers humains [9]. Le CBNPC n'est pas différent des autres cancers, plus de 50000 variants nucléotidiques et 530 mutations somatiques, avec un taux mutationnel à l'échelle génomique estimé à 17,1par mégabase a été révélé par séquençage du génome chez un ancien fumeur atteint d'adénocarcinome pulmonaire [10]. Bien que l'implication de la grande majorité des mutations acquises par les CBNPC reste inconnue, plusieurs études ont montré qu'un petit groupe de lésions génétiques est nécessaire non seulement à l'initiation ou à la progression de la tumeur, mais également au maintien de la survie de cette tumeur [11][12]. Les mutations oncogènes "motrices" surviennent généralement sur des gènes codants pour des protéines impliquées dans des voies cellulaires clés, l'activation oncogénique de ces protéines entraîne une activité aberrante, contribuant ainsi au développement de la tumeur [13]. Le récepteur du facteur de croissance épidermique et l'homologue de l'oncogène viral du sarcome du rat de Kirsten (KRAS) sont les deux principaux proto-oncogènes identifiés dans les CBNPC, l'accumulation d'une mutation dans l'un de ces gènes étant considérée comme une étape précoce importante dans la pathogenèse et le développement de la tumeur [14]. Les gènes EGFR et RAS codent pour des protéines impliquées dans les voies de signalisation cellulaire qui contrôlent la croissance et la survie cellulaire [15][16]. Un autre mécanisme impliqué dans l'activation des gènes pilotes résulte des réarrangements géniques, tels que les gènes ALK et ROS1 qui initient des voies d'oncogenèse majeures [17].

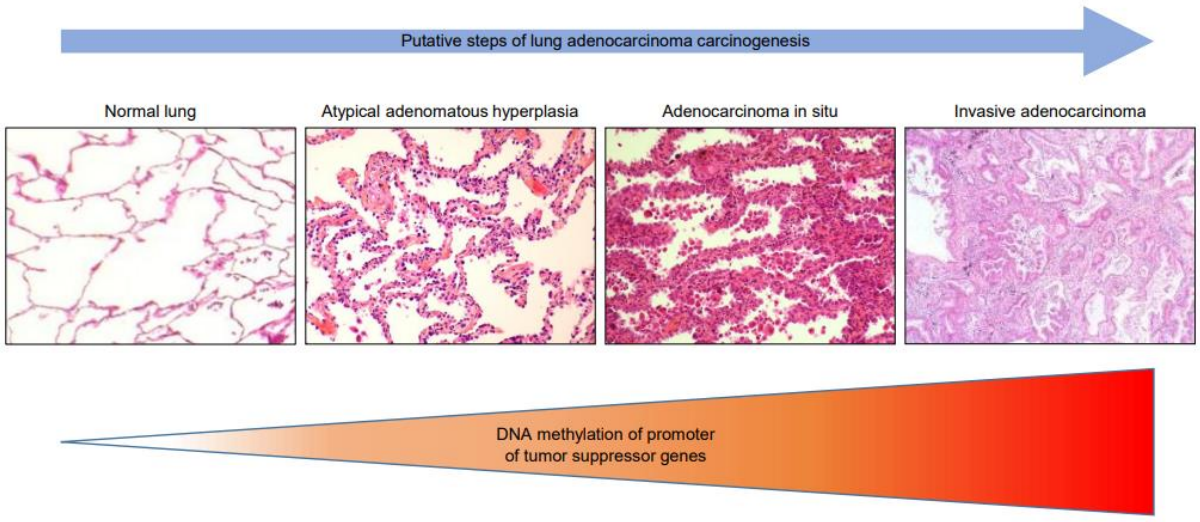


Figure 1 : Représentation schématique des différentes étapes de la carcinogenèse d'adénocarcinome pulmonaire [18]

III. La pathogénèse du CBNPC :

On distingue deux grands types de cancers bronchiques, issus de cellules des bronches d'origine différentes : les cancers bronchiques non à petites cellules et les cancers bronchiques à petites cellules [19][20]. Ces deux types cellulaires présentent une grande différence dans la progression et l'évolution tumorale du cancer ainsi que dans leur sensibilité aux traitements, d'où la nécessité de les distinguer au moment du diagnostic.

Les cancers bronchiques à petites cellules (CPCs) constituent environ 15 % de tous les cancers du poumon et ils prennent naissance à partir des cellules neuroendocrines de l'épithélium bronchique [19][20]. Les CPCs sont des tumeurs malignes agressive caractérisés par une croissance tumorale rapide et un pouvoir métastatique élevé. Au départ, une bonne réponse à la chimiothérapie peut être observée, mais l'évolution de la résistance conduit généralement à une rechute. Le pronostic vital reste sombre avec un taux de survie à 5 ans inférieur à 7 %.

Les cancers bronchiques non-à petites cellules (CBNPCs) représentent 80 à 85 % de tous les cas de cancers du poumon [21]. En se basant sur les caractéristiques anatomopathologiques particulières, on distingue le carcinome épidermoïde et le carcinome non épidermoïde principalement l'adénocarcinome (ADK).

L'ADK pulmonaire est le type histologique le plus fréquent chez les femmes, les non-fumeurs et les hommes à jeune âge. Il a une localisation le plus souvent périphérique, les cellules tumorales prennent naissance à partir des petites bronches, des bronchioles et/ou des cellules

épithéliales alvéolaires. L'adénocarcinome pulmonaire se caractérise par une différenciation glandulaire, la production de mucine et l'expression de marqueurs protéiques tels que la cytokératine 7 (CK7) et/ou le facteur de transcription thyroïdien 1 (TTF1) [22]. L'adénocarcinome pulmonaire se subdivise en sous-type histologique en fonction de différentes architectures : acinaire, papillaire, micropapillaire, lépidique et solide. Ces différents types architecturaux sont à la base de la dernière classification histopronostique d'IASLC/ATS/ERS (International Association for the Study of Lung Cancer), (American Thoracic Society), (European Respiratory Society) [23].

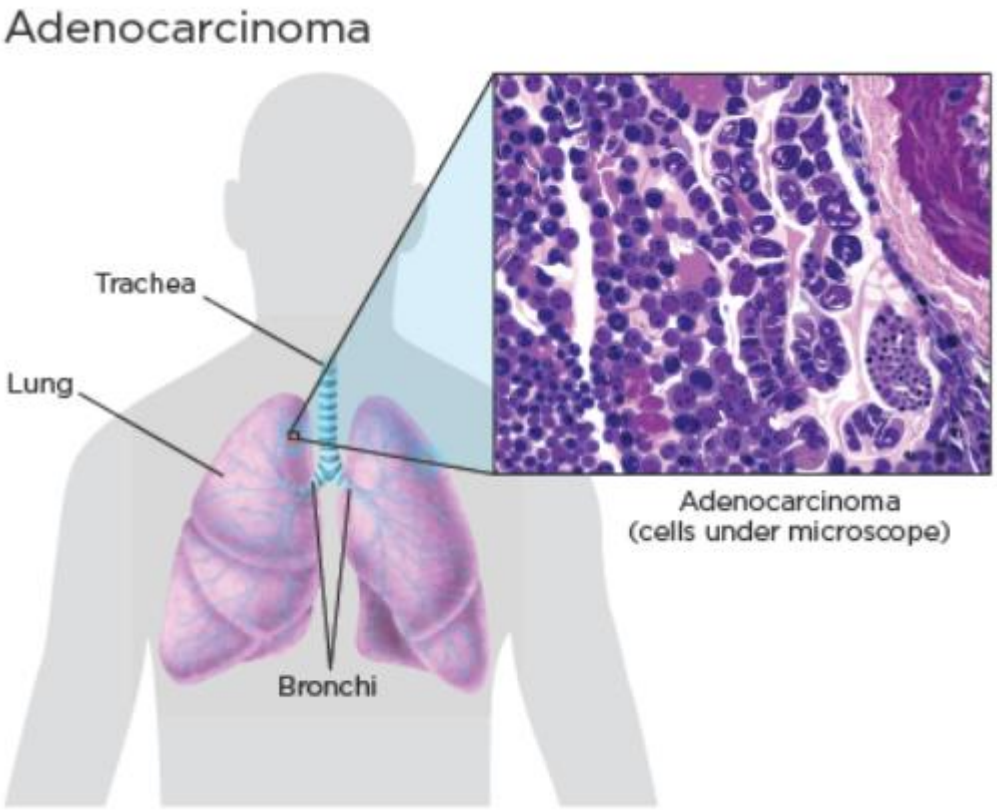


Figure 2 : Adénocarcinome pulmonaire

Le carcinome épidermoïde est le deuxième type histologique le plus fréquent des CBNPCs, il constitue environ 25-30% de l'ensemble des cancers du poumon. Les carcinomes épidermoïdes sont fortement associés au tabagisme et surviennent principalement dans les voies aériennes centrales. Ce type histologique est caractérisé par la sécrétion de la kératine par les cellules tumorales, les ponts intercellulaires et l'expression des marqueurs protéiques tels que la p40, la p63 et, la cytokératine 5/6 (CK5/6) [23]. Le carcinome épidermoïde a été pour longtemps le type histologique le plus fréquent du cancer de poumon, mais au XXe siècle, il a été dépassé par l'adénocarcinome pulmonaire. Cela peut être fortement dû au

changement des habitudes tabagiques et, à l'évolution de la composition de la cigarette [24][25].

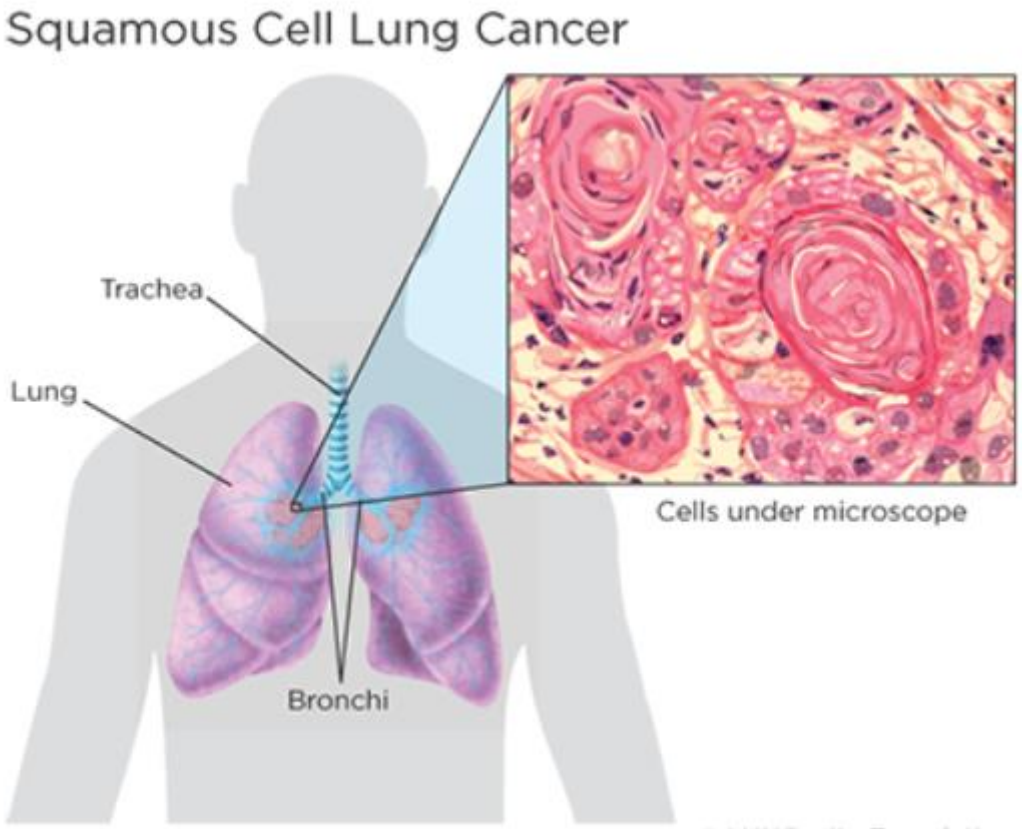


Figure 3 : Carcinome épidermoïde

Les carcinomes pulmonaires ne présentant pas les critères de différenciation des carcinomes à petites cellules, des carcinomes épidermoïdes et des adénocarcinomes sont classé dans la catégorie des carcinomes à grandes cellules [23]. Ce type histologique est connu très agressif et de mauvais pronostic, il représente 10% de toutes les tumeurs malignes du poumon. Il regroupe les carcinomes à grandes cellules indifférenciés et les carcinomes neuroendocrines à grandes cellules [23].

D'autres tumeurs malignes du CBNPC moins fréquentes sont les carcinomes adénosquameux, les carcinomes sarcomatoïdes et les carcinoïdes.

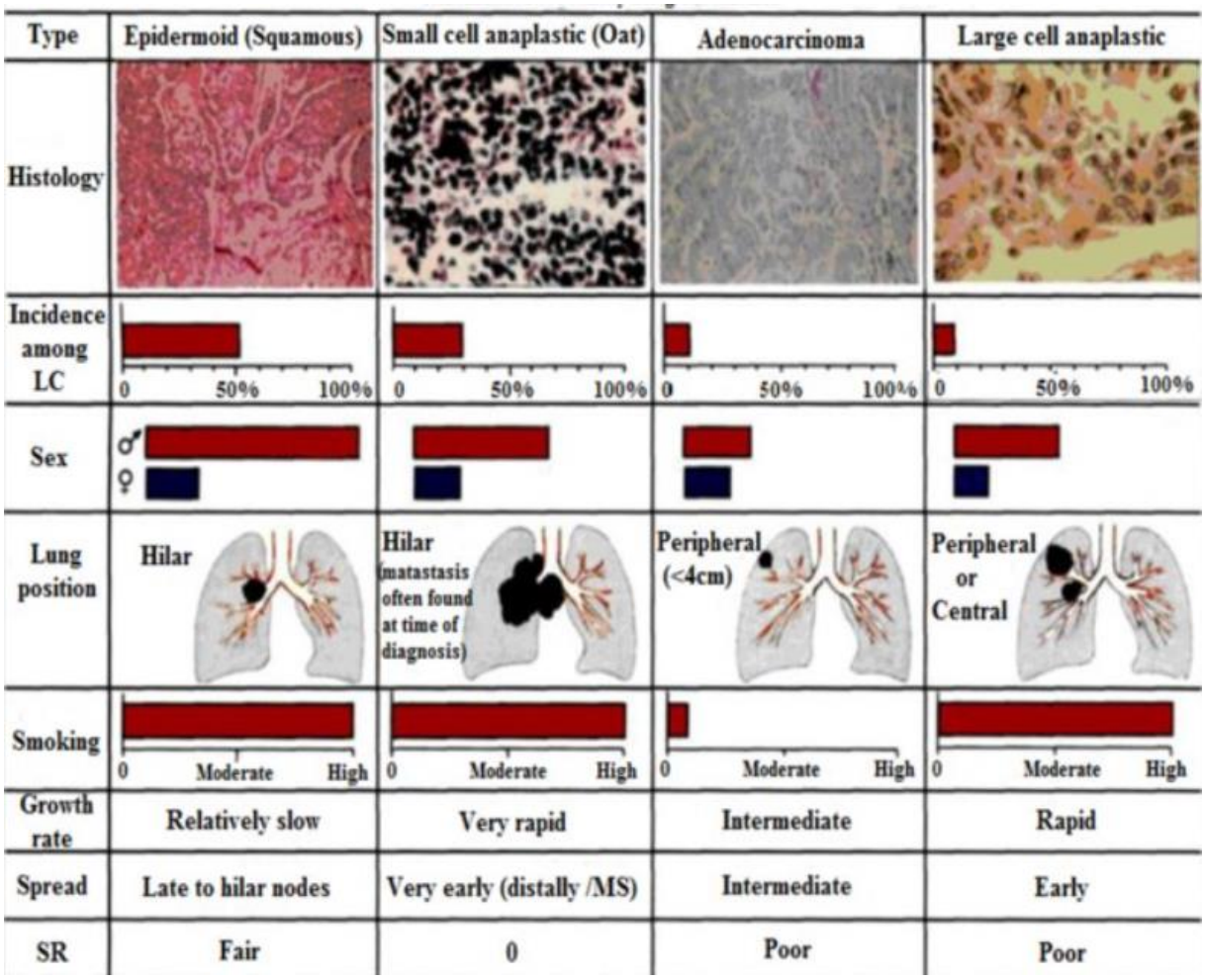


Figure 4 : Les principaux types histologiques de cancer du poumon

IV. Le diagnostic positif du CBNPC :

IV.1 Clinique :

Les manifestations cliniques du CBNPC sont diverses mais manquent de spécificité, ce qui entraîne souvent un retard dans le diagnostic du cancer pulmonaire. Le cancer du poumon périphérique ne présente généralement aucun symptôme et est souvent découvert lors d'un bilan de santé ou d'une imagerie thoracique pour d'autres maladies. Les manifestations cliniques du cancer du poumon peuvent être résumées comme suit : symptômes résultant de la croissance locale de la tumeur primaire elle-même comme la toux, l'hémoptysie, la dyspnée et la fièvre; symptômes de la tumeur primaire envahissant les organes et les structures adjacents notamment un épanchement pleural, une paralysie phrénique, une dysphagie, un syndrome de compression de la veine cave supérieure, un épanchement péricardique, etc. ; symptômes de métastases à distance et manifestations extra-pulmonaires du cancer du poumon (syndrome paranéoplasique) comme les céphalées, les nausées et les vomissements causés par les

métastases du système nerveux central et les douleurs sévères et progressives qui accompagnent généralement les métastases osseuses, etc [26].

IV.2 Imagerie :

Les méthodes d'examen d'imagerie du CBNPC comprennent principalement la radiographie thoracique, la tomographie assistée par ordinateur (TDM), l'imagerie par résonance magnétique (IRM), l'échographie, l'imagerie par radionucléides, la tomographie par émission de positons (TEP-CT) et d'autres méthodes.

Elle est principalement utilisée pour déterminer l'extension de la maladie et cibler la région à prélever afin de mieux évaluer le stade de la maladie, l'évaluation de la résécabilité, le suivi de l'effet thérapeutique, etc. L'examen d'imagerie est la meilleure méthode de détection et d'évaluation non invasive des tumeurs. Les informations d'imagerie rendent les cliniciens plus confiants dans le jugement du pronostic de la tumeur et la formulation des décisions de traitement. Dans le diagnostic et le traitement du cancer de poumon, une ou plusieurs méthodes d'examen par imagerie doivent être sélectionnées de manière raisonnable et efficace en fonction des différents objectifs de l'examen [26].

Tous les examens du diagnostic contribuent à la classification tumeur, ganglion et métastase (TNM) du cancer de poumon non à petites cellules. La stadification TNM du cancer de poumon est mise en œuvre pour définir l'étendue de la maladie et, par conséquent, prédire le pronostic et guider le traitement. La dernière édition de la classification TNM du cancer de poumon a été publiée récemment [27].

Tableau 1 : Huitième édition de la stadification TNM du cancer de poumon

Primary tumor (T)	
T category	**Definition**
Tx	Tumor that is proven histopathologically (malignant cells in bronchopulmonary secretions/washings) but cannot be assessed or is not demonstrable radiologically or bronchoscopically.
T0	No evidence of primary tumor.
Tis	Carcinoma in situ: Squamous cell carcinoma in situ. Adenocarcinoma in situ (pure lepidic pattern and ≤3 cm in greatest dimension).
T1	Size: ≤3 cm. Airway location: in or distal to the lobar bronchus. Local invasion: none (surrounded by lung or visceral pleura). Subdivisions: T1mi: Minimally invasive adenocarcinoma (pure lepidic pattern, ≤3 cm in greatest dimension and ≤5 mm invasion)—T1a (size ≤1 cm)[a]—T1b (1 cm < size ≤ 2 cm)—T1c (2 cm < size ≤ 3 cm).
T2	Any of the following characteristics: Size: >3 cm but ≤5 cm. Airway location: invasion of the main bronchus (regardless the distance to the carina) or presence of atelectasis or obstructive. Pneumonitis that extends to hilar region (whether it is involving part or the entire lung). Local invasion: visceral pleura (PL1 or PL2). Subdivisions: T2a (3 cm < size ≤ 4 cm or cannot be determined) and T2b (4 cm < size ≤ 5 cm).
T3	Any of the following characteristics: Size: >5 cm but ≤7 cm. Local invasion: direct invasion of chest wall (including superior sulcus tumors), parietal pleura (PL3), phrenic nerve, or parietal pericardium. Separate tumor nodule(s) in the same lobe of the primary tumor.
T4	Any of the following characteristics: Size >7 cm. Airway location: invasion of the carina or trachea. Local invasion: diaphragm, mediastinum, heart, great vessels, recurrent laryngeal nerve, esophagus or vertebral body. Separate tumor nodule(s) in an ipsilateral different lobe of the primary tumor.
Lymph nodes (N)	
Descriptor	**Definition**
Nx	Regional lymph nodes cannot be evaluated.
N0	No regional lymph nodes involvement.
N1	Involvement of ipsilateral peribronchial and/or ipsilateral hilar lymph nodes (includes direct extension to intrapulmonary nodes).
N2	Involvement of the ipsilateral mediastinal and/or subcarinal lymph nodes.
N3	Involvement of any of the following lymph node groups: contralateral mediastinal, contralateral hilar, ipsilateral or contralateral scalene, or supraclavicular nodes.
Distant metastasis (M)	
Descriptor	**Definition**
M0	No distant metastasis.
M1	Presence of distant metastasis. Subdivisions: M1a (separate tumor nodule(s) in a contralateral lobe to that of the primary tumor or tumors with pleural or pericardial nodules or malignant effusion); M1b (single extrathoracic metastasis); M1c (multiple extrathoracic metastases to one or more organs).

Note: Tumor's size is determined by the greatest dimension of the lesion.
[a]The uncommon superficial spreading tumor with invasive component limited to bronchial wall is classified as T1a regardless of size or extent to main bronchus.

Tableau 2 : Huitième édition de la stadification TNM du cancer de poumon

Stage group	
Occult carcinoma	(TxN0M0)
Stage 0	(TisN0M0)
Stage IA1	(T1aN0M0) (T1(mi)N0M0)
Stage IA2	(T1bN0M0)
Stage IA3	(T1cN0M0)
Stage IB	(T2aN0M0)
Stage IIA	(T2bN0M0)
Stage IIB	(T (1–2)N1M0) (T3N0M0)
Stage IIIA	(T(1–2)N2M0) (T3N1M0) (T4N(0–1)M0)
Stage IIIB	(T(1–2)N3M0) (T(3–4)N2M0)
Stage IIIC	(T(3–4)N3M0)
Stage IVA	(Any T, Any N, M1a,b)
Stage IVB	(Any T, Any N, M1c)

IV.3 Endoscopie :

La bronchoscopie est d'une grande utilité pour la localisation et le diagnostic histologique des tumeurs. Pour les carcinomes pulmonaires, la bronchoscopie permet d'observer directement la lésion, et plus de 95 % des lésions peuvent être confirmées par une brosse cytologique et une biopsie histologique. La biopsie peut également être réalisée dans le hile pulmonaire et les ganglions lymphatiques médiastinaux adjacents à la bronche par bronchoscopie à ultrasons pour le diagnostic qualitatif du cancer de poumon et le diagnostic du stade de l'envahissement médiastinal [26]. Dans les cas où il est difficile de réaliser une biopsie endoscopique, une biopsie par carottage guidée par scanner est préférée (biopsie scanoguidée), cette technique permet d'obtenir des échantillons multiples et plus importants avec une seule ponction. Une sélection minutieuse de la technique utilisée en fonction des cas est nécessaire pour augmenter le rendement diagnostique et éviter les complications inutiles.

IV.4 Anatomie pathologique :

Le diagnostic pathologique du cancer de poumon sur les prélèvements biopsiques détecte principalement la présence et le type de la tumeur. Le diagnostic pathologique doit être classé en type et sous-types histologique pour les patients présentant une inopérabilité avancée. Un marquage immunohistochimique est nécessaire pour les cas morphologiquement atypiques. Le diagnostic de carcinome non à petites cellules non spécifié (NOS) doit être évité. Les prélèvements biopsiques des patients présentant un CBNPC avancé, en particulier un adénocarcinome, doivent être complété par des tests de pathologie moléculaire [26].

Une étape cruciale dans la réussite des tests de biologie moléculaire (PCR-séquençage, FISH, etc.) est la sélection d'une zone riche en cellules tumorales avec peu ou pas de nécrose, et l'anatomopathologiste est seul responsable de cette phase.

IV.4.1 Classification histologique des adénocarcinomes pulmonaires :

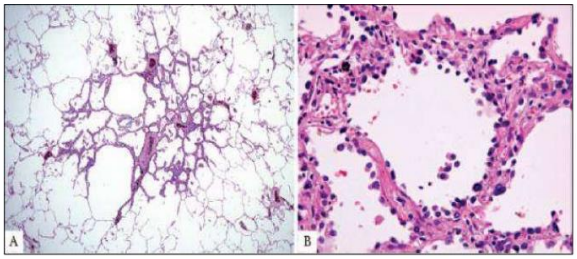
L'adénocarcinome pulmonaire est le type histologique le plus fréquent, il représente plus de la moitié des cancers bronchiques non à petites cellules. La conception des aspects cliniques, radiologiques, moléculaires et pathologiques des adénocarcinomes pulmonaires est amplement divergente au sein de ces différentes disciplines. Pour cette raison la dernière classification proposée par l'IASLC (International Association for the Study of Lung Cancer), l'ATS (American Thoracic Society) et l'ERS (European Respiratory Society) a été élaborée par plusieurs experts internationaux (pathologistes, chirurgiens, oncologues, biologistes moléculaires et radiologues) [28]. Cette classification intègre le diagnostic sur des petits

prélèvements biopsiques et/ou cytologiques. Elle tient compte des avancées considérables dans la compréhension de la génétique des carcinomes pulmonaires, ainsi que la détection des anomalies moléculaires telles que les mutations du gène EGFR et/ou des translocations des gènes ALK et ROS1 ayant un intérêt thérapeutique majeure suite à la prescription de nouvelles thérapies ciblées.

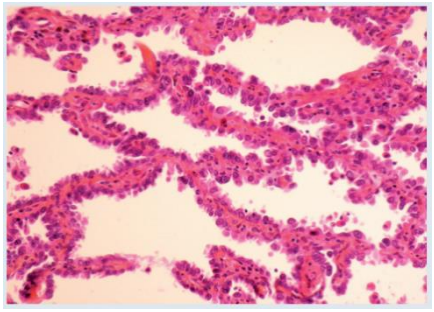
Tableau 3 : Classification des adénocarcinomes selon l'OMS 2021

Precursor glandular lesions	
Atypical adenomatous hyperplasia	8250/0
Adenocarcinoma in situ	
Adenocarcinoma in situ, nonmucinous	8250/2
Adenocarcinoma in situ, mucinous	8253/2
Adenocarcinomas	
Minimally invasive adenocarcinoma	
Minimally invasive adenocarcinoma, nonmucinous	8256/3
Minimally invasive adenocarcinoma, mucinous	8257/3
Invasive nonmucinous adenocarcinoma	
Lepidic adenocarcinoma	8250/3
Acinar adenocarcinoma	8551/3
Papillary adenocarcinoma	8260/3
Micropapillary adenocarcinoma	8265/3
Solid adenocarcinoma	8230/3
Invasive mucinous adenocarcinoma	8253/3
Mixed invasive mucinous and nonmucinous adenocarcinoma	8254/3
Colloid adenocarcinoma	8480/3
Fetal adenocarcinoma	8333/3
Adenocarcinoma, enteric type	8144/3
Adenocarcinoma, NOS	8140/3

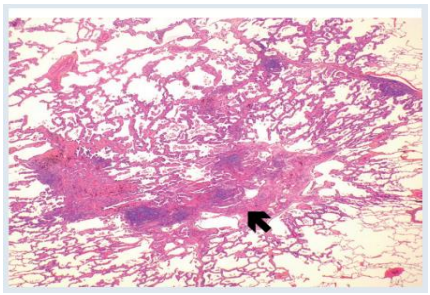
L'hyperplasie adénomateuse atypique : il s'agit d'une petite lésion de moins de 0,5 cm, localisée près des bronchioles respiratoires. Cette prolifération tumorale est considérée comme la lésion précurseur de l'adénocarcinome in situ [29], elle se caractérise par des pneumocytes de type II atypiques, séparées par des espaces (gap) avec un cytoplasme clair à mousseux. C'est une prolifération lépidique stricte [30].



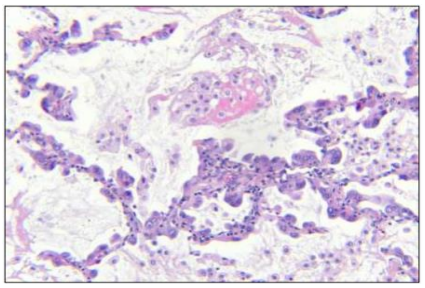
Adénocarcinome in situ : il s'agit d'une petite lésion localisée (≤ 3cms), dont la croissance est limitée aux cellules le long des structures alvéolaires préexistantes (lépidique pure). Les pneumocytes de type II ou de cellules de Clara, présentent des atypies modérées [30]. Il n'existe pas d'invasion stroma, pleurale ou vasculaire et les formes invasives telles qu'acineuses, papillaires, solides ou micropapillaires sont absentes [31]. Les adénocarcinomes in situ sont le plus souvent non mucineux. Les mutations les plus fréquemment retrouvées dans ce type d'adénocarcinome sont les mutations EGFR et KRAS, avec une nette prédominance des mutations EGFR [30][32].



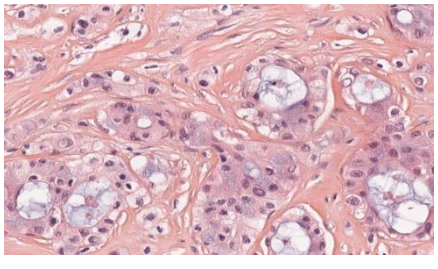
Adénocarcinome avec invasion minime : l'adénocarcinome avec invasion minime est une petite tumeur adénocarcinomateuse solitaire (≤ 3 cm), avec prédominance d'une architecture lépidique, le foyer d'invasion doit être ≤ 0,5 cm dans sa plus grande dimension et peut inclure toutes les architectures d'adénocarcinome (acinaire, papillaire, micropapillaire, fœtal, colloïde, etc.), cette prolifération doit également infiltrer le stroma myofibroblastique [21]. Ce type d'adénocarcinome est marqué par une mutation et/ou une amplification du gène EGFR [30][32].



Adénocarcinome lépidique : les cellules tumorales sont des pneumocytes de type II ou des cellules de Clara, colonisant les parois alvéolaires [30]. L'ADK lépidique peut également présenter des foyers invasifs supérieurs à 5mm, correspondant soit à un contingent invasif acinaire, papillaire, micropapillaire ou solide, soit à un foyer de destruction de l'armature alvéolaire et présence d'un stroma réactionnelle fibroblastique infiltrée par des cellules tumorales, soit à une invasion vasculaire ou pleurale, soit à une dissémination aérienne [33]. L'adénocarcinome lépidique présente le plus souvent une mutation EGFR [30][32][34][35].

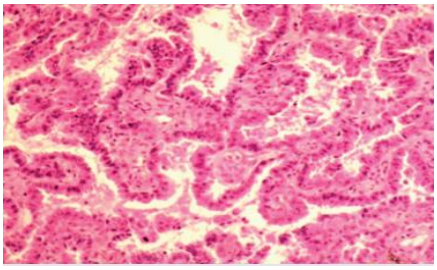


Adénocarcinome acinaire : les cellules néoplasiques sont disposées selon une architecture glandulaire/acinaire. Elles sont rondes à ovales avec une

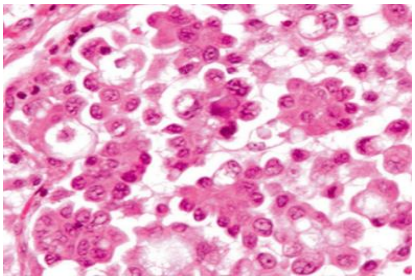


lumière centrale qui peut contenir de la mucine [30]. L'architecture peut parfois être cribriforme [21]. L'adénocarcinome acinaire présente le plus une mutation EGFR [32][34][35], la présence d'un réarrangement d'ALK est également associé à l'architecture cribriforme [30][36][37].

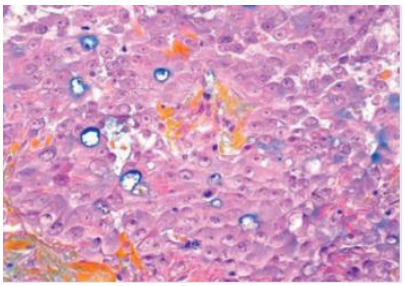
Adénocarcinome papillaire : il s'agit d'une prolifération de cellules néoplasiques disposées selon une architecture papillaire avec la présence d'un noyau fibro-vasculaire [33]. L'adénocarcinome papillaire est plus souvent EGFR muté [30][32][34][35].



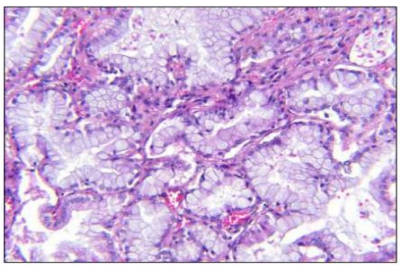
L'adénocarcinome micropapillaire : l'architecture micropapillaire est marquée par des cellules tumorales disposées en amas formant des papilles sans axe fibro-vasculaire. La tumeur se caractérise par des petites cellules cubiques avec des atypies minimes [33]. Les mutations les plus fréquemment retrouvées dans ce type d'adénocarcinome pulmonaire sont les mutations EGFR [30][32][34][35].



Adénocarcinome solide : l'ADK solide est caractérisé par des cellules tumorales ovalaires ou polygonales, formant des massifs et ne présentant pas une architecture identifiable d'ADK (acinaire, papillaire, micropapillaire ou lépidique) [30]. Le critère de diagnostic pour un ADK solide est l'identification de la mucine au sein d'un nombre seuil de cellules [33]. Les réarrangements d'ALK et de ROS1 sont exclusifs dans ce type d'adénocarcinome [30][36][37]. Ce sous-type histologique est également caractérisé par la présence des mutations du gène KRAS [32][34][35].

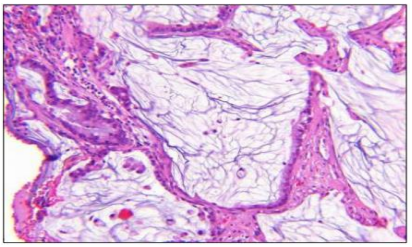


Adénocarcinome mucineux : Cette tumeur a tendance à être multicentrique et bilatérale. Histologiquement, les cellules mucipares présentent une morphologie lépidique, papillaire, micropapillaire ou glandulaire à l'exception de l'architecture solide [30]. Les atypies nucléaires sont discrètes, les espaces alvéolaires environnants peuvent également être remplis de mucine.

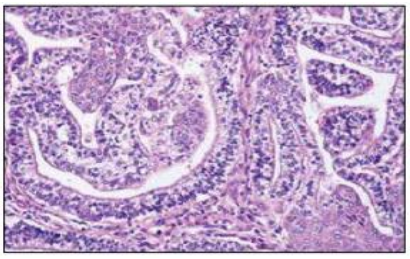


98% des patients porteurs de ce type d'adénocarcinome présentent une mutation KRAS [30][32][34][35].

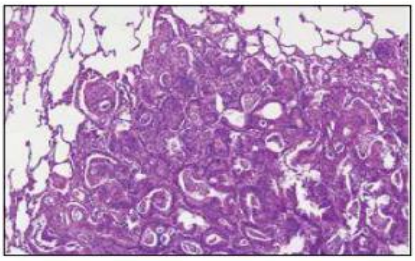
Adénocarcinome colloïde : cette tumeur est caractérisée par de vastes flaques de mucus qui distendent les espaces alvéolaires en détruisant leur paroi alvéolaire. Les cellules tumorales se développent selon un modèle lépidique. Elles peuvent également être glandulaires [30].



Adénocarcinome fœtal : ce variant d'adénocarcinome ressemble au poumon fœtal. Il se présente sous forme de glandes complexes, constituées de cellules plutôt cylindriques au cytoplasme clair et riche en glycogène. Elles sont peu atypiques et forment des morules. Les glandes néoplasiques sont entourées d'un stroma fibromyxoïde lâche [30].



Adénocarcinome entérique : ce variant est organisé en structures acinaire ou cribriforme ou parfois des structures papillotubulaires, limitées par des cellules tumorales de forme cylindrique avec une pseudostratification nucléaire et une nécrose luminale [30].



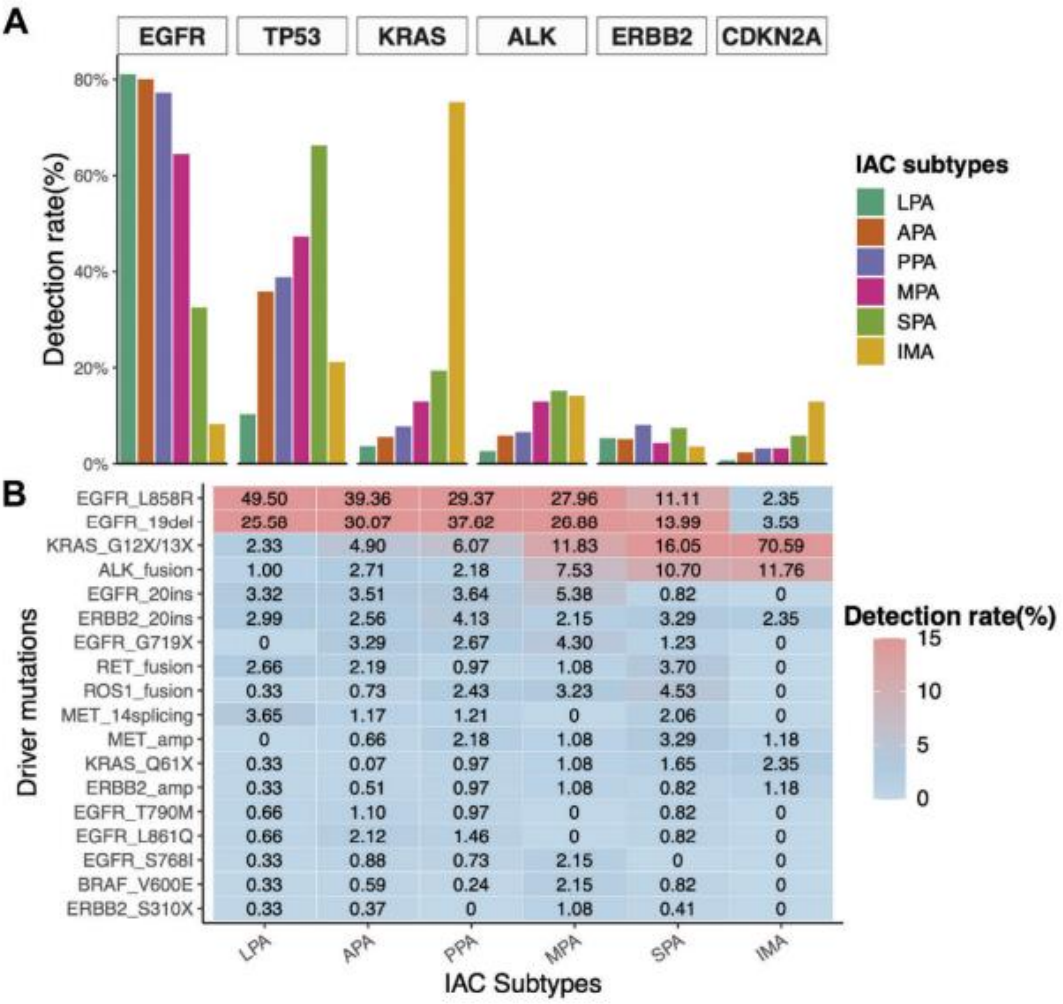


Figure 5 Taux de mutation distincts dans les sous-types invasifs d'adénocarcinome pulmonaire [38]

Les taux de mutation distincts des six principaux gènes dans divers sous-types invasifs d'ADK pulmonaire ; (B) Taux de mutations activatrices impliquant les huit oncogènes classiques du CBNPC dans les six principaux sous-types histologiques d'ADC pulmonaire. (LPA) ADK lépidique, (APA) ADK acinaire, (PPA) ADK papillaire, (MPA) ADK micropapillaire, (SPA) ADK solide, (IMA) ADK mucineux

IV.4.2 La démarche diagnostique anatomo-pathologique :

Des algorithmes standardisés pour la démarche diagnostique doivent être définis dans la pratique clinique. La caractérisation morphologique via des lames HES (Hématoxyline-Eosine-Safran) est la première étape réalisée pour le diagnostic différentiel entre l'adénocarcinome et le carcinome épidermoïde, la majorité des altérations moléculaires ciblables (EGFR, ALK) sont principalement identifiées dans les adénocarcinomes pulmonaires, donc les médicaments inappropriés doivent être évités pour les patients atteints d'un carcinome épidermoïde.

Avant la classification de l'OMS de 2015, la distinction entre l'adénocarcinome et le carcinome épidermoïde était basée sur leurs caractéristiques morphologiques avec ou sans coloration de la mucine. L'adénocarcinome était défini comme un carcinome avec une structure acinaire/tubulaire ou une production de mucine, tandis que le carcinome épidermoïde était défini comme un carcinome avec kératinisation ou ponts intercellulaires. Dans la classification actuelle, un carcinome solide sans structures glandulaires ou production de mucine, mais avec une positivité immunohistochimique pour bioinfor tels que le TTF-1 et/ou la Napsin A, est diagnostiqué comme un adénocarcinome. De même, un carcinome solide sans kératinisation ni ponts intercellulaires, mais présentant une positivité immunohistochimique pour les marqueurs du carcinome épidermoïde, tels que la p40, la CK5/6 et la P63 est diagnostiqué comme un carcinome épidermoïde. Ces modifications utilisant des évaluations immunohistochimiques ont considérablement réduit la proportion des CBNPC diagnostiqués comme étant des carcinomes à grandes cellules [39].

Le TTF-1 (thyroïde transcription factor 1) est exprimé dans près de 75 % des adénocarcinomes pulmonaires non mucineux. L'anticoprs anti-TTF1 est le plus souvent utilisé pour confirmer l'origine primitive de la tumeur (adénocarcinome pulmonaire).

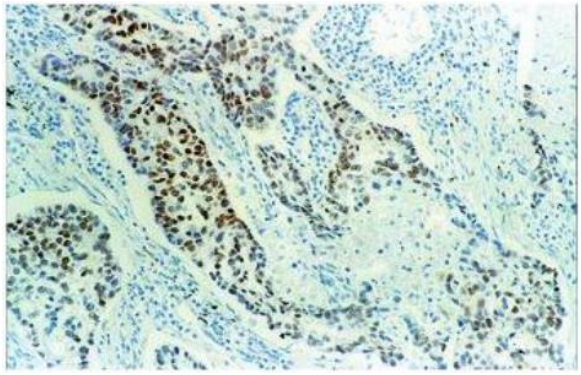


Figure 6 : Marquage immunohistochimique du facteur-1 de transcription de la thyroïde

La cytokératine 7 est un marqueur protéique membranaire/cytoplasmique exprimé dans de nombreux épithéliums normaux et tumeurs épithéliales. Tout comme le TTF1, la CK7 est utilisée dans la routine clinique pour confirmer l'origine primitive pulmonaire de la tumeur.

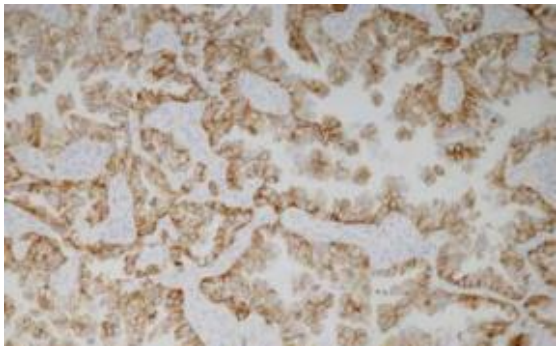


Figure 7 : Marquage immunohistochimique de l'anticorps anti-CK7

La P63 est un membre de la famille des gènes suppresseurs de tumeurs P53. Une expression anormale de la P63 a été identifiée dans la cavité buccale, le carcinome épidermoïde de la peau, les lésions squameuses prémalignes et invasives, le carcinome épidermoïde de l'œsophage, les carcinomes urothéliaux etc. L'expression de la P63 dans le CBNPC est fortement associée au carcinome épidermoïde. Il est utilisé pour faire la distinction entre l'adénocarcinome pulmonaire et le carcinome épidermoïde.

L'anticorps anti-p40 est un excellent marqueur pour distinguer le carcinome épidermique pulmonaire de l'adénocarcinome, et l'expression de la p40 est équivalente à celle de la p63 dans le carcinome épidermoïde pulmonaire.

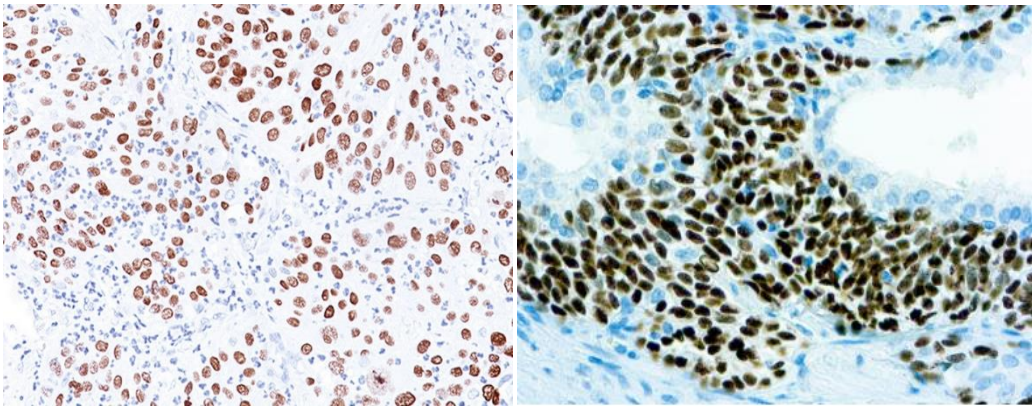


Figure 8 : Marquage immunohistochimique de l'anticorps anti-P40 et anti-P63

L'étude immunohistochimique de la cytokératine 5/6 est utilisée pour distinguer le mésothéliome épithélioïde (CK5/6 positif) de l'adénocarcinome pulmonaire (principalement CK5/6 négatif), alors que la cytokératine 20 est couramment utilisée en combinaison avec la CK7 et d'autres anticorps spécifiques pour faire la distinction entre les carcinomes du côlon (CK20 positifs) des carcinomes du poumon, de l'ovaire et du sein.

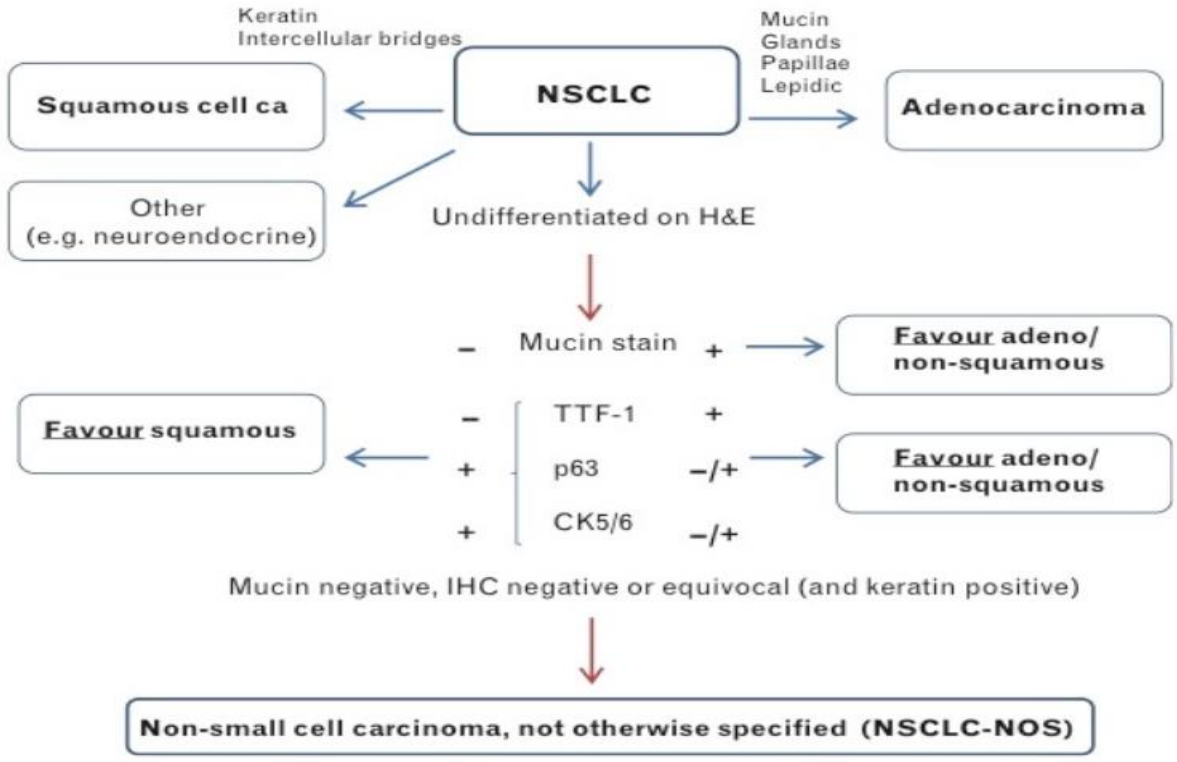


Figure 9 : Algorithme pour le sous-typage histopathologique du CBNPC dans les petits échantillons biopsiques

L'obtention d'une quantité suffisante de matériel de biopsie pour compléter les diagnostics morphologiques et moléculaires est un défi unique au CBNPC avancé en raison de deux facteurs clés. Premièrement, le nombre de cibles moléculaires exploitables dans le CBNPC est plus élevé que dans d'autres tumeurs solides. Deuxièmement, la majorité (~ 70 %) des patients atteints de CBNPC présentent une maladie avancée pour laquelle la chirurgie curative n'est plus possible [40][41]. Des techniques de biopsie tissulaire peu invasives, telles que la biopsie à l'aiguille et l'aspiration à l'aiguille fine, sont réalisées dans de tels cas, mais elles permettent d'obtenir des échantillons plus petits que la résection chirurgicale [41][42] ; il est donc important de préserver et d'utiliser ces tissus de manière optimale [41][42]. De petits échantillons avec un contenu limité en cellules tumorales (< 30 %) peuvent permettre une classification morphologique ; cependant, la quantité de tissu tumoral n'est pas toujours suffisante pour tester les biomarqueurs [43][44] et les rebiopsies ne sont pas toujours possibles [43][45][46]. Le pathologiste doit donc viser à préserver les tissus et à assurer un diagnostic moléculaire complet, afin que les patients éligibles puissent bénéficier d'une thérapie ciblée [44].

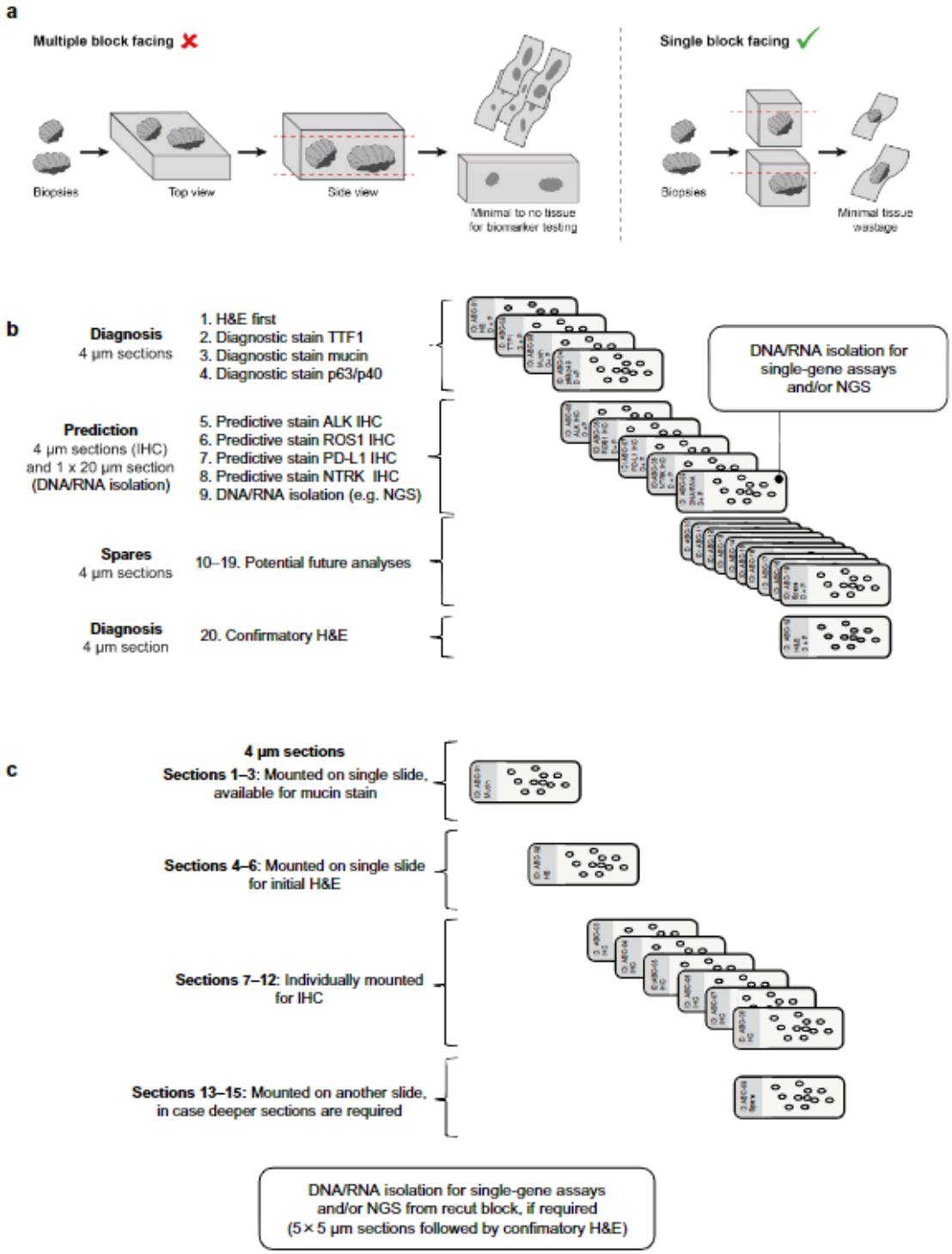


Figure 10 : Approches utilisées par le pathologiste visant à éviter le gaspillage des tissus [44]

(a) Approche "une biopsie par bloc" ; (b) Protocoles de coupe épargnant les tissus : Protocole "Diagnostic et prédiction" (D + P), tel qu'utilisé par l'auteur E. Thunnissen à Amsterdam ; (c) Une approche alternative, telle qu'utilisée par l'auteur K. Kerr à Aberdeen

V. Testing moléculaire :

V.1 Thérapies :

Depuis 1990, la chimiothérapie a été le choix thérapeutique standard pour le traitement des patients atteints de CBNPC [47][48]. En effet, ce traitement était principalement basé sur la distinction entre le CBNPC et le cancer du poumon à petites cellules.

Durant la dernière décennie de nombreux progrès ont été réalisés pour le cancer de poumon, y compris le dépistage, les techniques peu invasives pour le diagnostic et le traitement, les progrès de la radiothérapie, notamment la radiothérapie ablative stéréotaxique, les nouvelles thérapies ciblées et l'immunothérapie [49][50][51]. Ces nouveaux traitements ont montré une amélioration des taux de survie des patients atteints de CBNPC. La survie relative à 2 ans était de 42 % pendant l'année 2015/2016, contre 34% pendant l'année 2009/2010 pour le CBNPC [52]. Le taux de mortalité par cancer du poumon a chuté de 56 % chez les hommes entre l'année 1990 et 2019 ; pour les femmes une diminution de 32% a été observée entre l'année 2002 et 2019 [53]. Aujourd'hui, les patients atteints d'un cancer de poumon métastatique admissibles aux thérapies ciblées ou aux immunothérapies survivent plus longtemps ; les taux de survie à 5 ans varient de 15 % à 50 %, en fonction des biomarqueurs [54][55][51].

En 2005, l'essai de phase III BR.21 a comparé l'efficacité d'erlotinib, « inhibiteur de l'EGFR », aux meilleurs soins de support chez 731 patients atteints d'un CBNPC avancé et préalablement traités. Une amélioration significative en termes de survie globale (SG) et de survie sans progression (SSR) a été observée dans le groupe traité par l'erlotinib [56]. Et depuis, l'identification des caractéristiques moléculaires et cliniques permettant de prédire quels patients pourraient bénéficier davantage des inhibiteurs de l'EGFR, a fait l'objet de nombreuses recherches [57].

Au cours des 10 dernières années, grâce aux avancées technologiques, nos connaissances sur la biologie des tumeurs de CBNPC se sont améliorées [58]. Différentes altérations moléculaires pilotes, responsables du développement des tumeurs pulmonaires dépendantes d'oncogènes, ont été identifiées, notamment dans le sous-groupe de patients atteints d'adénocarcinome [59][5][60][61][17]. En parallèle de nombreux progrès ont été réalisés dans les stratégies thérapeutiques du CBNPC avancé, en particulier le développement de la thérapie ciblée et de l'immunothérapie. Le cancer de poumon non à petites cellules est une tumeur maligne hétérogène pour laquelle des études génomiques à grande échelle ont établi le profil d'une diversité de mutations de gènes moteurs, ces caractéristiques génétiques sont à la base

de la "médecine de précision et personnalisée". Aujourd'hui, plusieurs petits inhibiteurs de la tyrosine kinase, qui ciblent les mutations de l'EGFR (récepteur du facteur de croissance épidermique), les réarrangements d'ALK (lymphome kinase anaplasique), les fusions du ROS1 (ROS proto-oncogène 1), BRAF (v-Raf murine sarcoma viral onco-gene homolog B) V600E, NTRK (neurotrophic tyrosinereceptor kinase) 1/2/3fusion de gènes, MET (mesenchymal-epithelial transition) saut de l'exon 14, et le réarrangement RET (rearranged during transfection), ont été approuvés par l'U. US Food and Drug Administration (FDA) pour le traitement des patients atteints d'un cancer de poumon non à petites cellules présentant des mutations génétiques [62]. En effet, grâce au dépistage génomique complet, d'autres aberrations génétiques dans le CBNPC, telles que les mutations du sarcome de Kirsten (KRAS), l'amplification du récepteur-2 du facteur de croissance épidermique humain (HER2) et d'autres génotypes des gènes pilotes, ont été considérées comme hautement ciblables et étudiées dans le cadre d'essais précliniques et cliniques. En comparant l'adénocarcinome du carcinome épidermoïde, ce dernier présente rarement des mutations d'EGFR, des réarrangements d'ALK ou des fusions de ROS1, mais généralement des altérations des RTK, CDKN2A, PTEN, MLL2, HLA-A, NOTCH1 et RB1 [34][62].

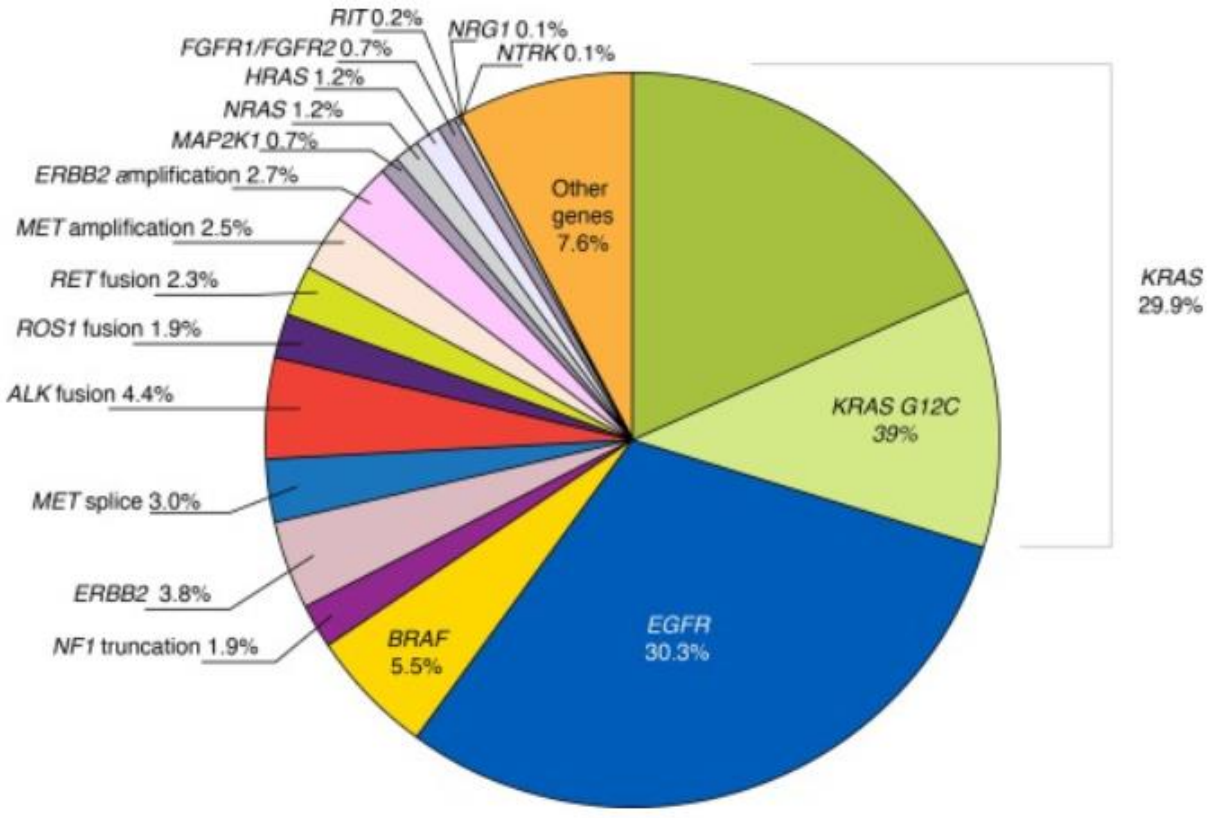


Figure 11 : Fréquence des facteurs oncogènes dans le CBNPC [63]

L'immunothérapie est une autre stratégie thérapeutique qui a permis de prolonger de manière significative la survie des patients atteints de CBNPC, en particulier ceux qui n'ont pas présenté de mutation génétique [64]. Des anticorps monoclonaux (AcM) ciblant les points de contrôle immunitaire de la mort cellulaire programmée-1 (PD-1), du ligand de la mort cellulaire programmée-1 (PD-L1) et de l'antigène associé aux lymphocytes T cytotoxiques-4 (CTLA-4) ont été approuvés pour le traitement de divers cancers, y compris le CBNPC. Cinq inhibiteurs de points de contrôle immunitaire ont été approuvés par la FDA : le nivolumab, le pembrolizumab (anticorps anti-PD-1), l'atezolizumab, le durvalumab (anticorps anti-PD-L1), et l'ipilimumab (anticorps anti-CTLA-4) [62].

Malgré le développement des stratégies thérapeutiques et l'amélioration de la survie des patients atteints de cancer de poumon non à petites cellules, certains problèmes majeurs demeurent, tels que la résistance aux thérapies ciblées et à l'immunothérapie et les combinaisons optimales des régimes de traitement actuels. En outre, avec le développement rapide des thérapies ciblées au cours des dernières années, plusieurs ITKs révolutionnaires ont été approuvés cliniquement.

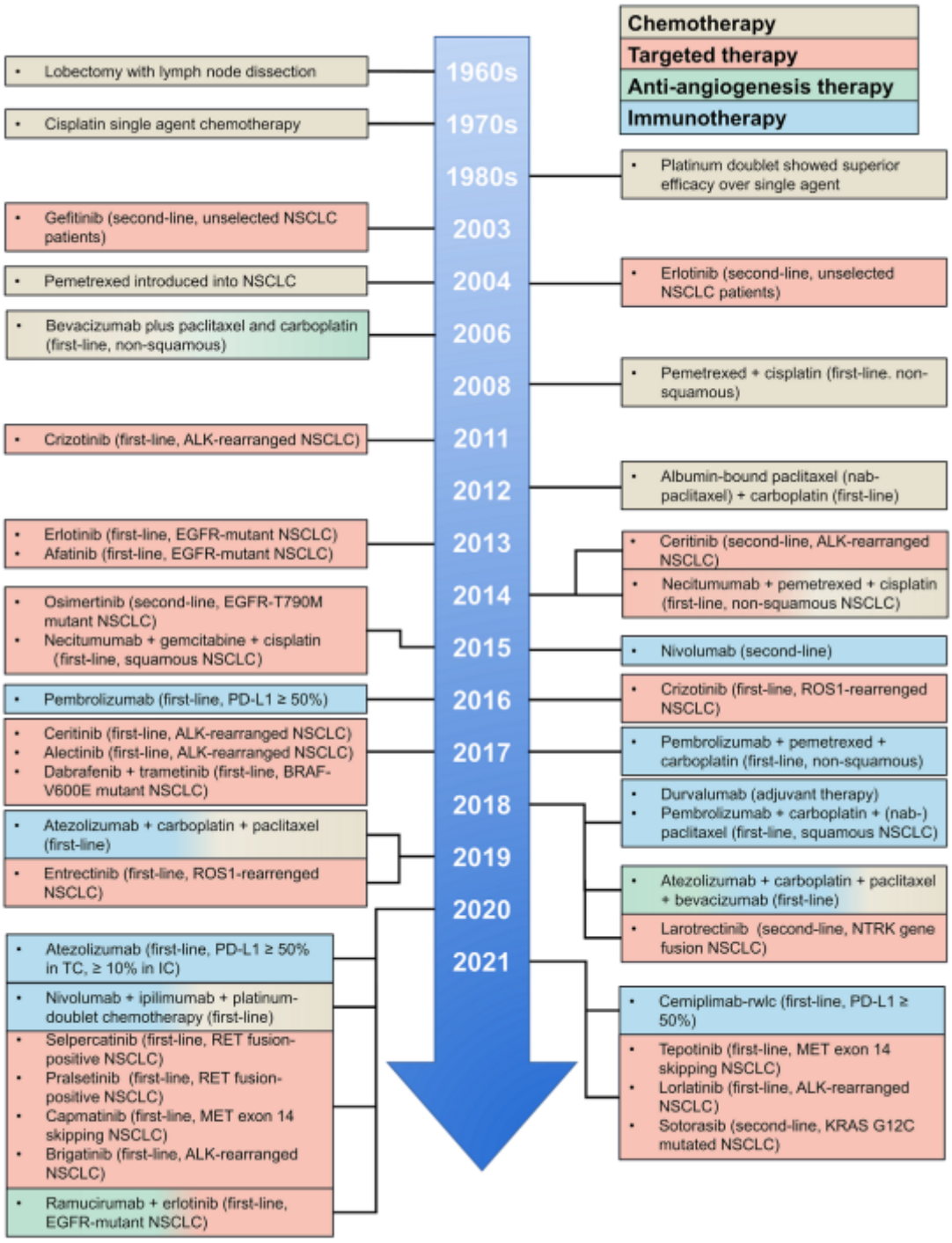


Figure 12 : Chronologie illustrant le développement des stratégies thérapeutiques du cancer de poumon non à petites cellules [62]

Avec l'avènement des ITKs ciblant les altérations génétiques des facteurs oncogènes, les traitements ciblés ont fait des tests de biomarqueurs une exigence essentielle pour garantir que les patients présentant des altérations génétiques exploitables reçoivent un traitement personnalisé. Les lignes directrices les plus récentes recommandent que les patients atteints d'un CBNPC avancé doivent subir des tests moléculaires pour détecter des altérations

génétiques spécifiques tels que l'EGFR, l'ALK, ROS1, BRAF, NTRK1/2/3, RET et les sauts de l'exon 14 du MET, et que d'autres tests doivent être envisagés pour les biomarqueurs émergents tels que l'HER2 [41][65][66]. L'écrasante majorité des CBNPC présentant des altérations génétiques au niveau des facteurs oncogènes sont des adénocarcinomes.

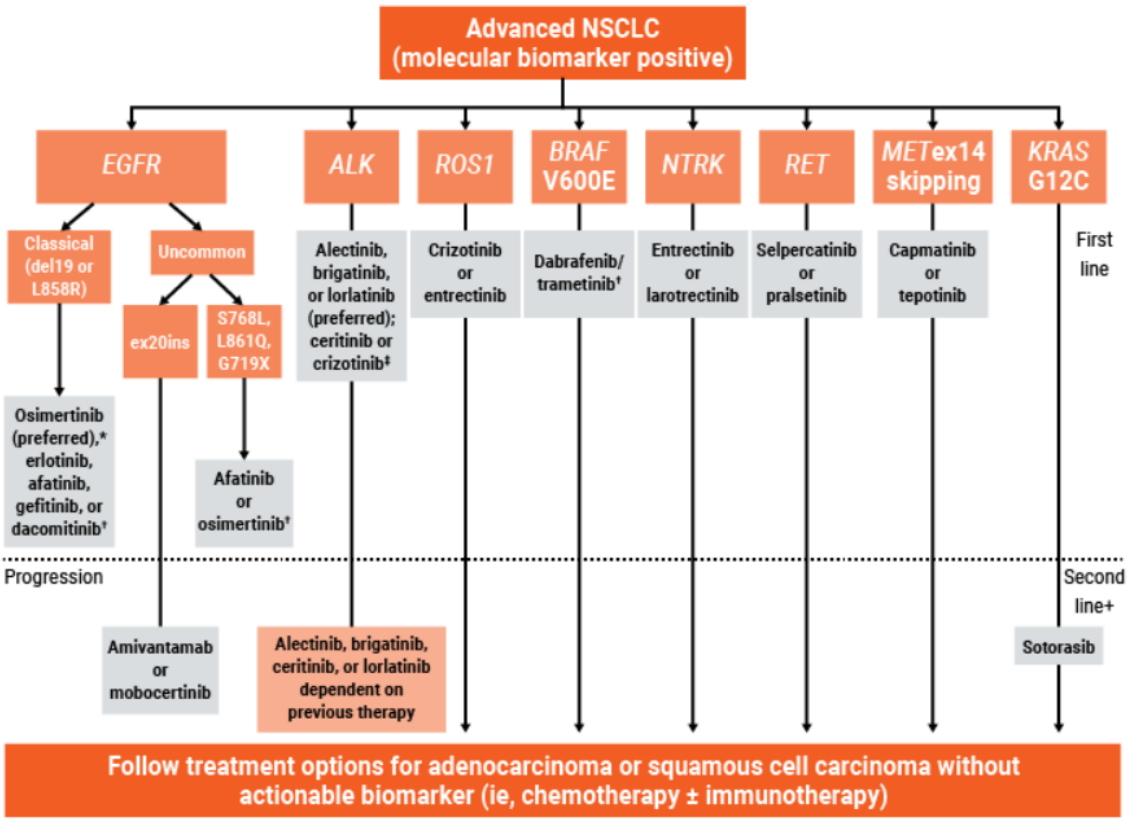


Figure 13 : 2022 paradigme de traitement du CBNPC avancés à biomarqueurs moléculaires positifs [67]

V.2 Techniques moléculaires :

Le CBNPC est une maladie hétérogène sur le plan moléculaire, une identification précoce du génotype de la tumeur est devenue indispensable. Les tests de diagnostic compagnons sont autorisés par la FDA américaine pour l'approbation des agents ciblés, afin d'identifier les altérations génomiques essentielles avant d'initier le traitement [68][69][70]. Les recommandations de la NCCN (National Comprehensive Cancer Network) consiste à un dépistage moléculaire des biomarqueurs EGFR, ALK, KRAS, ROS1, BRAF, NTRK1/2/3, MET, RET et PD-L1 pour les patients atteints d'un CBNPC.

V.2.1 Séquençage Sanger :

Mis au point à la fin des années 1970, le séquençage Sanger a été l'une des premières méthodes de détection des mutations dans le cancer de poumon, telles que les mutations EGFR et KRAS. Le séquençage Sanger, également appelé séquençage par terminaison de chaîne, est le processus de détermination de la séquence nucléotidique d'un fragment d'ADN.

Cette technique peut fournir un séquençage d'ADN de haute qualité pour presque 900 paires de bases avec une couverture en profondeur de 10 à 100×. Le séquençage Sanger est souvent la méthode orthogonale utilisée pour confirmer les résultats en raison de sa capacité à caractériser une grande variété de mutations (SNV, petites insertions / duplications / délétions / indels), mais elle est limitée par l'incapacité de détecter des modifications du nombre de copies des gènes. Il n'est pas évolutif par rapport à la NGS. Le séquençage Sanger fonctionne avec une petite quantité d'ADN d'entrée (5-10 ng), mais sa sensibilité est faible. Il exige que la variante mutante, soit présente dans au moins 20 % de l'ADN tumoral total pour être détectée. Ce processus est coûteux, long et inefficace pour le séquençage des gènes entiers ou du génome. À titre d'exemple, en utilisant la méthodologie du séquençage Sanger, le projet du génome humain achevé en 2003 a pris 10 ans et a coûté près de 3 milliards de dollars [71].

V.2.2 PCR en temps réel :

La PCR quantitative en temps réel est une méthode qui comprend à la fois l'amplification et l'analyse d'une séquence nucléotidique à partir d'une simple copie d'ADN, sans qu'il soit nécessaire de recourir aux étapes post PCR de la méthode Sanger.

Aujourd'hui, il existe plusieurs KIT commerciaux qui combine le cyclage thermique avec l'acquisition de la fluorescence, tel que le kit therascreen® EGFR (Qiagen) qui comprend un test de PCR en temps réel spécifique de l'allèle. Pour le gène EGFR, il a été conçu pour détecter 29 mutations dans les exons 18, 19, 20 et 21 du gène. Le kit therascreen® utilise les technologies ARMS (amplification-refractory mutation system) et Scorpions pour la détection de ces mutations [72]. À l'heure actuelle, la PCR à système réfractaire d'amplification (ARMS-PCR) et la technologie de séquençage de nouvelle génération (NGS) sont des méthodes de détection couramment utilisées dans la pratique clinique pour détecter les mutations génétiques ciblées. La technologie ARMS-PCR présente une très haute sensibilité (jusqu'à 1% de cellules tumorales), une spécificité élevée, et le taux de détection de la mutation génétique dépasse de loin la PCR traditionnelle. Elle est devenue l'une des

techniques les plus connues et les plus utilisées pour la détection moléculaire personnalisée des tumeurs.

La technologie ARMS-PCR et la NGS ont été recommandé par la NCCN pour la détection des mutations génétiques préalable au traitement ciblé du cancer de poumon non à petites cellules [73].

V.2.3 Pyroséquençage :

Le pyroséquençage est également connu sous le nom de "séquençage par synthèse" utilise la détection chimioluminescente du pyrophosphate inorganique pour détecter les ajouts de bases spécifiques. Il s'agit d'une méthode de détection d'ADN mutant rapide et sensible qui utilise une matrice contenant la région d'intérêt, des amorces, une ADN polymérase et un ensemble d'enzymes/substrats (ATP sulfurylase, luciférase, apyrase, adénosine 5'phosphosulfate et luciférine). Comparé au séquençage Sanger, le pyroséquençage est une technique sensible qui permet de détecter des mutations dans des échantillons de tumeurs à partir de 5 % de cellules tumorales (comme c'est souvent le cas lorsque le matériel tumoral est hétérogène et mélangé avec le tissu normal adjacent). Le pyroséquençage est surtout utilisé pour détecter les SNV et est limité par son incapacité de détecter les modifications du nombre de copies de gènes et des modifications chromosomiques structurelles [72].

V.2.4 Détection des fusions des gènes :

L'une des avancées les plus remarquables en matière de médecine personnalisée pour le cancer de poumon non à petites cellules est la possibilité de détecter les gènes de fusion avec des panels ciblés utilisant l'ARN. Jusqu'à présent, les réarrangements des gènes ALK, RET et ROS1 sont analysés par des techniques d'IHC et/ou de FISH, néanmoins, ces deux méthodes sont limitées par leurs incapacité d'identification des partenaires de fusion [74][75], essentielle dans la prise de décision thérapeutique [76][77][78][79].

L'immunohistochimie (IHC) peut jouer le rôle d'un remplaçant des tests moléculaires couteux, en particulier pour l'ALK, ROS1 et NTRK [80][69]. Aujourd'hui, le Ventana ALK D5F3 CDx Assay est un test d'IHC approuvé par la FDA américaine pour les inhibiteurs d'ALK [81][82]. Les tests immunohistochimiques moléculaires spécifiques ont un énorme potentiel en tant qu'outils de dépistage pratiques pour la détection d'altérations génétiques et pour l'évaluation des biomarqueurs prédictive d'une thérapie moléculaire ciblée. Par rapport à d'autres techniques, l'immunohistochimie présente un certain nombre d'avantages, notamment le fait d'être largement disponible, techniquement moins difficile et rentable avec un délai

d'exécution rapide. La technique FISH est une méthode coûteuse, longue et difficile à interpréter. Pour les réarrangements rares ROS1 ou RET, la FISH est secondairement réalisée lorsque l'analyse des mutations est négative.

Dans la pratique clinique, la faible quantité de matériel tumoral ne permet pas toujours une étude approfondie de toutes les cibles putatives. De nouveaux panels de fusion NGS sont désormais disponibles, offrant la possibilité d'étudier les réarrangements à partir de faibles quantités d'ARN. Cette technique a pour avantage la possibilité de détecter tous les partenaires de fusion ou un sous-ensemble de partenaires fréquents et sur le nombre de fusions analysées [83]. Ces données suggèrent que la NGS peut constituer une alternative efficace et précise au test FISH pour la détection des réarrangements d'ALK et de ROS1 en routine clinique, et offre la possibilité d'un dépistage à grande échelle pour d'autres réarrangements rares ayant une valeur clinique potentielle [83].

V.2.5 Le séquençage de nouvelle génération :

Le séquençage de nouvelle génération (NGS) est une technologie complète utilisée pour l'analyse des séquences d'ADN et de l'expression des gènes ARN. La technique NGS a été développée pour surmonter les limites du séquençage Sanger, aujourd'hui, elle est utilisée dans tous les domaines de la recherche génomique [84].

Le principe du séquençage de nouvelle génération repose sur l'électrophorèse capillaire, il est similaire à celui de la méthode de séquençage Sanger. Les brins génomiques sont d'abord fragmentés et les signaux émis sont utilisés pour l'identification de chaque fragment qui est couplé à un brin matrice [85]. La NGS implique plusieurs étapes : la fragmentation, la préparation de la bibliothèque, le séquençage et l'analyse bioinformatique.

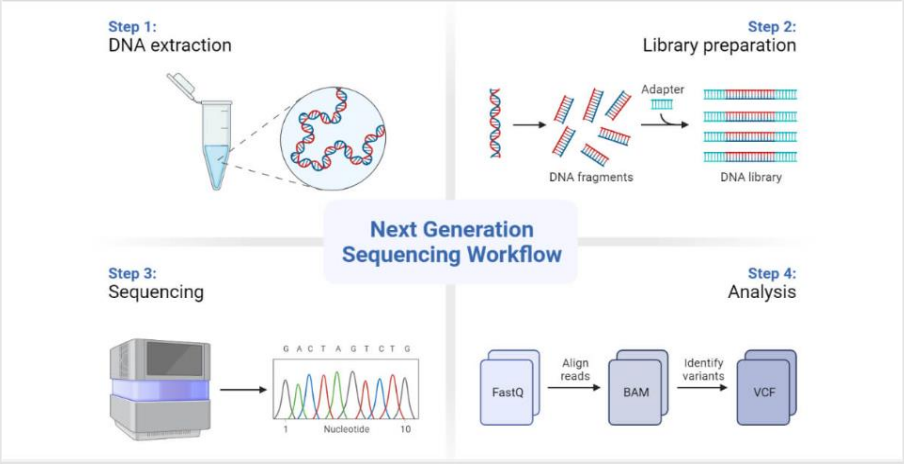


Figure 14 : Les étapes du séquençage nouvelle génération

La NGS présente de multiples avantages qui en ont fait d'elle un outil essentiel dans tous les domaines de la recherche et en clinique [86]. Cependant, même après plus de 15 ans de développement, cette technique présente certains inconvénients, comme la nécessité de disposer d'outils bioinformatiques puissants et d'un personnel spécialisé pour l'expérimentation et l'analyse des données [87].

Tableau 4 : Avantages et inconvénients de la technologie NGS

Advantages	Disadvantages
Low price	Need for specialized software and computers for data analysis
Short time from library preparation to results	No standardization or availability of standardized material for clinical application
Variety of applications	Still expensive in some developing countries
Useful both in research and clinic	
High number of commercially available NGS platforms and specialized kits	

Les tests moléculaires classiques du diagnostic du CBNPC donnent de nombreux résultats faut négatifs pour différentes raisons, telles que la qualité et la quantité des échantillons et/ou la sensibilité du test. Le séquençage nouvelle génération peut surmonter ces limites par sa sensibilité et spécificité élevées, en utilisant une faible quantité d'échantillon. Le cancer du poumon est l'un des cancers qui présente un degré élevé de charge mutationnelle et un nombre accru de mutations induites. La NGS représente la seule méthode, qui peut couvrir un nombre accru d'altérations moléculaires simultanément à partir de la même quantité d'échantillon. Grace au développement de différents panels NGS est sa mise en œuvre dans le cadre clinique, la méthode NGS est aujourd'hui principalement utilisée pour évaluer l'altération des gènes clés impliqués dans le développement du cancer de poumon (EGFR, BRAF, KRAS, HER2, ROS, ALK, PIK3CA, NTRK, RET et MET) [83][87].

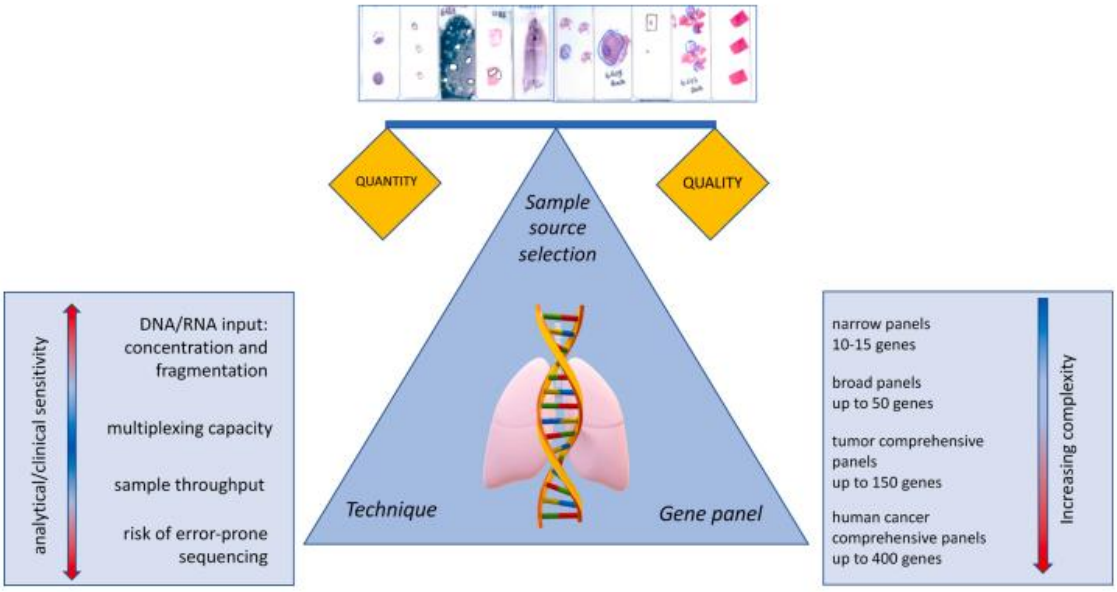


Figure 15 : La technique NGS dans le cancer bronchique non à petites cellules

La technologie NGS est fondamentale pour un large profilage moléculaire du CBNPC et l'oncologie de précision. Sa puissance clinique est strictement liée au meilleur choix de l'échantillon, de la technique et du panel pour chaque patient, comme un triangle magique.

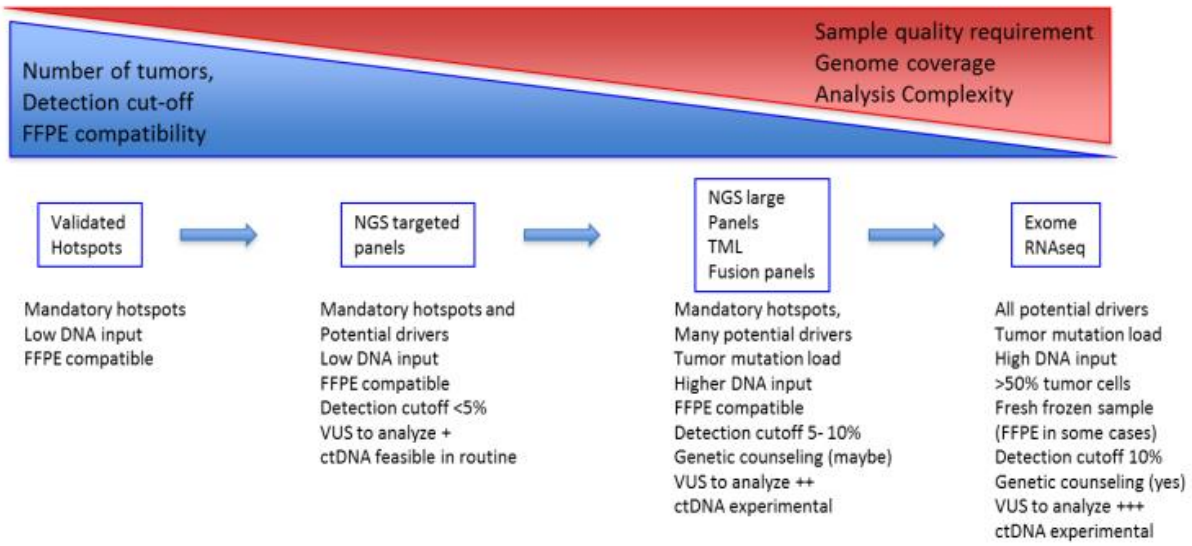


Figure 16 : Les options de dépistage moléculaire du cancer du poumon [83]

Les principales applications de la NGS en clinique sont liées à la génomique, la transcriptomique et l'épigénomique. L'analyse du génome entier, de l'exome entier ou de l'ADN ciblé permet d'identifier des informations spécifiques sur les mutations ponctuelles, les altérations du nombre de copies, les petits indels ou les altérations de la variance structurelle. L'analyse seq de l'ARN peut fournir des informations relatives aux fusions de gènes, à

l'épissage alternatif, à l'expression différentielle ou à l'édition de l'ARN, tandis que la seq Bisuphite ou la seq ChIP sont utilisées pour identifier le profil de méthylation, les modifications des histones ou les altérations de la liaison des facteurs de transcription [87].

V.2.6 La biopsie liquide :

Une autre méthode de détection a été approuvée par la FDA américaine est la biopsie liquide [88]. Bien que la biopsie tissulaire reste le gold standard du diagnostic, la biopsie liquide offre un moyen de diagnostic continental et précoce par les fluides corporels [89]. Lorsque le tissu tumoral est limité, un dosage de l'ADN tumoral circulant (ADNtc) peut être utilisé pour l'identification de certaines mutations génomiques, y compris l'EGFR [90].

L'ADN libre circulant (ADNfc) désigne l'ADN extracellulaire libéré dans la circulation sanguine par les cellules apoptotiques et nécrotiques dans des conditions physiologiques et pathologiques. En général, l'ADNfc a une demi-vie limitée (~15 min) car il est rapidement dégradé par les endonucléases circulantes ou phagocyté par les macrophages. Dans les tumeurs, le renouvellement rapide des cellules cancéreuses entraîne une libération et une accumulation constantes d'ADNtc et d'ADNfc dans le microenvironnement tumoral et dans les fluides corporels [91][92]. L'ADNtc peut être un fragment d'ADN simple ou double brin (130-140 pb), représentant 0,1-10 % de l'ADNfc total. L'ADNtc est libéré par les cellules tumorales apoptotiques et nécrotiques, mais aussi par les cellules tumorales vivantes et circulantes [93][94]. En outre, l'ADNtc se distingue de l'ADNfc par des modifications liées au cancer, telles que des mutations somatiques, des altérations du statut de méthylation et des variations du nombre de copies [95]. La détection de l'ADNtc dans la biopsie liquide peut refléter les altérations génétiques et épigénétiques dans les échantillons de tissus tumoraux [96]. En outre, de nombreuses caractéristiques du cancer (taille, stade, localisation, vascularisation et réponse au traitement) sont corrélées aux concentrations d'ADNtc [97][98]. Bien que les niveaux d'ADNtc soient inférieurs à ceux de l'ADNfc, plusieurs technologies ont été développées pour identifier uniquement l'ADNtc. À ce jour, la qPCR et les tests fluorescents représentent les méthodes standard pour la détection de l'ADNtc. D'autres techniques tels que ddPCR et la NGS ont récemment été proposées comme des technologies plus sensibles et spécifiques pour l'analyse de l'ADNtc dans les échantillons de biopsies liquides [99].

Dans le CBNPC, la biopsie liquide, utilisant l'ADNtc du plasma a le potentiel de surmonter de nombreuses limitations des tests NGS basés sur les tissus [100]. En particulier, le délai

d'exécution est souvent beaucoup plus rapide que celui des tests NGS sur tissus, principalement en raison de sa simplicité et de la réduction des exigences en matière de traitement des échantillons. Du point de vue du patient, elle est peu invasif et offre une plus grande commodité et acceptabilité [101].

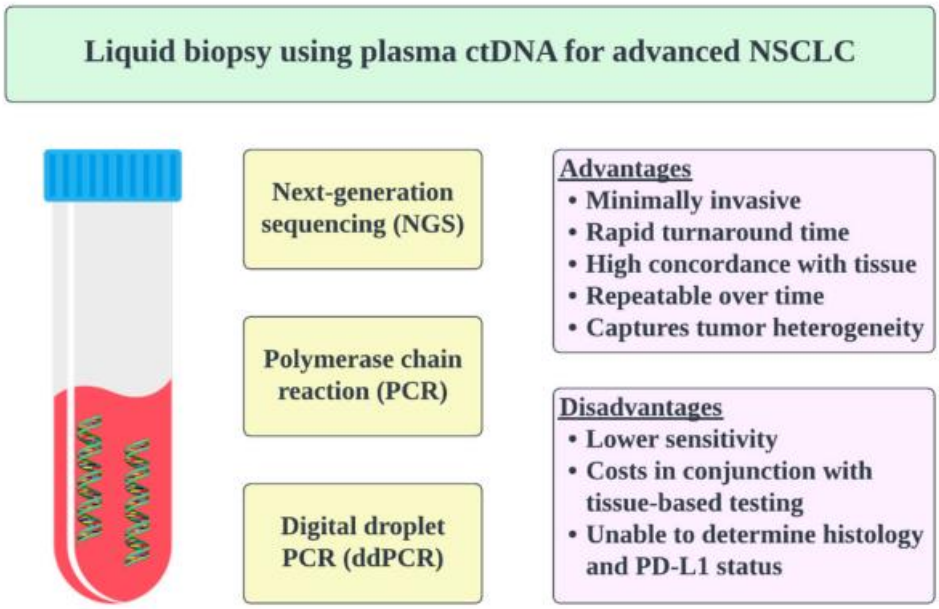


Figure 17 : Avantages et inconvénients de la biopsie liquide dans le diagnostic moléculaire du CBNPC

Les biopsies liquides peuvent être obtenues à partir de plusieurs fluides corporels, notamment le sang, l'urine, la salive et les épanchements, et d'une série d'analytes, tels que l'ADN/ARN libre de cellules, les cellules tumorales circulantes et les vésicules extracellulaires. Cependant, à l'heure actuelle, les biopsies liquides utilisant l'analyse d'ADNc plasmatique sont les plus développées dans le domaine de l'oncologie. Il a été démontré que le génotypage de l'ADNc présente une spécificité analytique et une valeur prédictive positive élevées par rapport aux tests basés sur les tissus [102][103][104][105], et la faisabilité de l'utilisation des biopsies liquides a été confirmée dans de nombreux contextes [105][106]. En effet, plusieurs tests de biopsie liquide sont maintenant approuvés en tant que tests de diagnostiques compagnons pour des thérapies ciblées approuvées, ce qui facilite le recours accru à la biopsie liquide dans la pratique clinique standard [101].

Le moment du prélèvement et de l'analyse du plasma par la biopsie liquide ont également contribué à l'amélioration de l'algorithme du diagnostic du CBNPC avancé. La biopsie liquide précoce au moment de la biopsie tissulaire a permis d'accélérer l'initiation du traitement de première ligne [107]. Chez les patients présentant un CBNPC avancé symptomatique,

l'initiation précoce du traitement peut permettre un meilleur contrôle des symptômes, une meilleure qualité de vie, fournir un accès rapide au traitement pour prévenir une détérioration rapide et réduire l'anxiété du patient. En outre, la réduction du besoin des tests tissulaires, la diminution du nombre de biopsies tissulaires répétées et la limitation de l'initiation d'autres thérapies systémiques moins efficaces sont d'autres avantages potentiels. En outre, aujourd'hui il existe de plus en plus de preuves de l'utilisation prospective des biopsies liquides en tant que biomarqueur prédictif dans l'évaluation de la réponse et de la résistance au traitement chez les patients atteints de CBNPC [101].

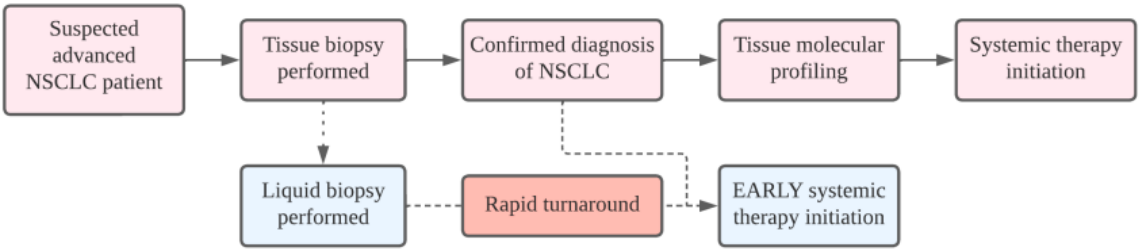


Figure 18 : Algorithme de test diagnostic potentiel pour le cancer de poumon non à petites cellules avancé intégrant la biopsie liquide

Les tests moléculaires deviennent de plus en plus importants dans la pratique clinique. Le choix de la méthode appropriée pour un diagnostic rapide est devenu crucial dans la prise de décision thérapeutique pour les patients atteints du CBNPC.

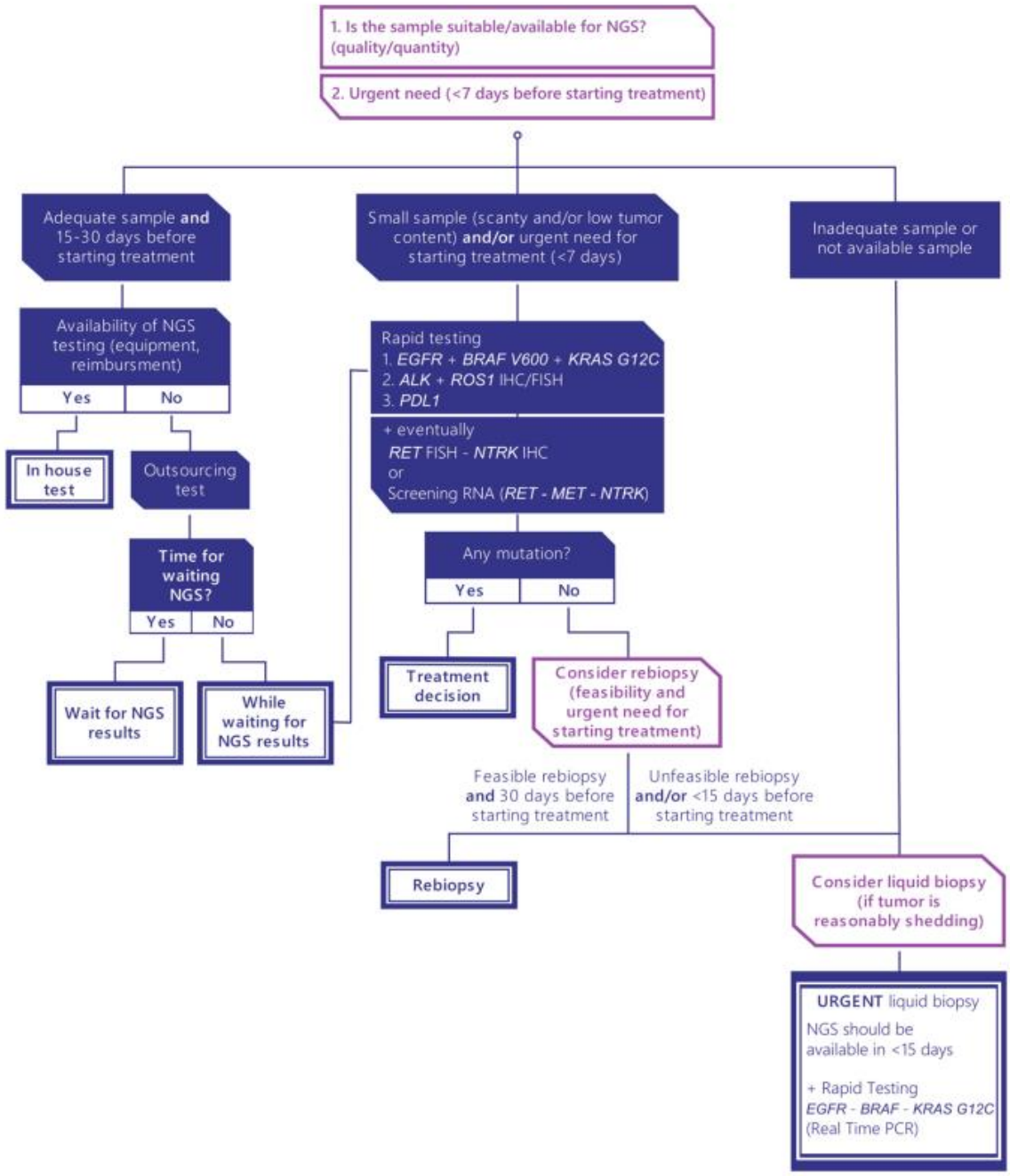


Figure 19 : Proposition d'algorithme pour l'analyse moléculaire du CBNPC dans la pratique de routine

VI. Biomarqueurs :

VI.1 Le récepteur à l'EGF :

Le récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR) est l'un des quatre récepteurs à activité tyrosine kinase de la famille des récepteurs ERBB ou HER [11][108]. Le gène EGFR est constitué de 188 306 paires de bases (pb) et code pour une glycoprotéine transmembranaire qui agit comme un récepteur de surface cellulaire exprimé dans divers tissus d'origine épithéliale, mésenchymateuse et neuronale [109]. La protéine codée par le gène EGFR est un récepteur membranaire cellulaire de 170 kilo Daltons (kDa), composé d'un domaine extracellulaire N-terminal riche en cystéine permettant la fixation du ligand, d'un domaine transmembranaire à une seule hélice alpha et d'un domaine intracellulaire C-terminal à activité tyrosine kinase (Figure 20) [109]. Le rôle crucial de l'EGFR dans le développement normal a été illustré par une série de modèles de souris knock-out. En effet, selon leur bagage génétique, les souris dépourvues d'EGFR meurent entre le jour 11 et le jour 20 de la gestation après la naissance, elles présentent également des anomalies placentaires, une immaturité pulmonaire et diverses anomalies au niveau de l'os, du cerveau, du cœur, du tractus gastro-intestinal, de la peau, des follicules pileux et des yeux [110].

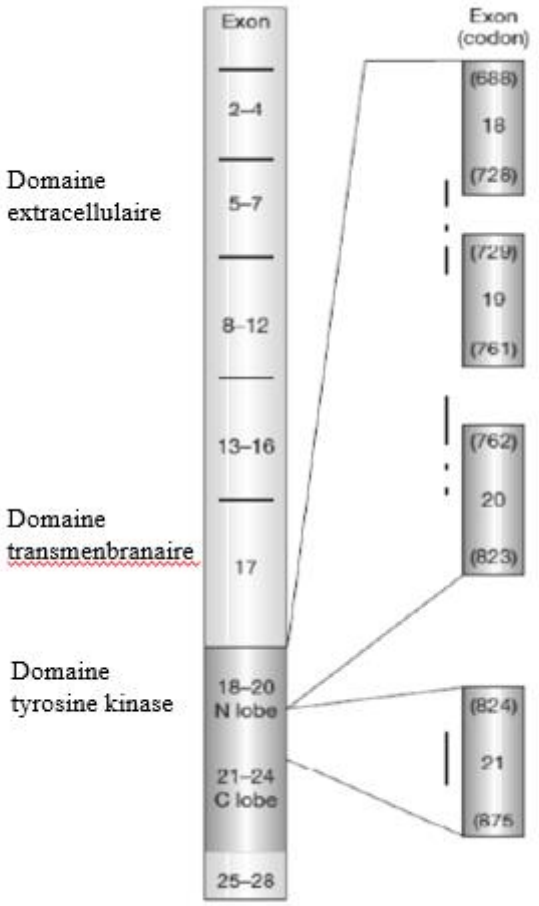


Figure 20 : La structure du gène EGFR et les domaines protéiques qu'il code

Il existe trois domaines principaux : le domaine extracellulaire riche en cystéine (exons 2-16), la région transmembranaire (exon 17) et le domaine tyrosine kinase, codé par les exons 18 à 24

VI.1.1 Les voies de signalisation du récepteur à EGF :

La voie de signalisation cellulaire du gène EGFR a été découverte par Stanley Cohen dans les années 1960, aujourd'hui elle est devenue l'une des voies cellulaires les mieux caractérisées [13]. La liaison du facteur de croissance épidermique, ou d'un autre ligand, au domaine extracellulaire de l'EGFR induit une homo-dimérisation ou une hétéro-dimérisation avec d'autres membres de la famille ERBB [111]. La formation de ces dimères entraîne des changements de conformation qui activent le récepteur et induisent l'activité catalytique tyrosine kinase du domaine tyrosine kinase intracellulaire [11]. Après dimérisation du récepteur, une autophosphorylation des résidus tyrosines du domaine intracellulaire, permet la production des sites phosphotyrosine nécessaires pour la liaison des protéines adaptatrices avec les phosphoprotéines du récepteur activé [112], ce qui permettra par la suite la transduction du signal de la surface cellulaire au noyau en aval de l'activation de plusieurs

voies de signalisation : RAS/RAF/MEK/ERK, PI3K/AKT (phosphatidylinositol 3-kinase) et PLC (phospholipase C) [111].

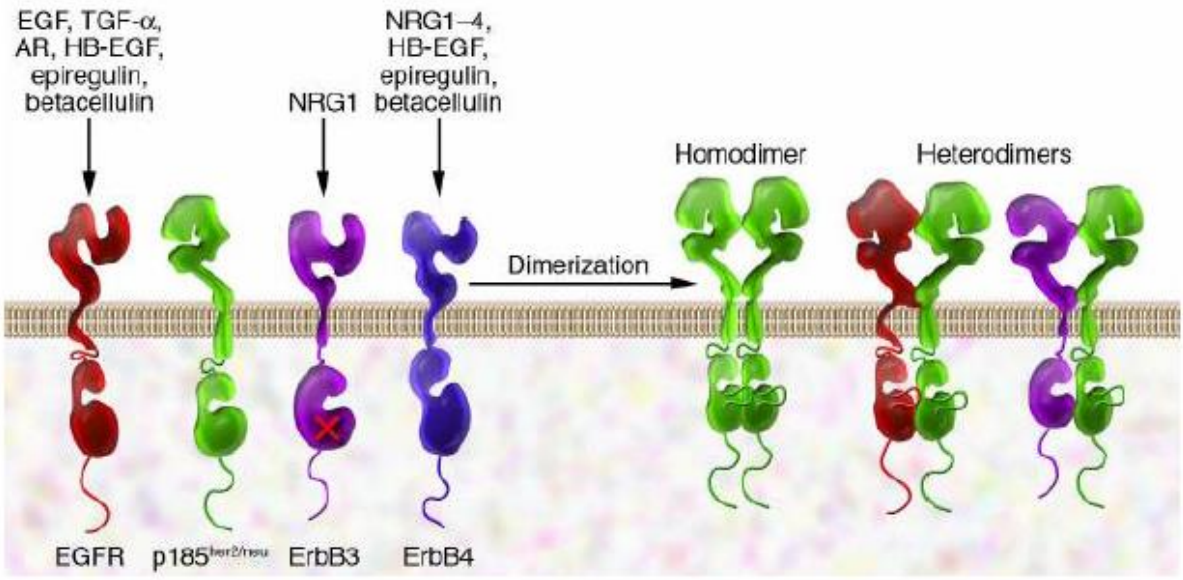


Figure 21 : Les récepteurs de la famille HER/ERBB et ses ligands

L'activation de l'EGFR entraîne des réponses biologiques différentes en fonction de la voie de signalisation activée, suite à la nature de la dimérisation [113]. Par exemple, la voie RAS/RAF/MAP est préférentiellement activée par l'homodimère EGFR/EGFR, tandis que les voies PLC et PI3K/AKT sont activées par l'hétérodimère EGFR/HER2 qui favorise une prolifération cellulaire plus importante.

La voie RAS-RAF-MEK-ERK MAPK représente la voie la plus importante dans la médiation de la réponse biologique du récepteur à l'EGF. Les proto-oncogènes RAS et RAF résident dans cette voie. La protéine MEK est une cible majeure des traitements anticancéreux. ERK MAPK (protéine kinase activée par des agents mitogènes) interagit avec plus d'une centaine de substrats pour initier un large éventail de réponses physiologiques et pathologiques, notamment la croissance, la prolifération, la différenciation, la migration et l'inhibition de l'apoptose [110]. Alors que la cascade de signalisation PI3K-AKT-mTOR contrôle le métabolisme, la prolifération, la taille, la survie et la motilité des cellules [110].

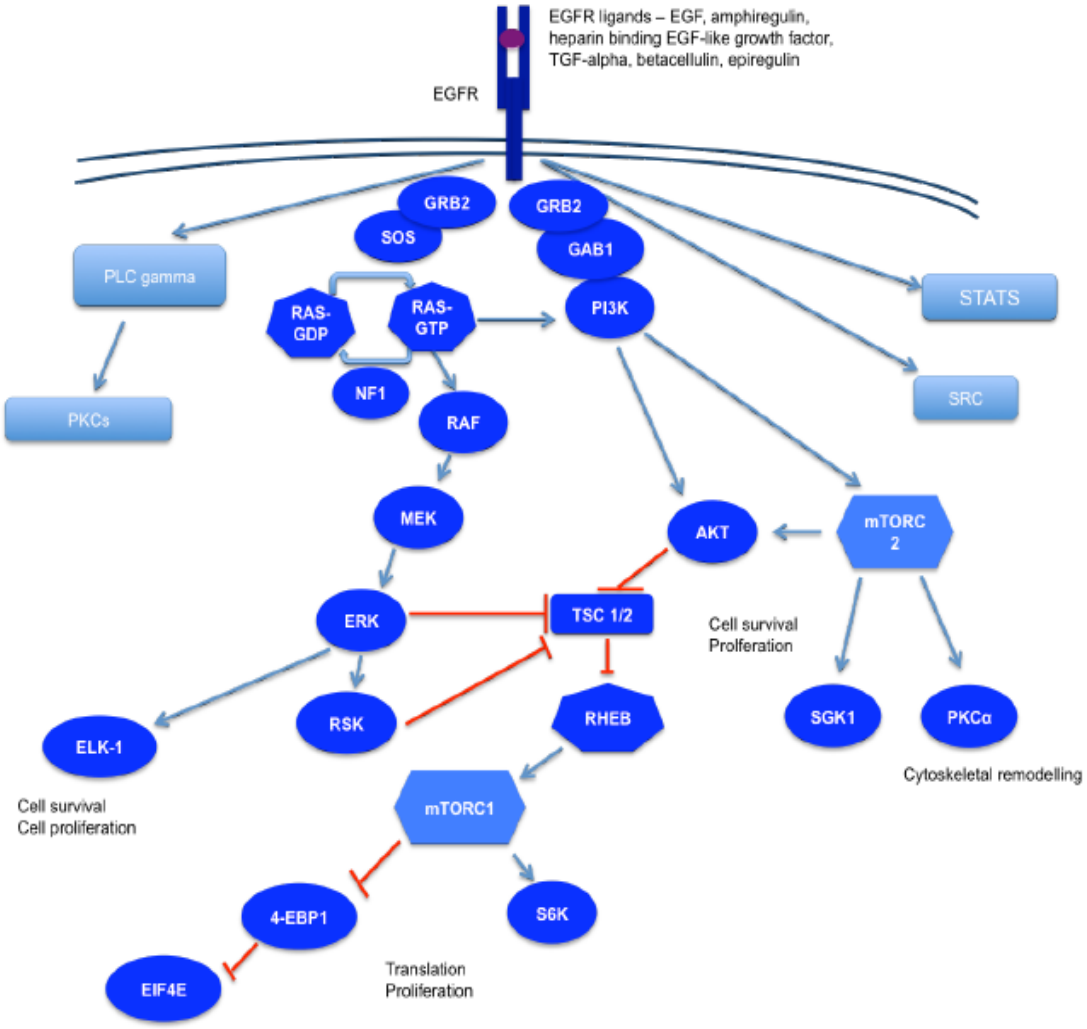


Figure 22 : Les voies de signalisation clés activées par le récepteur à EGF

VI.1.2 Dérégulation et la carcinogenèse du gène EGFR :

Vu le rôle majeur que joue l'EGFR dans la croissance et le développement cellulaires, il a été suggéré que le dérèglement du gène ou de la protéine EGFR est impliqué dans le processus de la carcinogenèse. Cette hypothèse a été confirmée dans les années 1980, il a été démontré que la surexpression d'EGFR est associée à des stades avancés de la maladie, à une résistance aux traitements conventionnels et à un mauvais pronostic [114].

La protéine EGFR est surexprimée dans une variété de tumeurs malignes humaines, notamment celles du cou, de l'ovaire, du col de l'utérus, de la vessie, de l'œsophage, de l'extomac, du cerveau, de l'endomètre, du côlon, du sein, du pancréas et du CBNPC [115]. La surexpression de l'EGFR a été détectée dans 40 % à 89 % des cas de CBNPC, avec un taux élevé (89%) chez les patients atteints d'un carcinome épidermoïde, et faible pour les adénocarcinome pulmonaires (41%) [116][115].

Le gène EGFR est non seulement surexprimé dans de nombreux cancers, mais également peut être altéré [117]. La voie de signalisation de l'EGFR est l'une des voies les plus étudiées et les plus déréglées dans de nombreux cancers humains [118]. L'activité aberrante du gène EGFR et des voies de signalisation en aval sont impliquées dans le développement de plusieurs caractéristiques de la cellule tumorale, notamment la prolifération cellulaire incontrôlée, la survie, l'invasion, l'angiogenèse et, les métastases [13][119].

VI.1.3 Les mutations du gène EGFR :

Les mutations somatiques du gène EGFR dans les adénocarcinomes pulmonaires ont été décrites pour la première fois en 2004, par deux groupes distincts de chercheurs [120]. Ces mutations ont été trouvées dans 49,1 % des cas en Asie et 12,8% des patients en Europe [121]. Les mutations EGFR surviennent au niveau de la poche d'ATP dans la région tyrosine kinase qui correspond aux exons 18 à 21. Ces mutations sont subdivisées en trois grandes classes. La classe I des mutations comprennent les délétions de l'exon 19, ces délétions entraînent la perte de quatre à six acides aminés (E746 à S752), et représentent environ 44 % de toutes les mutations tyrosine kinase du gène EGFR. Les mutations de la classe II sont des substitutions mononucléotidiques qui entraînent des changements au niveau des acides aminés. La mutation ponctuelle la plus fréquente se situe dans l'exon 21 (L858R), l'acide aminé arginine est remplacé par la leucine au codon 858. La classe III des mutations présente des duplications et/ou des insertions qui surviennent généralement dans l'exon 20. Les délétions de l'exon 19 centrée sur les codons 746-750 (delE746-A750) (mutations classe I) et, la mutation ponctuelle de l'exon 21 (p.L858R) (mutation classe II) constituent plus de 90 % des mutations connues sensibilisantes du gène EGFR [122][123].

Les mutations ponctuelles au niveau de l'exon 18 (p.G719A, p.G719C, p.G719S) et, les exons 20 et 21 (p.T790M, p.L861X respectivement) ainsi que, les insertions de 1 à 3 acides aminés au niveau de l'exon 20 et des insertions au niveau de l'exon 19 sont considérées comme des mutations rares du gène EGFR [124]. Dans les CBNPC, les mutations EGFR sont fréquemment retrouvées dans les adénocarcinomes pulmonaires [125] et notamment ceux caractérisés par une architecture glandullaires, comme les soutypes à prédominance acinaire, lépidique, papillaire et micropapillaire [126][127][128] . On les trouve également dans les contingents glandulaires des carcinomes adénosquameux mais, rarement dans les carcinomes épidermoïdes et les carcinomes à grandes cellules [129][130]. Ces mutations sont fréquemment associées au sexe féminin et au statut non tabagique [131]. Il est supposé que chez les non-fumeurs, ces mutations jouent un rôle essentiel dans la carcinogenèse [132].

La majorité des mutations rares du gène EGFR sont des mutations simples, tandis que certaines sont présentent sous forme des mutations composées. Les mutations composées sont des combinaisons de deux mutations différentes, dont l'une est souvent rare et l'autre est une mutation fréquente. Dans de rares cas, les deux mutations peuvent être des mutations rares [133]. Des mutations composées constituées d'une délétion au niveau de l'exon 19 et d'une substitution L858R ont également été signalées [134][135][136]. Les mutations composées les plus fréquemment signalées sont une combinaison de deux des cinq mutations suivantes : L858R, E709X, G719X, L861X et S768I. En fonction des populations, les mutations composées pourraient représenter de 2 à 14 % du total des mutations du gène EGFR [133].

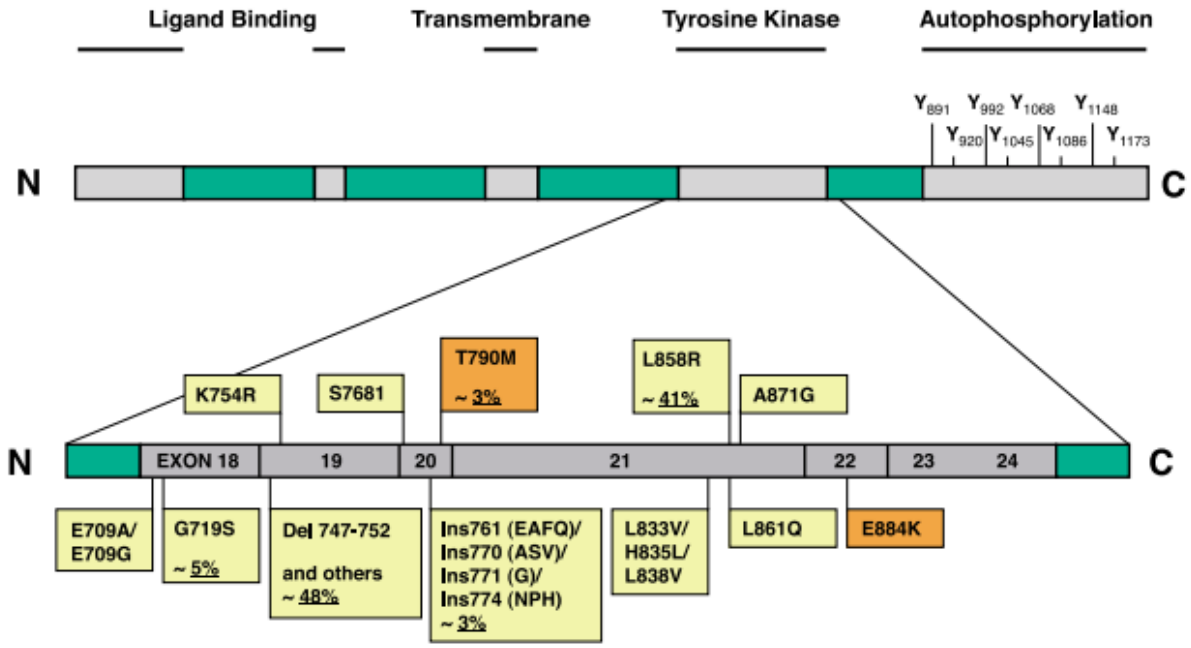


Figure 23: Mutation du domaine tyrosine kinase dans le CBNPC

Les mutations du récepteur à l'EGF aboutissent à un gain de fonction, la protéine produite par un gène EGFR muté possède une activité aberrante du domaine tyrosine kinase [110]. La présence d'une mutation EGFR perturbe les interactions auto-inhibitrices au sein du domaine TK et provoque par conséquent une augmentation de la phosphorylation de la protéine EGFR muté par rapport à la protéine de type sauvage [137]. Dans les conditions physiologiques normale, la liaison du ligand au récepteur est nécessaire pour l'activation du récepteur, la présence des mutations EGFR au niveau du domaine tyrosine kinase permettent une activation indépendante du récepteur [138]. Cette activation agit comme un moteur oncogène dans les cellules tumorales, entraînant une transduction du signal constitutive et une augmentation de la signalisation en aval. Les mutations activatrices du gène EGFR induisent une activation différentielle du domaine tyrosine kinase. La substitution L858R qui se trouve

dans la boucle d'activation d'EGFR, entraîne une augmentation de l'activité tyrosine kinase du récepteur de 20 à 50 fois plus que la protéine sauvage (WT) [139]. Alors que la protéine EGFR avec les délétions au niveau de l'exon 19 (E746-A750del) est 29 fois plus active que la forme sauvage [140]. La mutation L858R et les délétion exon19 diffèrent également dans leur affinité pour l'ATP, l'EGFR avec délétion de l'exon 19 présente une affinité à l'ATP 10 fois supérieure à la substitution L858R, et par conséquent un taux d'auto-phosphorylation plus élevé [141][142][143]. Ainsi, par l'activation constitutionnelle des voies de signalisation de l'EGFR, ces mutations confèrent un avantage sélectif aux cellules malignes de devenir dépendantes au gène EGFR [144][145]. En effet, pour maintenir leur survie les cellules tumorales ont besoin d'une signalisation anti-apoptotique élevée médiée par l'EGFR. Par conséquent, en développant leur malignité, ces cellules deviennent plus dépendantes de l'activation oncogène de l'EGFR et constituent donc une cible idéale pour les thérapies [146].

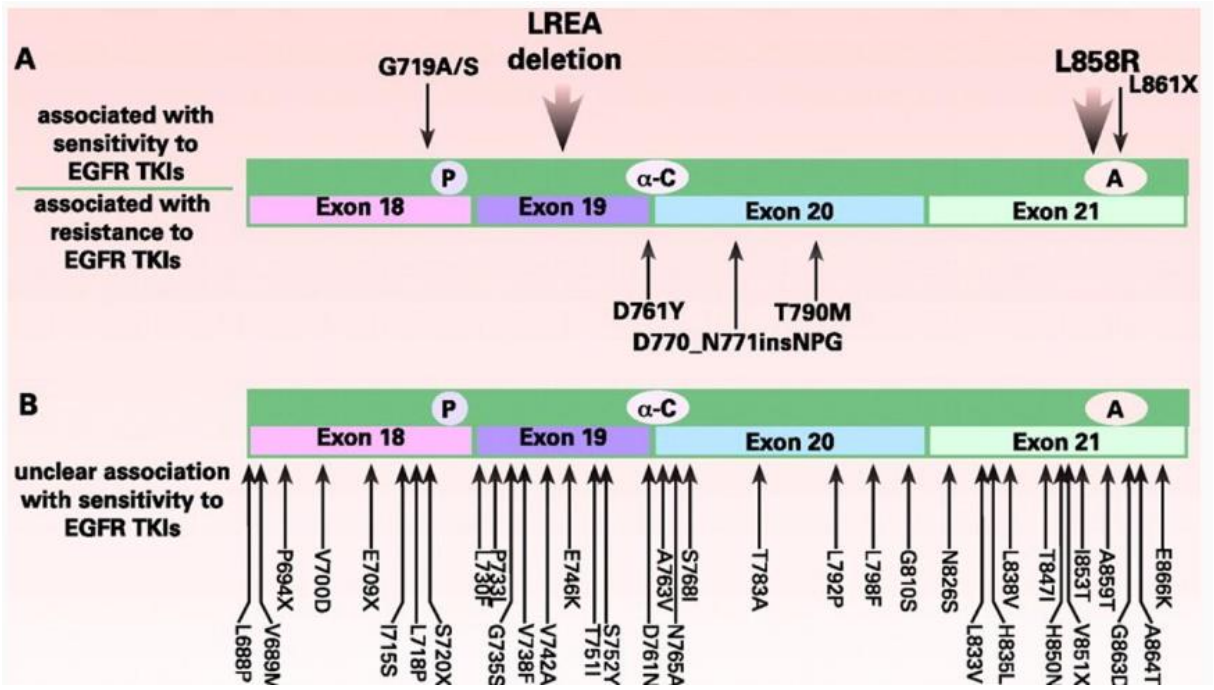


Figure 24 : Localisation des différentes mutations EGFR et leur valeur prédictive de la réponse aux thérapies ciblées

VI.1.4 Mutations de résistance :

Les ITKs d'EGFR représentent les premiers médicaments moléculaires ciblés, conduisant à un changement de paradigme dans la prise en charge des patients atteints du CBNPC avancé. Les patients présentant des mutations sensibilisantes telles que les délétions d'exon 19 ou la mutation L858R de l'exon 21, ont montré des réponses spectaculaires et durables aux ITK d'EGFR de première et deuxième génération. Cependant, presque la majorité des cas qui

répondent initialement développent une résistance aux médicaments et une progression de la maladie. Au cours de la dernière décennie, la recherche translationnelle a permis d'identifier plusieurs mécanismes majeurs de la résistance aux ITKs [147].

La résistance aux ITKs peut être classée en deux grandes catégories : intrinsèque et acquise. La résistance intrinsèque représente 20 à 30% des cas, elle est liée à une faible réponse initiale aux ITKs [148]. Elle peut être attribuée à des mécanismes de novo préexistants, dépendants ou indépendants de l'EGFR, tandis que la résistance acquise peut apparaître sous la pression sélective thérapeutique, suite à l'expansion de populations sous-clonales préexistantes ou à l'évolution de cellules résistantes aux médicaments. Cela peut être conceptualisé à travers deux voies d'évolution distinctes basées sur l'hétérogénéité spatiale et temporelle. La première est définie comme la distribution inégale de sous-populations tumorales génétiquement différentes, tandis que la seconde représente la réponse adaptative progressive des cellules cancéreuses aux ITKs. Cette hétérogénéité des cellules cancéreuses peut constituer la pierre angulaire de la résistance observée et semble contribuer de manière considérable à l'échec du traitement du CBNPC [149]. La diversité spatiale et temporelle des cellules cancéreuses au sein de la même tumeur constitue un défi supplémentaire pour la médecine de précision personnalisée, qui nécessite une surveillance continue au niveau cellulaire et moléculaire et un ajustement adéquat de la prise en charge thérapeutique [150]. Différents mécanismes induisant une résistance aux ITKs d'EGFR ont été rapportés [150].

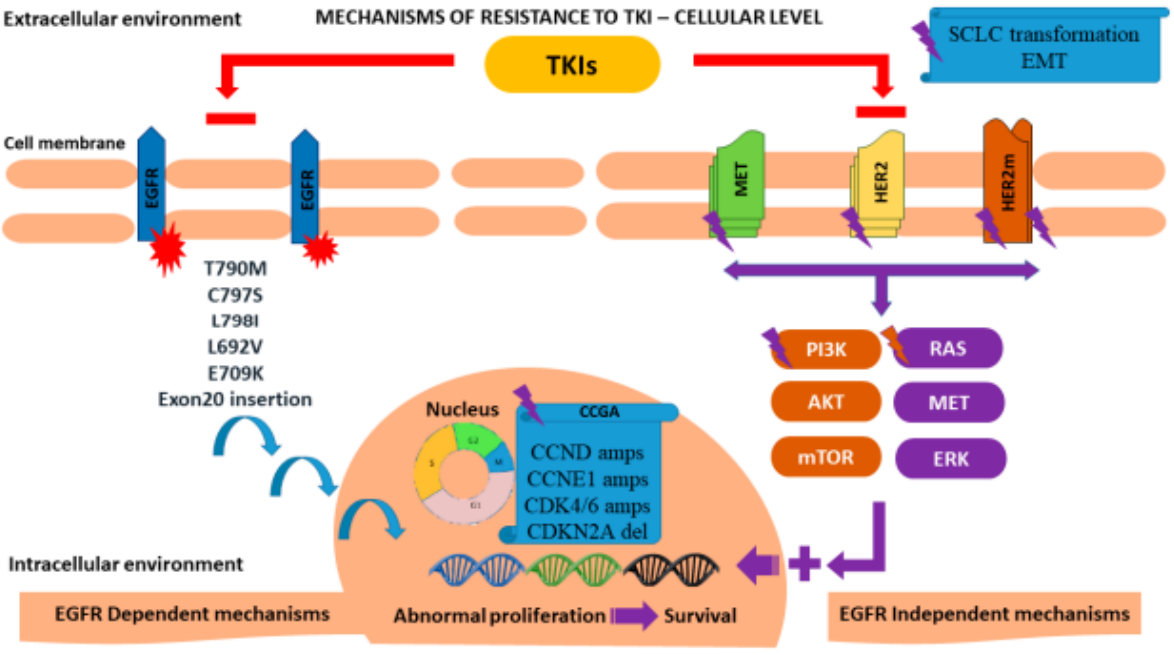


Figure 25 : Mécanismes de résistance dépendants et indépendants d'EGFR

VI.1.4.1 La mutation T790M :

La substitution de la thréonine, en position 790, par la méthionine (T790M) au niveau de l'exon 20 du gène l'EGFR, représente la mutation secondaire la plus fréquemment signalée, elle est à l'origine d'environ la moitié de la résistance acquise aux ITKs de l'EGFR. La mutation T790M augmente l'affinité de liaison à l'ATP des cellules mutées de l'EGFR. Comme les ITKs de première et de deuxième génération sont des inhibiteurs compétitifs de l'ATP, leur efficacité est réduite en présence de la mutation T790M [151]. L'osimertinib est un ITK d'EGFR de troisième génération conçue pour surmonter la résistance médiée par la mutation T790M. Selon l'étude AURA3, un bénéfice net a été observé chez les patients atteints d'un CBNPC avancé T790M-positif traité par osimertinib préalablement traité par un ITK d'EGFR en première ligne, le taux de réponse objective (ORR) de l'osimertinib chez les patients atteints d'un CBNPC T790M-positif était de 61 % et la durée médiane de survie sans progression était de 9,6 mois. Aujourd'hui, l'osimertinib est un médicament approuvé pour le traitement des patients atteints du CBNPC avancé EGFR T790M-positif (EGFR/T790M+) et en première ligne quel que soit le statut de la mutation T790M [152].

VI.1.4.2 Les insertions au niveau de l'exon 20 :

Les mutations et les mécanismes qui requièrent une attention particulière comprennent les insertions au niveau de l'exon 20 et l'amplification du gène EGFR, qui, s'ils sont combinés, peuvent augmenter considérablement le nombre des kinases mutées et par conséquent accélérer l'induction de la résistance [150]. Ces altérations ont été considérées comme responsables de la résistance primaire ou intrinsèque à la majorité des ITKs d'EGFR. Elles sont fréquemment détectées chez les patients d'origine asiatique, présentant un adénocarcinome, non-fumeurs et de sexe féminin. Les insertions exon 20 sont associées à un mauvais pronostic, elles représentent entre 4 et 10 % de toutes les altérations du gène EGFR [153]. Elles peuvent être définies comme de petites insertions ou duplications in-frame de 3 à 21 paires de bases qui sont regroupées entre les positions 762 et 774 acides aminés de la protéine EGFR, et elles sont considérées comme étant largement mutuellement exclusives avec d'autres mutations oncogènes dans le CBNPC [154]. Environ 90% des insertions de l'exon 20 se situent près de l'extrémité C terminal entre les acides aminés 768 et 774 (1- 4 acides aminés) [155]. La structure cristalline de l'EGFR avec une insertion de l'exon 20 montre que l'insertion se situe à l'extrémité de l'hélice C terminal, elle bloque l'hélice dans sa position d'activation et inhibe par conséquent le changement de conformation nécessaire pour l'activation du récepteur à l'EGF. De cette manière, l'activité du récepteur à l'EGF muté ne

peut plus être inhibée par les ITKs de l'EGFR [122]. Divers traitements expérimentaux sont en cours de développement pour surmonter la résistance intrinsèque des insertions exon 20 aux ITK approuvés, y compris l'osimertinib. Alors que la chimiothérapie avec ou sans immunothérapie reste le traitement standard de première ligne dans ce contexte [156]. Cependant, l'amivantamab, un anticorps humain bispécifique, dirigé contre l'EGFR avec insertion au niveau de l'Exon 20 peut modifier la stratégie thérapeutique de première ligne. Les résultats encourageants de l'essai Chrysalis ont conduit à l'essai PAPILLON, qui compare l'efficacité et la sécurité de l'amivantamab en association avec la chimiothérapie dans le traitement de première intention du CBNPC avec insertion de l'exon 20 du R-EGF [157][158].

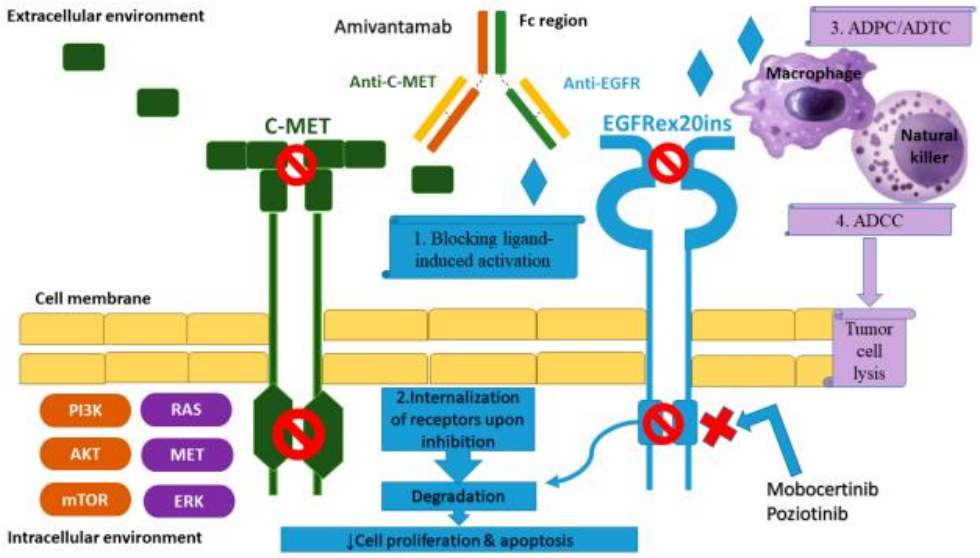


Figure 26 : Mécanisme d'action de l'amivantamab dans les insertions de l'exon 20 du récepteur à l'EGF

VI.1.4.3 La mutation C797S :

C797S est une mutation tertiaire d'EGFR au niveau de l'exon 20 où la sérine prend la place de la cystéine au codon 797 du site de liaison à l'ATP. Cette substitution diminue la capacité de l'osimertinib et d'autres ITK (rociletinib, olmutinib, narzatinib) de former une liaison covalente avec l'EGFR mutant [159]. C797S a été détectée chez 26 % des patients ayant progressé sous osimertinib en deuxième ligne et chez 7 % des patients traités par osimertinib en première ligne, représentant le mécanisme de résistance à l'osimertinib le plus fréquent [150]. Récemment, des ITK-EGFR de quatrième génération ont été développés dans le but de surmonter la résistance acquise causée par la mutation tertiaire C797S d'EGFR. Le LS-106 et le BLU-945 ont déjà démontré leur efficacité antitumorale préclinique in vitro et in vivo dans

des modèles tumoraux à triple mutation C797S (EGFR 19del /T790M /C797S et EGFR L858R /T790M /C797S) [160][161].

VI.1.4.4 Autres mutations rares :

Plusieurs études ont révélé de nouvelles mutations rares de résistance secondaire aux ITK-EGFR. Ces mutations sont souvent détectées comme des mutation complexes, et leur fréquence est estimée à 1 à 8 % [148]. Les substitutions L718Q et L792X d'EGFR ont été détectés par séquençage de nouvelle génération (NGS) dans des échantillons provenant de 99 patients atteints de CBNPC présentant une résistance clinique à l'osimertinib. Les mêmes mutations ont été détectées dans des échantillons d'ADNc du CBNPC qui ont été associés à la résistance à l'osimertinib [159]. Des études in vitro ont confirmé l'association entre ces mutations et la résistance à l'osimertinib [162]. La coexistence des mutations L792F/H avec G796S/R et C797S/G a également été liée à la résistance à l'osimertinib chez les patients atteints du CBNPC [163]. En outre, une série de cas récente a suggéré que les mutations L792X et L718X pouvaient également être résistantes au dacomitinib, un ITK de deuxième génération [164].

D'autres mutations ponctuelles moins fréquentes ont été identifiées, il s'agit notamment d'une mutation G796D chez un patient présentant une résistance à l'osimertinib en deuxième ligne [165], d'une mutation G724S affectant la boucle P de la kinase d'EGFR et de G796R, G796S, G796D qui peuvent interférer dans la liaison des ITK d'EGFR, conférant une résistance plus légère [166].

VI.2 Anaplastic Lymphoma Kinase (ALK) :

Le gène ALK situé sur le bras court du chromosome 2 (2p23), code pour un récepteur à activité tyrosine kinase (RTK), il appartient à la superfamille des récepteurs à l'insuline [167][168]. Le récepteur ALK est composé d'un domaine extracellulaire composée de 1620 acides aminés, d'une région transmembranaire et d'un domaine kinase intracellulaire. Le domaine extracellulaire contient une région riche en glycine, deux segments MAM (meprin, A5 protein, and receptor protein tyrosine phosphatase) et un domaine LDLa (low density lipoprotein class A). La partie intracellulaire comprend un segment juxtamembranaire, un domaine de protéine kinase et une queue carboxyterminale [169][170][171].

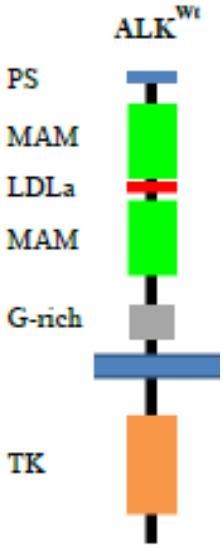


Figure 27 : Structure du récepteur ALK

VI.2.1 Le rôle fonctionnel d'ALK :

Le rôle spécifique d'ALK dans le développement et la physiologie de l'homme n'est pas encore bien défini mais plusieurs études sur différents modèles des animaux ont partiellement clarifié les fonctions d'ALK dans le développement.

* Chez la souris, l'expression d'ALK dans tout le système nerveux pendant l'embryogenèse suggèrent un rôle important de cette protéine dans le développement et la fonction du système nerveux central [169].

* Récemment, il a été démontré que chez l'homme la petite protéine ALKAL1 permet l'activation du récepteur ALK [172].

La tyrosine kinase du récepteur ALK appartient à la famille fonctionnelle des récepteurs dits "de dépendance". Ces récepteurs fonctionnent selon une double signalisation : en présence du ligand ou d'un ligand mimétique, le récepteur exerce un effet anti-apoptotique sur la cellule ; en revanche, en l'absence de ligand et lorsque la cellule est soumise à un stress environnemental ou génotoxique, le récepteur de dépendance devient pro-apoptotique [173].

VI.2.2 Activation physiologique du récepteur ALK :

Bien que la connaissance du mécanisme d'activation de la protéine-tyrosine kinase ALK des mammifères est incomplète, les docteurs Lemmon et Schlessinger ont pu décrire le mécanisme d'activation de plusieurs protéines-tyrosine kinases réceptrices. Lors de la liaison du ligand dans le domaine extracellulaire, la protéine-tyrosine kinase du récepteur est activée en induisant la dimérisation ou l'oligomérisation du récepteur [174].

Le domaine tyrosine kinase du récepteur ALK comprend les motifs constitués de trois tyrosines (Y1278, Y1282 et Y1283), qui sont séquentiellement phosphorylées au moment de l'activation du récepteur ALK. La première trans-phosphorylation est celle de la tyrosine 1278, elle est nécessaire pour l'auto-activation du domaine kinase du récepteur. La tyrosine 1282 et 1283 sont faiblement phosphorylées [175][176][177].

VI.2.3 Translocation du gène ALK :

Les translocations de la région tyrosine kinase se retrouvent dans 3 % de toutes les tumeurs humaines [178]. Les translocations au niveau des récepteurs tyrosine kinase transmembranaires se produisent généralement entre les exons qui codent pour la région juxtamembranaire ou le domaine transmembranaire. Dans les deux cas, ces phénomènes donnent lieu à l'élimination de la région extracellulaire et, par conséquent, la suppression de la régulation de la liaison au ligand, ce qui entraîne l'activation constitutive et incontrôlée de la fusion typique par une dimérisation obligatoire dictée par le gène partenaire [179]. Les points de cassure du gène ALK sont situés entre les exons 19 et 20 d'ALK. Chaque translocation crée une protéine de fusion dont le domaine TK d'ALK à l'extrémité 3'- est connectée à des protéines distinctes appartenant à des partenaires différents à l'extrémité 5' de la fusion, capables d'assurer une dimérisation constitutive [180].

Le réarrangement d'ALK a été décrit pour la première fois en 1994, dans les lignées cellulaires de lymphome anaplasique à grandes cellules (ALCL), ALK étant l'un des partenaires fusionnés dans une translocation chromosomique récurrente t(2;5)(p23;q35) avec le gène de la nucléophosmine (NPM) situé sur le chromosome 5 [181]. Ce réarrangement produit un gène de fusion qui entraîne l'expression d'une protéine de fusion oncogène, NPM-ALK. NPM assure la dimérisation de la protéine de fusion, ce qui entraîne l'activation constitutive du domaine tyrosine kinase d'ALK. Cette activité kinase incontrôlée est à l'origine du potentiel oncogène de la protéine de fusion [182][168][183]. Avec l'avènement du diagnostic basé sur le séquençage de nouvelle génération (NSG), plus de 20 gènes partenaires différents de fusion ALK ont été décrits dans plusieurs types de cancers (le cancer colorectal, le cancer du sein, le cancer de l'œsophage, cancer de l'ovaire, cancer des cellules rénales, lymphome diffus à grandes cellules B et le cancer du poumon non à petites cellules), même si leur fréquence est faible [184].

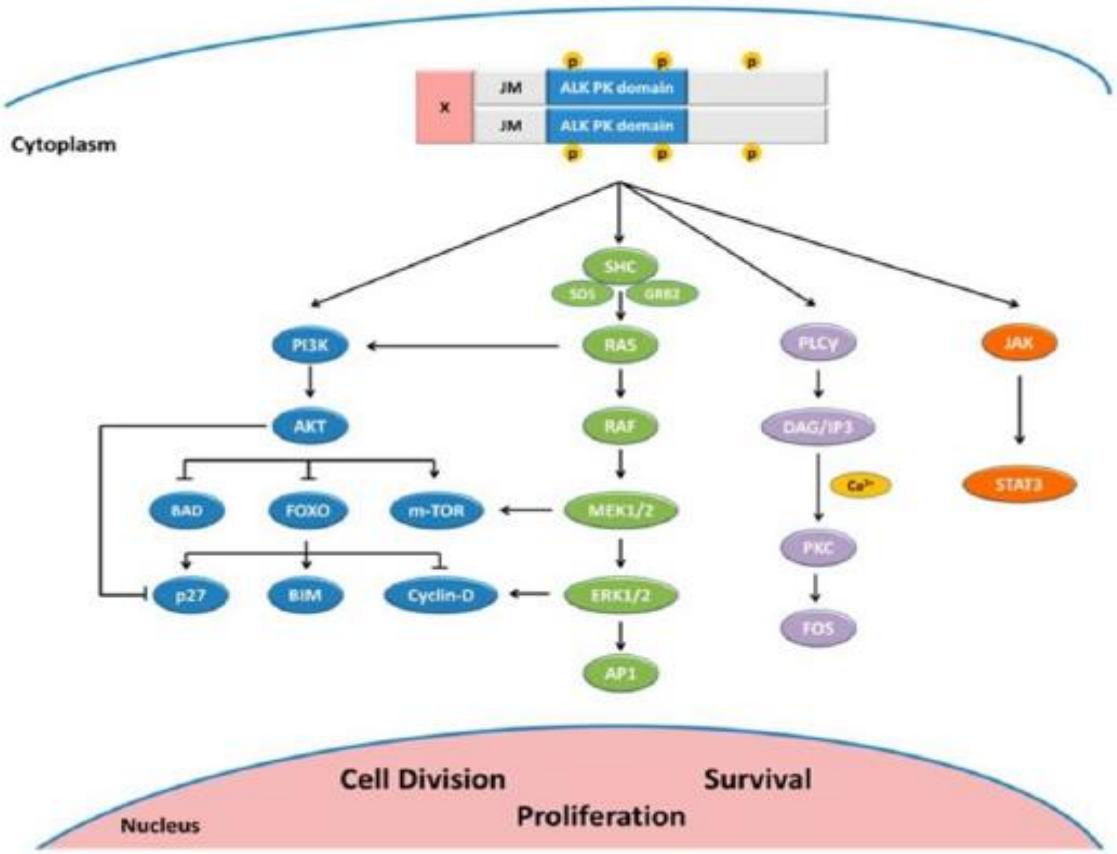


Figure 28 : Le rôle de médiateur du gène (ALK) dans la signalisation par les voies PI3/AKT, RAS/MAPK, phospholipase Cy (PLCy) et Janus Kinase (JAK)-signal transducteur et l'activateur de transcription (STAT)

Le réarrangement du gène ALK est identifié dans 5 à 6 % des cas de CBNPC, c'est une mutation déterminante dans le développement du CBNPC [185]. Malgré les données considérables qui relient l'activation du gène ALK à la genèse de la tumeur, l'enthousiasme actuel pour l'ALK en tant que cible pour la thérapie du cancer est dû en grande partie à la découverte d'une translocation récurrente du gène ALK dans un sous-groupe distinct des patients atteint du CBNPC [186][187]. La transocation ALK dans le cadre des CBNPC a pour la première fois été mise en évidence en 2007 dans environ 7 % des cas, elle correspond à la fusion du gène ALK avec le gène EML4 (echinoderm microtubule associated protein like) [188]. Le réarrangement ALK-EML4 est le résultat de l'inversion du bras court du chromosome 2, et la fusion de la partie aminoterminale d'EML4 avec la région codant pour le domaine tyrosine kinase du gène ALK [189].

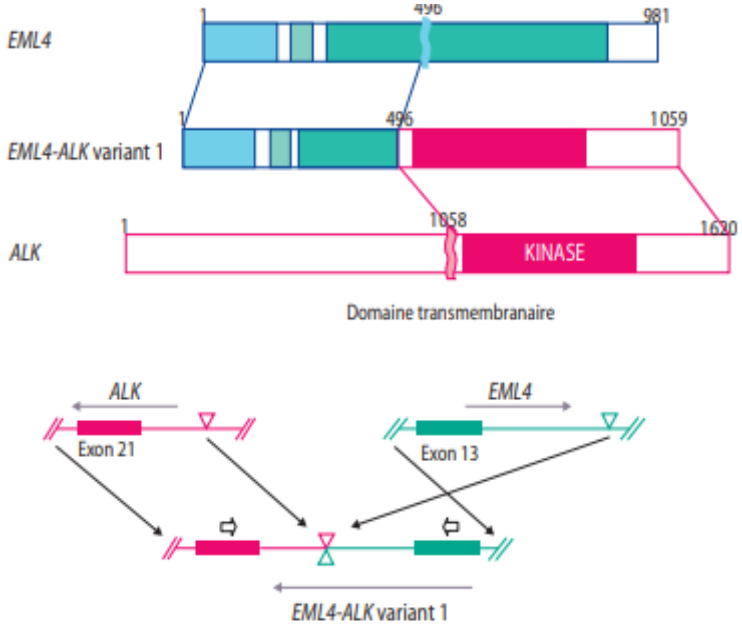


Figure 29 : La translocation ALK-EML4, illustrant la fusion de la partie aminoterminale d'EML4 avec la région codant pour le domaine tyrosine kinase du gène ALK

Le gène de fusion ALK-EML4 représente une nouvelle cible moléculaire. La fréquence du réarrangement du gène ALK varie entre 3 à 13 % chez les patients atteints de CBNPC notamment chez les sujets jeunes non-fumeurs portant l'histologie d'un adénocarcinome [190] [191][192] [193][194]. Le gène EML4 peut être cassé près des exons 2, 6, 13, 14, 15, 18 ou 20. En fonction des différents points de cassures d'EML4, plusieurs variants ont été décrits [195][196]. E13 ; A20 et E6a/b ; A20 sont les variants d'ALK-EML4 les plus fréquents, représentant respectivement 33 et 29 % des cas [197]. Des réarrangements du gène ALK avec des gènes partenaires autres que l'EML4 ont également été décrits, notamment : KIF5B, SQSTM1, NPM1, KLC1, HIP1, STRN, TFG, DCTN1, TPR, BCL11A et BIRC6 [198][199] [200][201][202][203][204][205][206][207][208][209][210] [211].

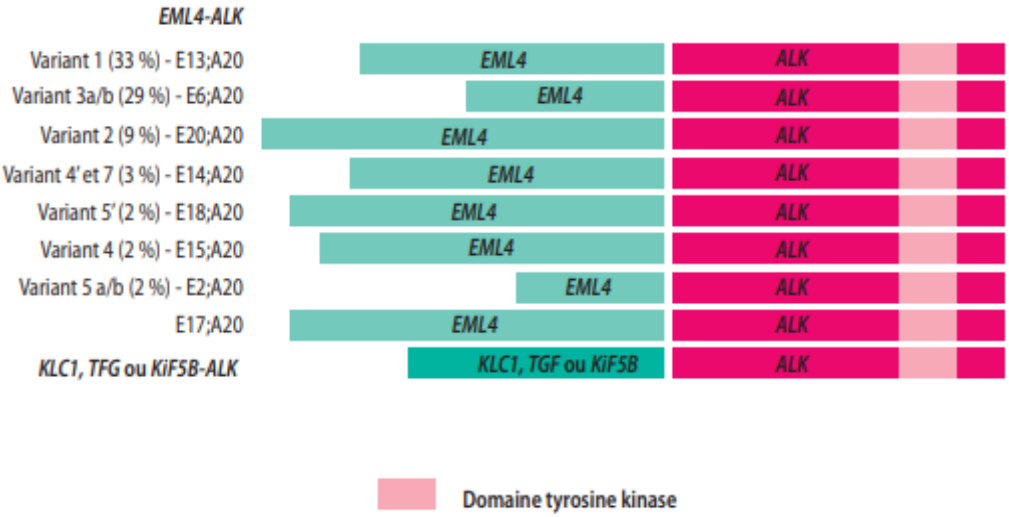


Figure 30 : Les différents variants du réarrangement ALK-EML4

Dans le cancer du poumon, la translocation ALK-EML4 représente une voie de dépendance oncogène déclenchée par l'activité tyrosine kinase ALK constitutive. Tout comme le réarrangement NPM-ALK, la translocation ALK-EML4 active plusieurs voies de signalisation oncogène dont la voie de RAS-ERK (Ras-Extracellular signal-Regulated Kinase) impliquée dans la prolifération cellulaire, et les voies JAK-STAT (Janus Kinase- Signal Transducers and Activators of Transcription) et PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase) impliquées dans la survie et la migration cellulaire sont les plus importantes [212]. L'altération du gène ALK dans le cancer bronchique non à petites cellules est associé à un mauvais pronostic, avec un risque élevé de développer des métastases à distance notamment cérébrales et hépatiques [213][214].

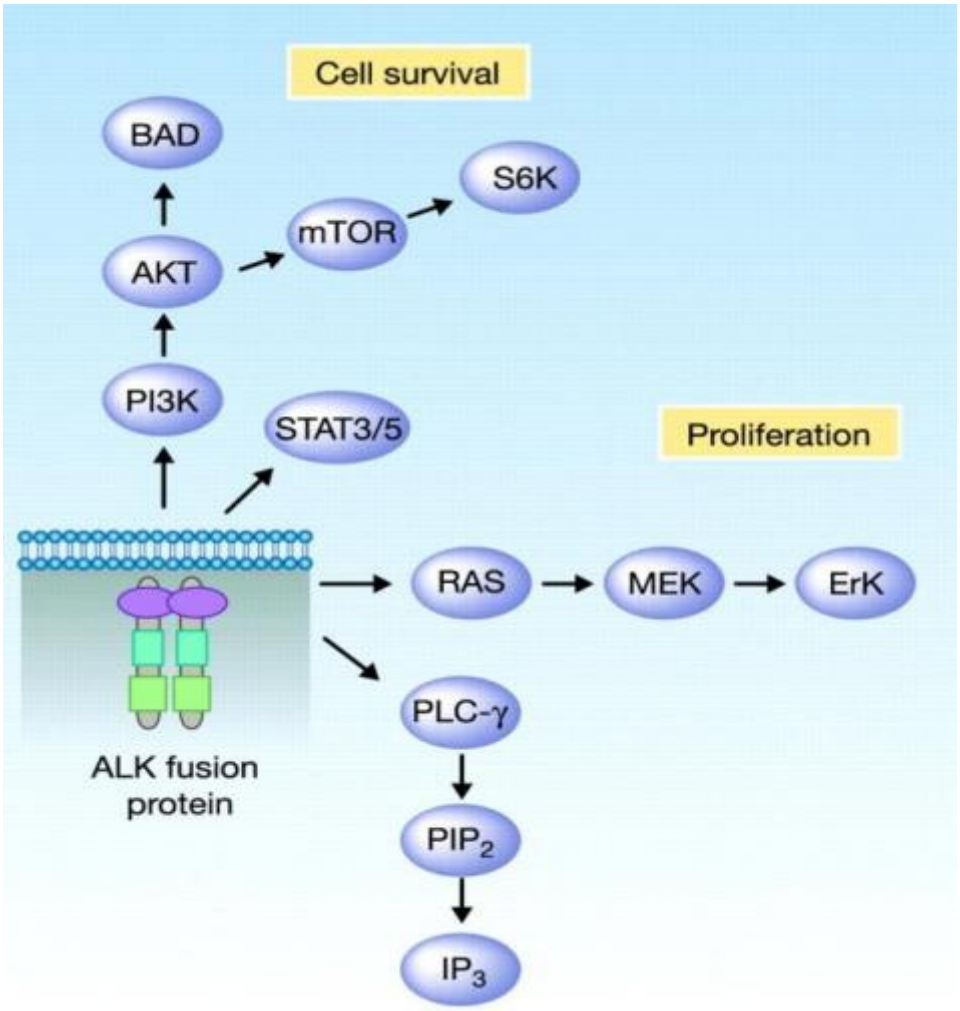


Figure 31 : Voie d'activation de la translocation ALK-EML4

Grâce à la compréhension de plus en plus avancée des mécanismes pathogène induites par le gène ALK et la limite des effets secondaires liés au traitement anti-ALK puisque la protéine n'est exprimée en quantité importante que dans peu de cellules nerveuses, le gène ALK est devenue une cible pertinente pour le traitement par thérapie ciblée du CBNPC. En 2011, et juste 4 ans après la découverte du potentiel oncogénique du réarrangement ALK dans le CBNPC [5], le crizotinib a été approuvé par la FDA pour le traitement du CBNPC métastatique ALK-positif. Le crizotinib est une petite molécule inhibitrice ATP-compétitif, disponible par voie orale, initialement destiné à être un inhibiteur du facteur de croissance hépatocytaire (C-MET) [215], puis rapidement réorienté vers l'ALK après la découverte du rôle des réarrangements d'ALK dans le CBNPC [216]. En effet, le crizotinib inhibe la phosphorylation et la transduction des signaux cellulaires, ce qui permet le blocage du cycle cellulaire dans la phase G1-S et provoque l'apoptose des cellules cancéreuses avec la protéine de fusion [217]. Les patients avec ALK réarrangé traité par cette molécule ont présenté un taux de réponse élevé et une survie moyenne largement supérieur à ceux traité par

chimiothérapie [186][218]. Peu après, deux autres inhibiteurs d'ALK - l'alectinib et le brigatinib - ont été approuvés pour le traitement des patients ALK-positifs ayant progressé sous traitement antérieur par le crizotinib [219]. Plus récemment, lorlatinib, un inhibiteur TK de nouvelle génération est devenu une option thérapeutique standard pour les patients ALK-positifs chez qui un ou plusieurs inhibiteurs d'ALK ont échoué [220]. Cependant, le bénéfice des thérapies ciblées anti-ALK sont limitées par l'émergence d'une résistance au traitement. Plusieurs mécanismes de résistance aux inhibiteurs de la tyrosine kinase d'ALK ont été découverts [219].

VI.2.4 Mutations de résistance :

Les mutations de résistance aux ITKs d'ALK représentent 30 à 40 % de tous les mécanismes de résistance connus [221]. Ces mutations de résistance entraînent des changements structurels dans le domaine kinase qui interfèrent avec la liaison du médicament. Un large spectre de mutations a été identifié dans les CBNPC ALK-positifs traités par les ITKs d'ALK. Les mutations résistantes au crizotinib comprennent : L1196M, G1269A, C1156Y, G1202R, I1171T/N/S, S1206C/Y, E1210K, L1152P/R, V11180L, I1151T, G1128A, and F1174V [222][223][224][225]. Les mutations ALK les plus courantes sont les mutations L1196M et G1269A. La mutation G1202R a été trouvée dans 2 % des échantillons suite à une résistance au crizotinib et constitue le principal mécanisme de résistance aux ITKs d'ALK de deuxième génération [221].

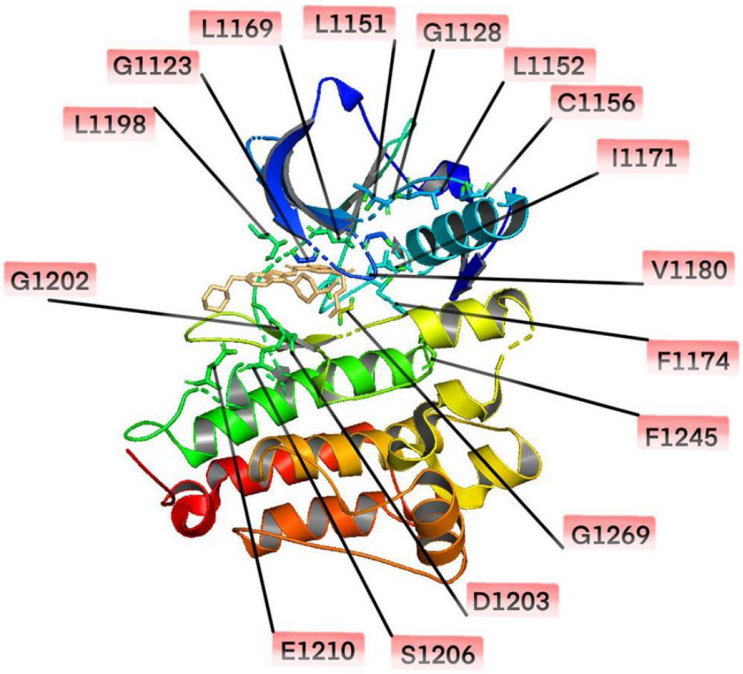


Figure 32 : Les mutations du domaine kinase du lymphome kinase anaplasique (ALK)

Après la découverte de la résistance aux ITKs d'ALK de première génération, de nombreuses études ont montré que les ITKs de deuxième génération tels que, l'alectinib, le céritinib, le brigatinib et l'ensatinib, peuvent contribuer à une réponse thérapeutique meilleurs et supérieurs à la chimiothérapie [226][227][228][229]. Les ITK de deuxième génération, l'alectinib et le brigatinib, sont actuellement recommandés comme traitements de première ligne en Europe [66], tandis que le lorlatinib ITK de troisième génération, est également approuvé par la FDA comme traitement de première ligne et comme médicament de première ligne supplémentaire selon les directives actuelles de la NCCN [221].

VI.3 ROS1 :

ROS1 code pour une protéine transmembranaire présentant des caractéristiques structurelles similaires à celles de la famille des récepteurs de l'insuline et de l'ALK [230]. Une forte expression de la protéine ROS1 est observée dans le tissu rénal, d'autres organes expriment faiblement la protéine ROS1 notamment, le cervelet, l'estomac, l'intestin grêle, le colon et le tissu et le système nerveux périphérique [231]. L'expression ROS1 est absente dans le tissu pulmonaire normal [231]. Le rôle proto-oncogène que joue le gène ROS-1 dans le cancer de poumon a été décrit pour la première fois en 2007 [200]. Aujourd'hui avec le développement des techniques de séquençage, de nombreux partenaires de fusion du gène ROS1 ont été identifiés [232][233], dont le rôle proto-oncogène est clairement établi dans de nombreux cancers [234]. La présence de la fusion ROS1 entraîne une expression de la tyrosine kinase

ROS1 et par conséquent l'activation des voies de signalisations MAPK/EPK, PI3K/AKT, JAK/STAT3 et SHP1/2 de la croissance cellulaire [235].

Le réarrangement ROS-1 est présent dans environ 0,9 à 2,6 % des CBNPCs [233][236][237]. Comme les réarrangements ALK, il est plus fréquent chez les sujets jeunes, les femmes et les non-fumeurs [233][236][237]. Les CBNPCs ROS-1-réarrangés sont principalement des adénocarcinomes d'architecture lépidique, acinaire ou solide, dont plus de 90 % expriment le facteur de transcription thyroïdien 1 (TTF1), diagnostiqués à un stade avancé (stade III-IV), avec une fréquence plus élevée de métastases cérébrales [237][238]. Plus rarement, le réarrangement de ROS1 est retrouvé dans d'autres sous-types histologiques, comme les carcinomes épidermoïde, pléomorphe ou à grandes cellules [233][239][240][241].

Les réarrangements ROS1 montrent une sensibilité aux inhibiteurs de tyrosine kinase qui présentent une activité collatérale sur ROS1, notament le crizotinib [242][236]. Malgré le bénéfice notable du crizotinib dans la prise en charge des CBNPC ROS1-positifs, sa faible pénétration cérébrale fait du système nerveux central le principal site de progression sous crizotinib (47% des patients). De plus, étant donné que 36% des patients atteints de CBNPC ROS-1-positifs présentent des métastases cérébrales au moment du diagnostic [243], le développement de nouvelles molécules ciblant ROS1 et ayant une meilleure pénétration cérébrale, comme l'entrectinib ou le lorlatinib, est justifié [244]. Le lorlatinib autorisé pour le traitement du CBNPC ALK-positif, semble surmonter la résistance acquise au crizotinib chez les patients atteints du CBNPC ROS1 positif. L'entrectinib, un inhibiteur oral de ROS1/TRK, a également été approuvé au Canada pour le traitement du CBNPC ROS1 positif [245].

La mutation G2032R représente la mutation de résistance la plus fréquente, elle représente 33 % à 41 % des mécanismes de résistance. Plusieurs études ont montré que la mutation G2032R au niveau du gène ROS induit une résistance à plusieurs ITKs (crizotinib, ceritinib, entrectinib et lorlatinib) via une modification du site de liaison et un encombrement stérique. Actuellement, des ITKs de nouvelle génération sont en cours de développement pour cibler cette mutation, et des résultats prometteurs ont été obtenus avec le repotrectinib et le topotrectinib. Le cabozantinib et le foretinib ont également montré une activité anti-ROSG2032R [244].

VI.4 BRAF :

BRAF est une protéine kinase de type sérine/thréonine impliquée dans la voie de signalisation MAPK, elle joue un rôle dans la croissance, la prolifération, la différenciation et la survie

cellulaire [246]. Dans les conditions physiologiques normales, en présence d'une protéine BRAF de type sauvage, la cascade de signalisation BRAF est inhibée par un mécanisme de rétrocontrôle négatif. Cependant, en cas de mutation BRAF, l'activation de la voie RAS-RAF-MEK-ERK est maintenue et entraîne une croissance et une prolifération cellulaires incontrôlées, ce qui explique son rôle dans l'oncogenèse [247][248]. Les mutations BRAF sont couramment observées dans divers types de cancers, avec une incidence de 8 % dans tous les cancers humains, principalement dans la leucémie à tricholeucocytes (100 %), les mélanomes (40 %-50 %), les carcinomes thyroïdiens (10 %-70), le cancer colorectal (10 %) [246].

La fréquence du cancer du poumon BRAF muté varie entre 1,5 et 3,5 %. Selon plusieurs rapports, les mutations BRAF sont observées dans 3 à 5 % des cancers bronchiques non à petites cellules non épidermoïde [249]. La mutation ponctuelle BRAF V600E représente la mutation la plus fréquente du gène BRAF. Sur le plan histologique, les adénocarcinomes mutés BRAF V600E sont mucineux, avec une architecture le plus souvent micropapillaire et une forte expression du facteur de transcription thyroïdien 1 (TTF-1)[250]. Les mutations BRAF sont fréquentes chez les femmes ; cependant, les mutations non-V600E semblent se produire avec une fréquence plus élevée chez les hommes. La plupart des patients BRAF muté sont des fumeurs ou anciens fumeurs [250].

Le dabrafenib et le vemurafenib sont des inhibiteurs ATP-compétitifs de la kinase BRAF. Ces deux agents ciblent spécifiquement la mutation V600E du gène BRAF. Il a été montré que le vemurafenib présente des activités antitumorales prometteuses chez les patients atteints du CBNPC muté par BRAF V600. Les directives actuelles du cancer du poumon recommandent le vemurafenib comme un traitement optionnel dans certaines circonstances. Un essai prospectif a montré que le dabrafenib avait une activité clinique sur le CBNPC BRAF V600-mutant, et pourrait constituer un choix thérapeutique intéressant pour les patients porteurs d'un CBNPC BRAF V600E-mutant, qui ne dispose pas d'options thérapeutiques efficaces [246].

VI.5 NTRK :

Le gène NTRK1 est localisé sur le chromosome 1q21-q22, sa protéine codante TRKA se lie au facteur de croissance des nerfs (NGF) pour induire la phosphorylation de la tyrosine et l'activité tyrosine kinase de TRKA. Le gène NTRK2 est situé sur le chromosome 9q22.1, la protéine TRKB se lie spécifiquement au facteur neurotrophique dérivé du cerveau (BDNF).

Le gène NTRK3 est situé sur le chromosome 15q25, et la TRKC se lie sélectivement à la neurotrophine 3 (NT-3). De plus, la NT-3 se lie aux trois récepteurs TRK, et l'interaction entre la NT-3 et la TRKC provoque une réponse biologique plus efficace que celle avec la TRKA ou la TRKB [251]. La liaison du ligand au récepteurs TRK entraîne la dimérisation de ces derniers, ce qui active plusieurs voies de signalisation intracellulaires en aval de la croissance cellulaire (la voie de la phospholipase C-γ (PLCγ), de la PI3 kinase (PI3K) et de la protéine kinase activée par des agents mitogènes (MAPK)) [251].

Les gènes NTRK1, NTRK2 ou NTRK3, qui codent pour les récepteurs des neurotrophines TRKA, TRKB et TRKC, sont connus pour subir des fusions conduisant à la carcinogenèse dans diverses tumeurs solides adultes et pédiatriques [252]. Les fusions de gènes NTRK ont été identifiées pour la première fois dans le CBNPC en 2013 [253]. Les fusions NTRK1 ont été détectées dans environ 3 % des cas de CBNPC, tandis que les fusions NTRK2 et NTRK3 ont été révélées dans environ 1 % des cas de CBNPC [254].

L'entrectinib, un inhibiteur sélectif des tyrosines kinases TRKA/B/C, ROS1 et ALK, a été approuvé par la FDA pour le traitement des tumeurs solides adultes et pédiatriques avancées ou récurrentes avec fusion NTRK positive [255]. Il a également été approuvé pour le traitement des patients atteints du CBNPC avancé avec fusion ROS1 positive. Cependant, la résistance primaire ou acquise aux ITK-NTRK de première génération est inévitable. Les mécanismes responsable de la résistance aux ITK-NTRK ne sont pas encore clairement définis [251].

VI.6 RET :

Le proto-oncogène RET code pour un récepteur tyrosine kinase transmembranaire qui joue un rôle central dans le développement des systèmes entérique et nerveux et dans la morphogenèse rénale. Après l'activation du récepteur RET par les ligands de la famille GDNF (GFL), des résidus tyrosine spécifiques de son domaine intracellulaire sont autophosphorylés. Au moins 14 des 18 résidus tyrosine du domaine intracellulaire peuvent être phosphorylés, et certains d'entre eux représentent des sites d'accueil pour des protéines adaptatrices clés, conduisant à l'activation d'importantes voies de signalisation (RAS/MAPK, PI3K/AKT, phospholipase C γ) [256].

La fusion RET avec un autre gène conduit à une expression aberrante de la protéines de fusion, ce qui entraîne une activation constitutive indépendante du ligand de RET et des voies de signalisation en aval, favorisant la prolifération et la survie des cellules cancéreuses [257].

À ce jour, plusieurs partenaires génétiques de fusion ont été identifiés, le KIF5B représente le partenaire le plus fréquent (70 à 80 % des cas), suivi de CCDC6, tandis que les partenaires de fusion NCOA4, TRIM33 et CLIP1 sont les moins courants [258].

Les réarrangements RET ont été observés chez environ 1 à 2 % des patients atteints d'un CBNPC, généralement chez les sujets jeunes, petits fumeurs ou non-fumeurs, avec une histologie d'adénocarcinome. Les translocation RET sont associés à un taux élevé de métastases cérébrales au moment du diagnostic [258].

Une réponse différentielle aux ITK de RET a été observé chez les patients présentant un réarrangement RET en fonction de différents variants de fusion [259][260][261][78], ce qui souligne l'importance des types de partenaires de fusion dans les résultats cliniques des thérapies ciblées.

En général, les réarrangements RET sont mutuellement exclusifs avec d'autres mutations oncogènes connues, bien que certains cas de coexistence avec des mutations EGFR et des amplifications MET ont été décrits [258]. En outre, certains rapports de cas ont documenté la présence d'une fusion RET acquise chez des patients atteints d'un CBNPC EGFR muté qui ont progressé sous les ITKs d'EGFR, ce qui suggère que les fusions RET pourraient être un mécanisme potentiel de résistance acquise à cette classe de médicaments [262][263].

À ce jour, deux ITK spécifiques des réarrangement RET, le selpercatinib et le pralsetinib, ont été approuvés par la Food and Drug Administration (FDA) américaine pour le traitement du CBNPC et des cancers de la thyroïde avancés ou métastatiques présentant une altération du gène RET. Le sélpercatinib et le pralsétinib sont efficaces contre les altérations RET, notamment les fusions CCDC6-RET et KIF5B-RET et les mutations RET C634W, RET M918T et RET V804L/M/E [264][265].

VI.7 MET :

Le gène MET est situé sur le même chromosome du gène EGFR (bras long du chromosome 7). MET code pour un récepteur tyrosine-kinase, avec des domaines extracellulaires, transmembranaires, juxtamembranaires et kinases [266][267]. La liaison du MET à son ligand exclusif, le HGF, entraîne une homodimérisation et une phosphorylation des résidus tyrosine intracellulaires [268]. L'activation du récepteur stimule les voies de signalisation en aval impliquées dans la prolifération cellulaire, la migration, l'angiogenèse, la survie et la transition épithéliale-mésenchymateuse [269][270].

En oncologie, la dérégulation de la voie MET peut se manifester par plusieurs types d'altérations, notamment par des mutations génétiques, une amplification, un réarrangement ou une surexpression de protéines. La fréquence de la surexpression MET dans le CBNPC varie entre 22% et 75%, selon les séries [271][272]. La surexpression de MET est considérée comme un facteur de mauvais pronostic chez les patients atteints de CBNPC [273][272]. Le taux d'amplification MET dans le CBNPC varie de 1% à 5%, en fonction du test utilisé et le seuil de positivité appliqué [274][275][276][277][278]. Les tumeurs MET amplifiées souvent des adénocarcinomes peu différenciés dont le pronostic est mauvais. L'amplification MET est associée à un mécanisme de résistance secondaire aux ITKs d'EGFR chez 5 à 20 % des patients présentant des tumeur EGFR mutés [279][280][281][282][283][283][284]. Elle représente environ 15 % de la résistance acquise aux ITKs de troisième génération et est liée à un pronostic plus défavorable, tout en nécessitant une stratégie thérapeutique différente [283].

Les mutations ponctuelles du gène MET sont souvent situées sur le domaine extracellulaire ou juxtamembranaire (exon14), l'exon 14 code pour le domaine juxtamembranaire de 47 acides aminés du récepteur MET, une région régulatrice clé empêchant la surexpression de MET. Les événements génomiques qui sont responsables du défaut d'épissage de l'exon 14 de MET sont complexes et comprennent plusieurs types d'altérations, telles que des mutations ponctuelles, des insertions ou des délétions [285]. Le mécanisme spécifique de la carcinogenèse n'est pas encore bien élucidé, mais la perte de cette région entraîne une dégradation du récepteur MET et une activation aberrante de la voie de signalisation [285].Les mutations METex14 (substitutions ou insertions) ont été décrites pour la première fois en 2005 chez les patients atteint du CBNPC [286]. En raison de la diversité des altérations pouvant conduire au saut de l'exon14 de MET et de la localisation potentielle de ces altérations dans le gène MET, la technique de test optimale fait encore l'objet de débats [285].

La fréquence des mutations METex14 dans les adénocarcinomes pulmonaires métastatiques varie de 1,7 à 4,3 % [276][271][273][277][287], elles sont fréquentes chez les sujets relativement âgés et sont mutuellement exclusives avec d'autres mutations pro-oncogène du cancer du poumon, ce qui suggère leur véritable rôle oncogène [288][289]. D'après une analyse de 933 CBNPCs non épidermoïdes, aucun patient présentant une mutation METex14 n'avait d'autre anomalie oncogène associée [290][291][276]. La mutation MET exon 14 par saut (skipping) est plus fréquente en tant que mutation pilote de novo (environ 3 % des

adénocarcinomes pulmonaires) ; cependant, elle a été signalée comme un mécanisme rare de résistance acquise à l'osimertinib dans certains rapports de cas [292][293].

L'association du crizotinib et de l'osimertinib a été évaluée dans le cadre d'études précliniques, elle a permis d'obtenir une résistance écrasante à l'osimertinib dans les cellules présentant une amplification de MET ; elle pourrait donc constituer une approche thérapeutique potentielle au moment de la résistance acquise aux ITK de troisième génération dans un proche avenir [283].

Le capmatinib est un inhibiteur très puissant et sélectif du récepteur MET qui a montré une efficacité in vitro et in vivo dans des modèles précliniques de cancer présentant divers types d'aberrations MET. Les options thérapeutiques pour le CBNPC avancé avec amplification MET comprennent également l'inhibiteur MET, le crizotinib. Pour les mutations METex14, la FDA a approuvé le capmatinib et le tépotinib pour les patients adultes atteints d'un CBNPC avancé porteur d'une mutation à saut de METex14 [285].

Une meilleure compréhension des mécanismes de dérégulation de MET a contribué ces dernières années au développement de stratégies supplémentaires tel que les antagonistes du HGF, les anticorps anti-MET et les ITKs sont en cours d'évaluation clinique [285]. Cependant, les biomarqueurs moléculaires pour la voie MET ne sont pas bien définis [294].

VI.8 KRAS :

La protéine KRAS appartient à la superfamille des protéines Ras qui joue un rôle crucial dans la transduction de la signalisation extra- et intra-cellulaire [295]. Le gène KRAS code principalement pour une protéine G de 21,6 kDa composée de 188 acides aminés, qui aboutit à l'activation des voies de signalisation telles que la voie de RAS/MAPK/ERK, PI3K/AKT/STAT3 et STAT5, impliquées dans plusieurs processus cellulaires, notamment la prolifération, la différenciation et l'apoptose [296].

KRAS est une protéine clé de la voie EGFR, elle permet la transduction des signaux qui couplent l'activation du récepteur membranaire EGFR aux voies effectrices en aval [297]. En effet, la protéine KRAS passe de la guanosine triphosphate (GTP) active à la guanosine diphosphate (GDP) inactive, la forme active de la protéine se lie à plus de 20 protéines effectrices et induit la stimulation des cascades de signalisation en aval [298].

La protéine KRAS possède également une activité GTPase intrinsèque essentielle à la transduction du signal par l'intermédiaire de divers transducteurs en aval ou de protéines

activatrices de GTPase (GAP), qui multiplient par 100 000 fois l'activité GTPase de la protéine KRAS [295]. KRAS est donc considéré comme un important médiateur précoce en aval de la signalisation cellulaire induite par le récepteur membranaire EGFR [299].

La capacité oncogénique du gène KRAS a été découverte en 1982 [300], aujourd'hui il est devenu l'un des gènes les plus connu pour jouer un rôle crucial dans la carcinogénèse du cancer humain [301]. KRAS est muté dans environ 30 % de toutes les tumeurs humaines [302], les mutations activatrices du gène KRAS caractérisent les tumeurs malignes épithéliales, notamment les cancers pancréatique, colorectal, endométrial, du col de l'utérus et le cancer de poumon [296][297]. En effet, les tumeurs présentant des mutations KRAS sont considérées comme des cancers très agressifs.

Pour le CBNPC, la présence des mutations KRAS est corrélée à un mauvais pronostic [303][304]. Plus de 95 % des mutations KRAS sont des substitutions qui surviennent sur les codons 12 et/ou 13 de l'exon 2 [305]. Ces dernières altèrent l'activité GTPase intrinsèque de la protéine et confèrent une résistance aux GAP, ce qui entraîne par conséquent une accumulation de la protéine active lié au GTP [306]. La protéine mutée perd le contrôle négatif intrinsèque de l'activité GTPase, elle est donc activée de manière constitutive indépendamment de la liaison du ligand à l'EGFR, ce qui conduit à une dérégulation des voies cellulaires clés en aval de multiples processus cellulaires, notamment la prolifération et la différenciation cellulaires [307][308][309].

La mutation p.G12C de l'exon 2 du gène KRAS est identifiée chez environ 12 % à 14 % des patients atteints de CBNPC [310]. Les mutations KRAS dans le CBNPC sont souvent rapporté chez les fumeurs (30 % contre 10 %), le type histologique d'adénocarcinome pulmonaire (15 à 30% des cas) [301], rarement dans le carcinome épidermoïde (5% des cas) mais jamais dans le cancer bronchique à petites cellules [311][298]. Après des années d'efforts infructueux pour cibler le gène KRAS dans le cancer du poumon, des résultats positifs ont été montré dans plusieurs études cliniques récentes [310].

Le Sotorasib est le premier inhibiteur de KRAS G12C approuvé qui a démontré un bénéfice clinique durable chez les patients atteints de CBNPC prétraité avec mutation G12C du gène KRAS. Plus récemment, l'adagrasib a reçu par la FDA la désignation de thérapie innovante pour le traitement potentiel des patients atteints de CBNPC positifs pour la mutation G12C du gène KRAS, qui ont reçu au moins un traitement systémique précédent [312].

VI.9 HER2 :

Le gène HER2 code pour un récepteur à activité tyrosine kinase transmembranaire appartenant à la famille des récepteurs ERBB. HER2 est un oncogène commun identifié dans divers types de cancer. La dérégulation de la signalisation HER2 peut être causée par une mutation, une amplification ou une surexpression. Les trois types d'altération du gène HER2 peuvent apparaître dans le CBNPC, leur coexistence (amplification et mutation) représente un phénomène rare [313][314].

Les mutations HER2 sont identifiées dans 2 à 4% des CBNPCs et englobe des altérations hétérogènes distribuées sur les domaines extracellulaire, transmembranaire et tyrosine kinase. L'amplification HER2 est présente dans 2 à 4 % des cas de CBNPC [315]. Les mutations et l'amplification du gène HER2 représentent des cibles moléculaires distinctes avec des réponses thérapeutiques et des valeurs pronostiques différentes. Le taux d'incidence de la surexpression du gène HER2 dans les cancers du poumon non à petites cellules varie entre 2,5 % et 34 %, cette grande marge est probablement due à l'incohérence entre les différentes méthodes d'évaluation de la positivité et l'absence d'une concordance entre les pathologistes [316][314] [317][318].

Tout comme chez les patients présentant des mutations EGFR, les mutations HER2 sont fréquentes chez les femmes, les personnes n'ayant jamais fumé et les adénocarcinomes pulmonaires. Cependant, les patients HER2 muté ont un pronostic défavorable par rapport à ceux EGFR muté et ALK réarrangé[319][320][321]. La présence d'une mutation HER2 est également corrélée à un risque plus élevé de développer des métastases cérébrales [322]. L'amplification et la surexpression HER2 sont le plus souvent détectées chez les fumeurs et les patients de sexe masculin, ce qui suggère que l'origine de la tumorogénèse induite par l'amplification et/ou la surexpression HER2 diffère complétement de celle induite par les mutations HER2 [318][323].

Les insertions de l'exon 20 du gène HER2 présentent une grande ressemblance avec celles d'EGFR. Les mutations d'HER2, en particulier les insertions YVMA 776-779 dans l'exon 20, apparaissent comme une cible médicamenteuse pour les thérapies ciblées dans le cancer du poumon et représentent jusqu'à 90 % de toutes les mutations d'HER2 [324].

Le pronostic des patients atteint d'un CBNPC HER2 amplifié reste discutable, tandis que la surexpression HER2 est un marqueur de mauvais pronostic, en particulier pour

l’adénocarcinome, les stades précoces du CBNPC et le cancer du poumon à petites cellules (CPPC) [325].

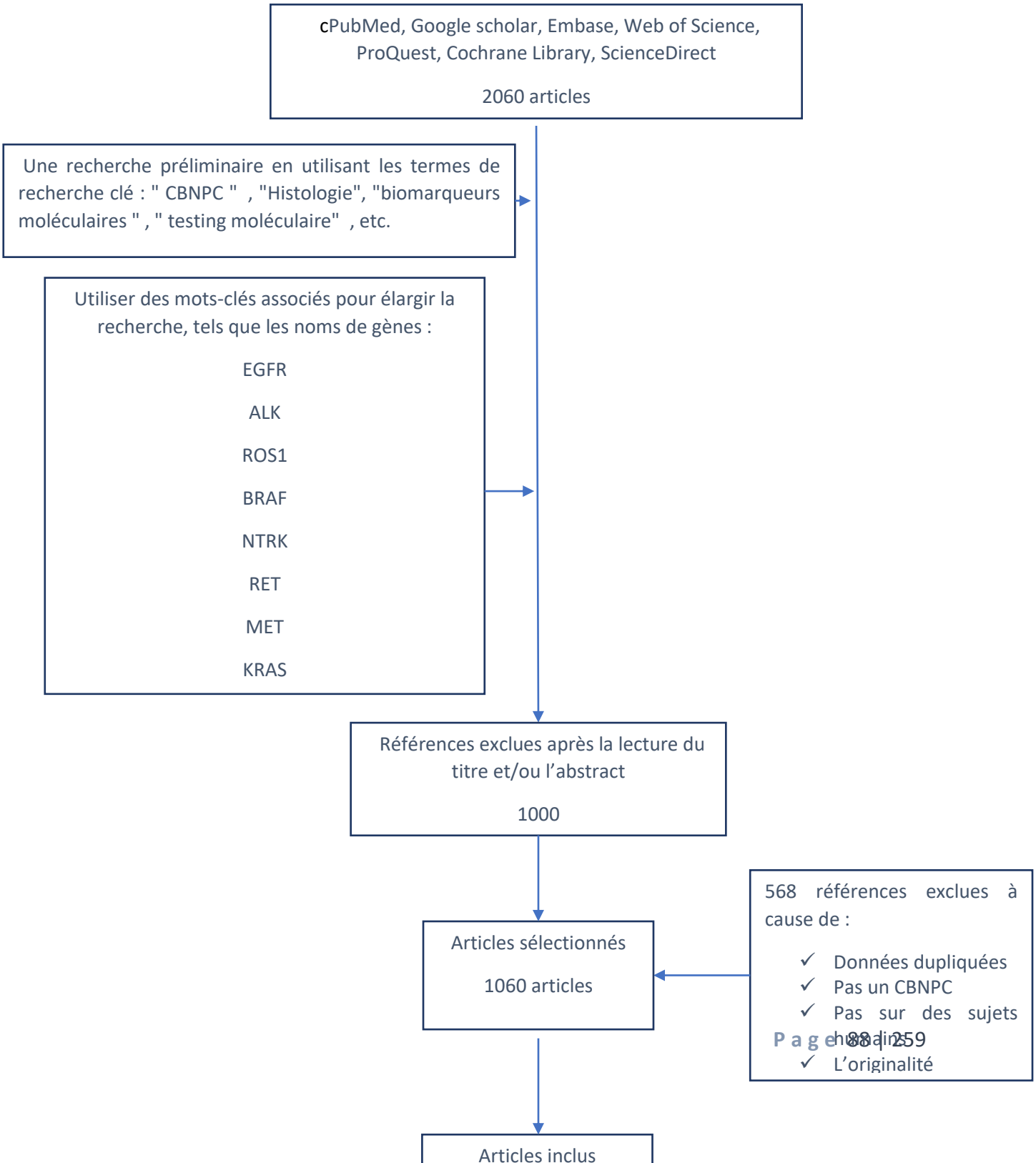
L’effet de la protéine HER2 peut être renforcé lorsqu'il coexiste avec d'autres mutations dépendantes et indépendantes de l'EGFR. Jusqu'à présent, sa coexistence avec EGFR L792X+ C797X + l'amplification de PIK3CA, EGFR G796S + l'amplification de MET et l’amplification PIK3CA a été documentée [283].

L'amplification et les mutations ponctuelles d’HER2 sont responsables de 2 à 5 % et de 1,5 % de la résistance acquise à l'osimertinib, respectivement. Les anticorps anti-HER2, la chimiothérapie et l'immunothérapie semblent être des approches thérapeutiques à bénéfice limité pour les patients atteints de CBNPC présentant des altérations HER2, alors que les ADCs antibody-drug conjugate (Trastuzumab deruxtecan et T-DM1) et les ITK (le poziotinib et le pyrotinib) sont des options thérapeutiques émergentes [326].

Les altérations du gène HER2 sont considérées comme de mauvaises cibles dans le cancer de poumon non à petites cellules et les résultats cliniques restent inférieurs à ceux des patients présentant d'autres altérations génétiques [327]. Jusqu’à présent, plusieurs études ont testé certains agents thérapeutiques pour le traitement des patients présentant un gène HER2 muté ou amplifiés mais malheureusement les résultats ont été controversés et soulignent la grande variabilité de l'efficacité clinique des options thérapeutiques HER2 dans ce sous-type moléculaires du CBNPC [310].

PATIENTS, MATERIEL ET METHODE

I. Méthodologie de la recherche bibliographique :



II. Patients :

II.1 Population de l'étude :

302 patients atteints d'un CBNPC primitif présumé, dont la tumeur a fait l'objet d'une recherche de mutations du gène EGFR ont été inclus dans l'étude. Il s'agit d'une étude prospective. Les prélèvements sont issus de 302 demandes consécutivement adressées par les services d'oncologie médicale, de pneumologie et de radiothérapie à la plateforme d'anatomie pathologique du Centre Hospitalier Universitaire Hassan II de Fès.

II.2 Type de l'étude :

Il s'agit d'une étude observationnelle, prospective, uni-centrique, descriptive et analytique, étalée sur une période de 5ans (du Novembre 2017 au Juin 2022) au sein du service d'anatomie pathologique et de pathologie moléculaire du Centre Hospitalier Universitaire Hassan II de Fès.

La présente thèse s'inscrit dans le cadre d'un projet intitulé « Fréquence de la mutation de l'Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) dans le cancer pulmonaire non à petites cellules non épidermoïde au Maroc », dont le promoteur est Moffit Cancer Center. Ce projet de recherche a été conduit en collaboration étroite avec le service d'oncologie médicale de CHU Hassan II de Fès, afin d'évaluer la prévalence des mutations EGFR dans notre contexte.

II.3 Critères d'inclusion et d'exclusion :

Critères d'inclusions :

Patients âgés de plus de 18 ans.

Patients avec un CBNPC histologiquement confirmés.

Patients présentant un adénocarcinome pulmonaire métastatique.

Patients jeunes et non-fumeurs présentant un carcinome épidermoïde ou NOS métastatique.

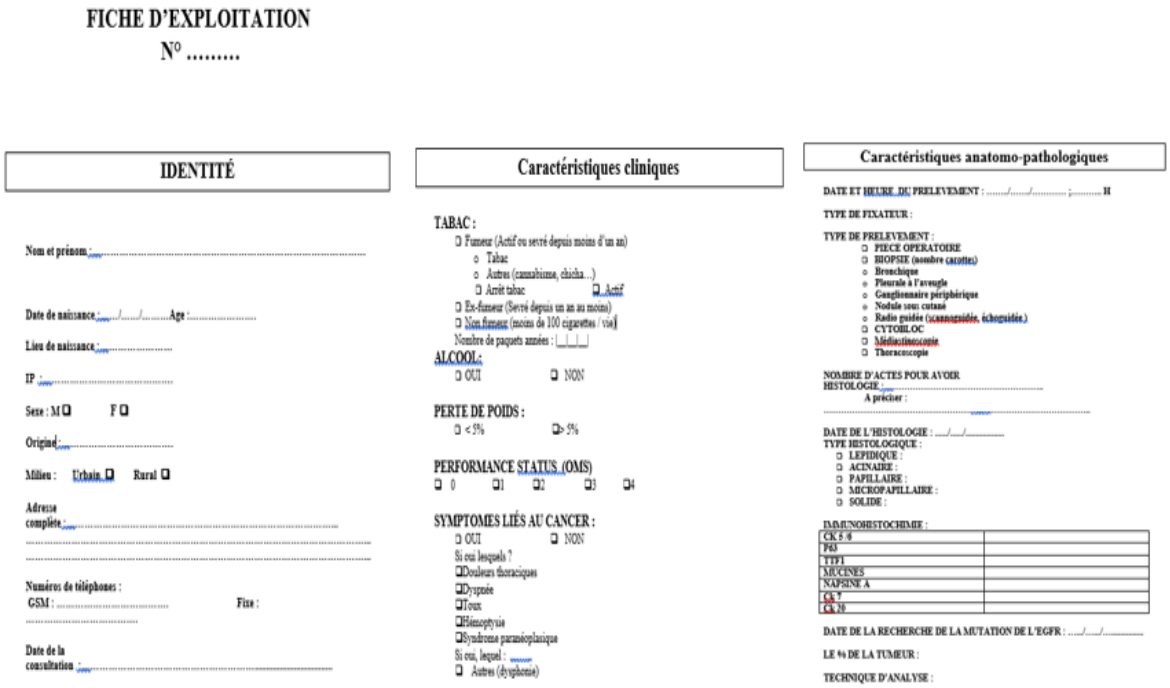
Critère d'exclusions :

Patients ayant refus de signer le consentement.

Matériel tumoral insuffisant.

Dossier médicale incomplet.

Les dossiers médicaux ont été examinés prospectivement, et les patients ont été recrutés en utilisant le CRF suivant (annexe 1).



FICHE D'EXPLOITATION
N° .....

IDENTITÉ

Nom et prénom :

Date de naissance : ..../..../.....Age :

Lieu de naissance :

IP :

Sexe : M ☐ F ☐

Origine :

Milieu : Urbain ☐ Rural ☐

Adresse complète :

Numéros de téléphones :
GSM : Fixe :

Date de la consultation :

Caractéristiques cliniques

TABAC :
☐ Fumeur (Actif ou sevré depuis moins d'un an)
○ Tabac
○ Autres (cannabisme, chicha...)
☐ Arrêt tabac ☐ Actif
☐ Ex-fumeur (Sevré depuis un an au moins)
☐ Non fumeur (moins de 100 cigarettes / vie)
Nombre de paquets années : |_|_|_|

ALCOOL :
☐ OUI ☐ NON

PERTE DE POIDS :
☐ < 5% ☐ > 5%

PERFORMANCE STATUS (OMS)
☐ 0 ☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐ 4

SYMPTOMES LIÉS AU CANCER :
☐ OUI ☐ NON
Si oui lesquels ?
☐ Douleurs thoraciques
☐ Dyspnée
☐ Toux
☐ Hémoptysie
☐ Syndrome paranéoplasique
Si oui, lequel :
☐ Autres (dysphonie)

Caractéristiques anatomo-pathologiques

DATE ET HEURE DU PRELEVEMENT : ...../...../..... ;..... H

TYPE DE FIXATEUR :

TYPE DE PRELEVEMENT :
☐ PIECE OPERATOIRE
☐ BIOPSIE (nombre carottes)
○ Bronchique
○ Pleurale à l'aveugle
○ Ganglionnaire périphérique
○ Nodule sous cutané
○ Radio guidée (scannoguidée, échoguidée)
☐ CYTOBLOC
☐ Médiastinoscopie
☐ Thoracoscopie

NOMBRE D'ACTES POUR AVOIR HISTOLOGIE :
A préciser :

DATE DE L'HISTOLOGIE : ..../..../.....
TYPE HISTOLOGIQUE :
☐ LEPIDIQUE :
☐ ACINAIRE :
☐ PAPILLAIRE :
☐ MICROPAPILLAIRE :
☐ SOLIDE :

IMMUNOHISTOCHIMIE :

CK 5/6	
P63	
TTF1	
MUCINES	
NAPSINE A	
Ck 7	
Ck 20	

DATE DE LA RECHERCHE DE LA MUTATION DE L'EGFR : ..../..../.....

LE % DE LA TUMEUR :

TECHNIQUE D'ANALYSE :

Figure 33 : CRF utilisé dans l'étude

II.4 Aspects Ethiques :

L'approbation du comité d'éthique pour cette étude, a été approuvée par le comité d'éthique pour la recherche biomédicale Casablanca, Maroc, conformément à la Déclaration d'Helsinki, sous la référence 17/15. Le consentement éclairé écrit a été obtenu pour tous les patients.

II.5 Données cliniques et anatomopathologiques des patients :

Les données cliniques et anatomopathologiques tels que, l'âge, le sexe, le statut tabagique, le type de prélèvement (biopsie ou pièce opératoire), le site de prélèvement (primitif ou métastatique), le type histologique, le type et le nombre des sites métastatiques, le stade et la survie ont été obtenues à partir des dossiers médicaux qui incluent les comptes-rendus anatomopathologiques et moléculaires ainsi que les dossiers publiés sur le serveur HOSIX de l'hôpital CHU Hassan II de Fès.

III. Etape pré-analytique :

La majorité des patients présentant un cancer de poumon sont diagnostiqués à un stade tardif (stade IV) donc la plupart des prélèvements reçus sont des biopsies bronchiques. Le diagnostic histologique et moléculaire est souvent réalisé sur des biopsies de petite taille après une phase pré-analytique.

III.1 Examen à l'état frais :

L'examen à l'état frais consiste à un examen à l'œil nu pour l'évaluation, la vérification et les mensurations de la tumeur issue des prélèvements biopsiques et des pièces opératoires.

III.2 La fixation :

La fixation des prélèvements est réalisée immédiatement après l'obtention du prélèvement par le formol à 10% tamponné à PH neutre afin de conserver la morphologie, les sites antigéniques et l'ADN de la cellule pour les études histologique, immunohistochimique et moléculaire. Cette étape ne doit pas dépassée 24h pour les biopsies et 48h pour les pièces opératoires.

III.3 Examen macroscopique :

Pour les biopsies, cette étape consiste à une description détaillée, y compris l'analyse et le comptage des fragments et/ou des carottes reçus. Une description de la taille, la longueur, les limites de la résection tumorale est réalisée pour les pièces opératoires.

Le prélèvement de chirurgie d'exérèse (lobectomie, bilobectomie ou pneumonectomie) une fois reçu au laboratoire, il est lavé, mesuré puis coupé en tranches de 3 à 5mm d'épaisseur. Au minimum 5 blocs sont dédiés pour la partie tumorale, les limites de la tumeur sont aussi prélevées afin de vérifier la qualité de la chirurgie (est ce que la tumeur a été totalement prélevée).

Après l'étude macroscopique, une inclusion totale est réalisée pour les biopsies, pour les pièces chirurgicales le reste du prélèvement est conservé pour une éventuelle analyse complémentaire.

III.4 Prétraitement dans l'Histokinette :

Tous les échantillons choisis dans l'étude macroscopique sont placés dans des cassettes contenant les numéros de références des prélèvements (numéro de biopsie). Une déshydratation par 3 bains d'alcool de concentration croissante (70%, 80% et 100%) est

ensuite réalisée à l'aide de l'automate Histokinette. Le toluène est la solution utilisée pour l'élimination de l'alcool.

III.5 Inclusion en paraffine :

Elle a pour but d'enfermer le prélèvement dans une substance qui le pénètre et l'infiltre. Les échantillons acquièrent ainsi une consistance permettant d'obtenir des coupes minces au microtome. L'échantillon est inclus dans de la paraffine chauffée à une température de 60 °C. Une fois l'échantillon bien imprégné, il se refroidit dans un moule rempli de paraffine qui se solidifie pendant 10 min.



Figure 34 : Appareil d'inclusion, laboratoire de pathologie moléculaire, CHU Hassan II de Fès

III.6 Microtomie :

Les blocs sont coupés à l'aide de microtome, à des épaisseurs allons de 3 à 5 microns. Les lames de verre sont par la suite traitées par de l'alcool, et puis par de la gélatine qui colle les coupes sur les lames. Elles sont enfin incubées dans l'étuve à 90°C pendant une heure pour le déparaffinage.



Figure 35 : Microtome, laboratoire de pathologie moléculaire, CHU Hassan II de Fès

III.7 Coloration des coupes par Hématoxyline-Eosine-Safran (HES) :

La coloration utilisée est de type H.E.S qui a pour but la mise en évidence des noyaux et du cytoplasme des cellules ainsi que les fibres de collagène. Les étapes de cette coloration sont :

- Coloration par l'hématoxyline pendant 5 à 7 min (teintant les noyaux en bleu ou en noir).
- Rinçage à l'eau courante puis à l'eau distillée.
- Coloration dans une solution d'éosine à 1% pendant 2 min (teintant le cytoplasme en rose ou Rouge).
- Rinçage rapide à l'eau courante.
- Déshydratation dans l'alcool.
- Coloration dans le safran alcoolique pendant 1 min (se fixe sur le tissu conjonctif).
- Déshydratation dans l'alcool et passage dans le toluène.



Figure 36 : Appareil de coloration HES, laboratoire de pathologie moléculaire, CHU Hassan II de Fès

III.8 Etude histologique et détermination du pourcentage de cellules tumorales :

L'étude histologique a pour objectif la détermination du type histologique et les caractéristiques anatomopathologiques de la tumeur ainsi que l'estimation du pourcentage de cellules tumorales. Cette étape est assurée par un médecin anatomopathologiste sur les lames HES.

La zone tumorale est déterminée dans le but d'augmenter le nombre de cellules tumorales et d'éviter par conséquent les faux négatifs. Cette étape précise également le choix de la technique utilisée pour l'étude moléculaire. Pour les pourcentages de cellules tumorales faibles, une PCR en temps réel est utilisée, par contre on présence d'un pourcentage de plus de 20% de cellules tumorales une PCR classique suivie du séquençage SANGER peut être réalisée.

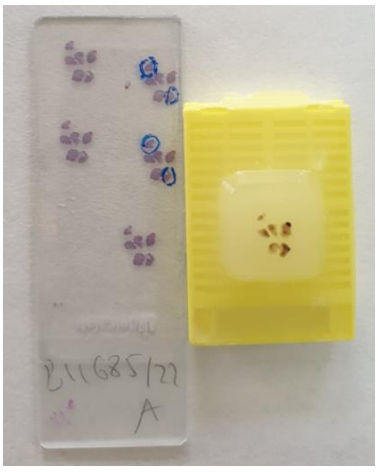


Figure 37 : Délimitation de la zone tumorale, laboratoire de pathologie moléculaire, CHU Hassan II de Fès

IV. Etude immunohistochimique :

Au laboratoire d'anatomie pathologique du CHU Hassan II, l'étude immunohistochimique est réalisée à l'aide d'un automate nommé Ventana Benchmark LT. Cet appareil se charge d'effectuer toutes les étapes nécessaires à la réalisation de l'IHC.

Les principaux anticorps utilisés pour intérêt diagnostic (confirmation du type histologique) sont anti-CK7, anti-TTF1 et anti-P63.

L'étude immunohistochimique des biomarqueurs à intérêt prédictif pour la réponse aux traitement (thérapie ciblée) a été réalisée pour l'anticorps anti-ALK.

IV.1 Principe d'immunohistochimie :

L'immunohistochimie est une méthode d'identification de protéines cellulaires spécifiques, cytoplasmiques, membranaires ou nucléaires, qui caractérise un type ou une fonction cellulaire, grâce à une réaction antigène-anticorps. La mise en évidence des complexes antigène-anticorps est réalisée à l'aide de marqueurs (fluorochromes, éléments radioactifs, enzymes, points quantiques, métaux lourds).

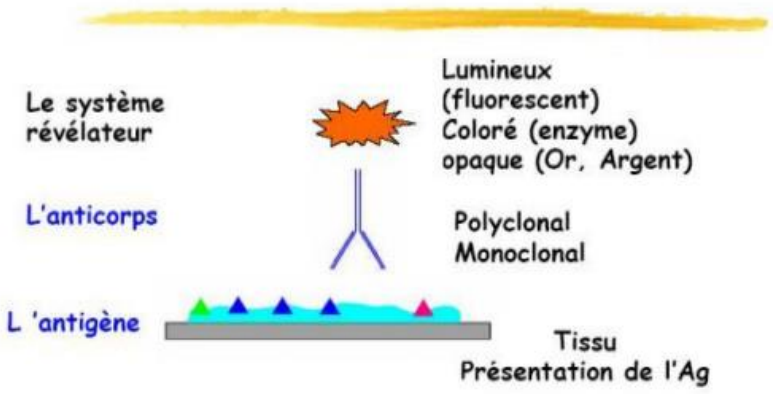


Figure 38 : Principe d'immunohistochimie

IV.2 Détermination de l'expression de l'anticorps anti-ALK :

La détection du réarrangement du gène ALK est indispensable pour la prescription des inhibiteurs de la tyrosine kinase (crizotinib). Cette partie a pour objectif de déterminer, la fréquence du rérarngement ALK, les caractéristiques clinicopathologique et morphologiques des patients ALK réarrangés et d'évaluer leur réponse au ITKs, leur évolution et survie.

IV.2.1 Protocole expérimentale :

L'étude IHC a été réalisée pour 69 patients atteints d'un cancer bronchique non à petites cellules. Une coupe de 4µm a été réalisée pour chaque patient sur des lames de verre silanées afin d'empêcher le décollement du tissu, les lames sont ensuite placées dans l'étuve à 60°C pendant une nuit.

La détection de l'expression de la protéine de fusion ALK a été réalisée par immunohistochimie sur l'automate Ventana BenchMark à l'aide de l'anticorps (VENTANA anti-ALK (D5F3)).

L'expression antigénique a été visualisée en utilisant les kits de révélation « OptiView DAB IHC Detection Kit » et « OptiView Amplification Kit ».

Un témoin positif externe a été utilisé pour chaque lame afin de valider la qualité de la technique et d'éviter les faux négatifs.



Figure 39 : Lame immunohistochimique d'un cas ALK négatif avec un témoin positif, laboratoire de pathologie moléculaire, CHU Hassan II de Fès

IV.2.2 Interprétation des lames :

La détermination du statut ALK positif repose sur une expression de la protéine qui se caractérise par un marquage cytoplasmique granuleux.

Le test immunohistochimique d'ALK est un test très sensible, validé dans la littérature, il permet une analyse reproductible de la coloration (statut positif ou négatif) à l'aide des Kits de détection et d'amplification Optiview. L'absence d'un marquage au niveau du cytoplasme des cellules tumorales est considéré comme un cas négatif. Pour les cas ALK réarrangés, la

présence d'un marquage souvent intense est observé dans presque la totalité des cellules tumorales.

V. Etude moléculaire :

L'étude moléculaire repose sur la détection de la présence d'une mutation du gène EGFR.

V.1 Extraction d'ADN tumoral à partir du tissu fixé et inclus en paraffine :

Avant l'extraction d'ADN, une détermination du pourcentage de cellules tumorales est estimée sur des lames HES issue des prélèvements fixés au formol. L'extraction d'ADN n'est réalisée que sur la zone tumorale entourée par le médecin anatomopathologiste.

La technique d'extraction d'ADN permet d'isoler l'ADN à partir du tissu fixé et inclus en paraffine, en réalisant une lyse membranaire. Les protéines libérées sont dégradées par la protéinase K, puis les débris cellulaires sont éliminés par centrifugation.
Le protocole d'extraction d'ADN par Kit (QIAamp® DNA FFPE Tissue (Invitrogen)) se déroule en 5 étapes majeures :

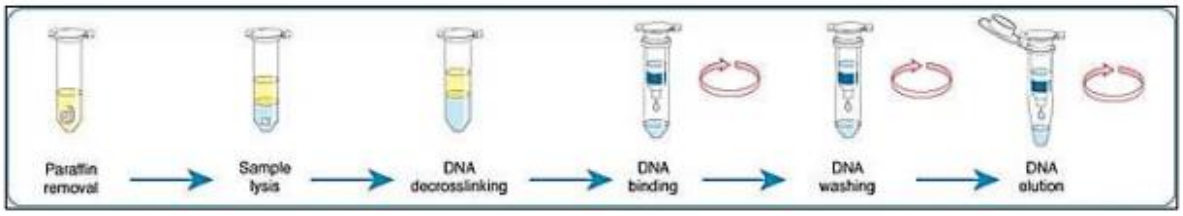


Figure 40 : Extraction d'ADN

V.1.1 Déparaffinage :

Dans un tube Eppendorf de 1,5 ml, 10 coupes de 5µm sont réalisées. 2 bains de toluène sont ajoutés pour retirer la paraffine chacun 1ml. Après centrifugation et rejet du surnageant, 1ml d'éthanol est ajouté afin d'éliminer les résidus de toluène sur l'échantillon (2fois). Une nouvelle centrifugation permet d'éliminer le surnageant et une incubation des échantillons pendant 15 min à 40°C permet l'évaporation des résidus d'éthanol.

V.1.2 Lyse du tissu (digestion) :

Le culot ainsi obtenu est resuspendu dans 200µl de tampon de digestion et 4µl de la protéinase K est ajoutée. Le tout est incubé, toute la nuit, dans l'étuve à 56°C. Si au bout de cette nuit le tissu n'est pas bien digéré, 2µl de PK est ajoutée, le tout incubé à 64°C pendant 1 heure jusqu'à dégradation totale du fragment tissulaire.

V.1.3 Arrêt de la digestion et isolation d'ADN :

Pour arrêter la digestion et isoler l'ADN des débris cellulaires et protéiques, un mélange d'isolation Additif / éthanol (240µl d'isolation + 550µl d'éthanol) est ajouté. L'ensemble du lysat est ensuite transféré soigneusement dans une colonne QIAamp MinElute. Une centrifugation à 8000rpm pendant 1min permet d'écouler le lysat à travers la membrane de la colonne.

V.1.4 Lavage de l'ADN des contaminants résiduels :

700µl du tampon de lavage AW1 est ajouté à la colonne. Le tout est centrifugé à 8000rpm pendant 1min et le volume écoulé est éliminé. Un nouveau lavage avec 500µl du tampon AW2 est effectué, suivi d'une centrifugation à 8000rpm pendant 1min et rejet du volume écoulé, cette étape est réalisée deux fois. Ensuite, une centrifugation à vitesse maximale (14000rpm) pendant 1min est requise pour sécher la membrane de la colonne de toute trace d'éthanol contenu dans les solutions de lavage.

V.1.5 Elution et quantification de l'ADN :

60µl du tampon d'élution ATE préchauffé à une température de 95°C est appliqué au centre de la membrane de la colonne. La centrifugation à vitesse maximale (14000rpm) pendant 1min, permet de récupérer la solution contenant l'ADN dans un tube Eppendorf de 1,5ml.

V.2 Dosage de l'ADN :

Cette étape permet de quantifier l'ADN extrait. Le dosage d'ADN est réalisé par Qubit 3. Fluorometer. Pour ce faire, il faut préparer deux tubes d'essai pour les échantillons standard et un tube d'essai pour chaque échantillon utilisateur. Préparer la solution du qubit en diluant le réactif Qubit reagent (1 x nµl) dans le tampon Qubit buffer (199 x nµl). Pour chaque standard et échantillon, 200µl de la solution préparée est ajouté. Ajouter 2µl de la Sonde 1 au standard 1, 2µl de la sonde 2 au standard 2 et 2µl d'ADN pour chaque échantillon. Incuber les tubes pendant 2 minutes à température ambiante puis insérer les tubes dans l'appareil qubit.



Figure 41 : Qubit 3. Fluorometer

V.3 Recherche des mutations du gène EGFR :

V.3.1 Séquençage Sanger :

V.3.1.1 Choix des amorces :

Les séquences d'amorces utilisées pour la PCR et le séquençage, sont désignées grâce au programme BLAST primer. Ces amorces sont hybridées avec une partie de la région exonique de chaque exon.

Le choix des amorces est sans doute le paramètre le plus important pour le succès de la PCR. Pour la sélection des amorces, plusieurs variables doivent être prises en considération :

- La longueur de l'amorce,
- Les amorces R/F doivent s'hybrider à l'ADN matrice dans les mêmes conditions de température,
- La spécificité,
- Les séquences des deux amorces ne doivent pas être complémentaires,
- La teneur en G/C,

Les séquences des couples d'amorces choisis, sont mentionnées dans le tableau suivant.

Tableau 5 : Séquences des couples d'amorces utilisées pour l'amplification par PCR du gène EGFR

EGFR – Exon	Séquence d'amorce	Tm (°C)	Taux de GC
EGFR - Ex 18 Forward	GAGGTGACCCTTGTCTCTGTG (21)	61.8	57.1%
EGFR – Ex 18 Reverse	CCCCACCAGACCATGAGAG (19)	61.0	63.2%
EGFR - Ex 19 Forward	GGGTGCATCGCTGGTAACAT (20)	59,4	55%
EGFR – Ex 19 Reverse	ATGTGGAGATGAGCAGGGTC (20)	59.4	55%
EGFR – Ex 20 Forward	ATTCATGCGTCTTCACCTGGAA (22)	58.4	45.5%
EGFR – Ex 20 Reverse	CCCTATCTCCCTTCCCTGATTAC (23)	62.4	52.2%
EGFR – Ex 21 Forward	TGGCATGAACATGACCCTGA (20)	57.3	50%
EGFR – Ex 21 Reverse	CCCTGGTGTCAGGAAAATGCT (21)	59.8	52.4%

Le calcule théorique de la température d'hybridation pour toutes les amorces a été calculé en utilisant les formules suivantes :

$$Tm = 4 (G + C) + 2 (A + T) ; Tm - 5$$

EGFR Ex 18F : Tm = 66 ; Tm – 5 = 61

EGFR Ex 18R : Tm = 62 ; Tm – 5 = 58

EGFR Ex 19F : Tm = 62 ; Tm – 5 = 58

EGFR Ex 19R : Tm = 62 ; Tm – 5 = 58

EGFR Ex 20F : Tm = 64 ; Tm – 5 = 59

EGFR Ex 20R : Tm = 70 ; Tm – 5 = 65

EGFR Ex 21F : Tm = 60 ; Tm – 5 = 55

EGFR Ex 21R : Tm = 64 ; Tm – 5 = 59

Pour faire la mise au point de la technique, nous avons commencé par un ADN témoin de bonne qualité, on a essayé avec quatre températures (55, 58, 60 et 62°C) pour les quatre exons. Après PCR et la migration sur le gel pour le contrôle, on a adopté que la température 62°C est la température idéale pour l'hybridation des amorces Forward et Reverse des exons 18 et 20. Pour l'exon 19, la température optimale était 58°C. 55°C était la meilleure température pour l'exon 21.

Tableau 6 : Température adoptée pour chaque exon après la mise au point

EGFR - Exon	Température
EGFR - Exon 18	62 °C
EGFR - Exon 19	58 °C
EGFR – Exon 20	62 °C
EGFR – Exon 21	55 °C

V.3.1.2 Réaction en chaine par polymérase (PCR) :

Pour la recherche des mutations affectant le gène EGFR, une réaction de polymérisation en chaine est réalisée pour les exons 18, 19, 20 et 21.

V.3.1.2.1 Principe de la technique :

La PCR (Polymerase Chain Reaction) est un procédé d'amplification in vitro de l'ADN. Il permet de fournir une quantité suffisante et détectable d'une séquence d'ADN sélectionnée (matrice) en utilisant des amorces spécifiques afin de l'exploiter. Cette technique repose sur une succession de nombreux cycles. Chaque cycle de PCR est constitué de trois phases, réalisées à des températures différentes, ce qui permet de contrôler l'activité enzymatique :

1. La dénaturation d'ADN : cette étape est réalisée à une température de 95°C pour une séparation complète des deux brins d'ADN.
2. L'hybridation : la température d'hybridation est définie en fonction de la nature des amorces utilisées. Cette dernière permettra la stabilité des hybrides une fois que l'appariement amorces / matrice est réalisé.
3. La polymérisation : cette étape est réalisée à une température d'environ 72°C, pour assurer le fonctionnement optimal de la Taq polymérase. Au cours de cette étape, les brins complémentaires d'ADN sont synthétisés à partir des extrémités 3'OH libre des amorces hybridées.

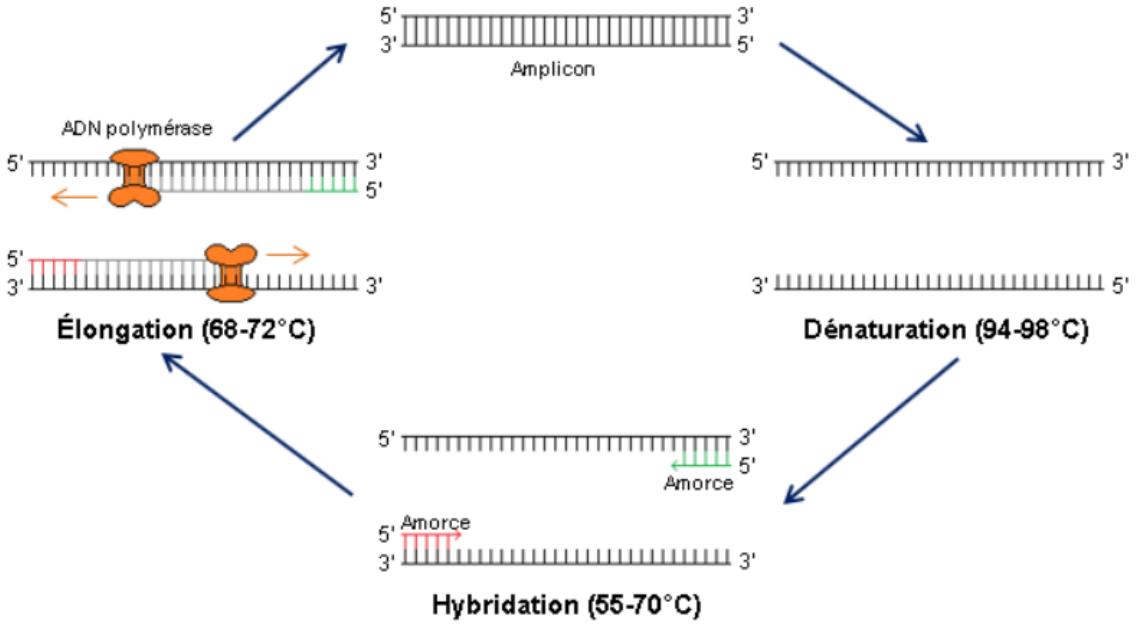


Figure 42 : Les étapes de la PCR

V.3.1.2.2 Protocol expérimentale :

La PCR est réalisée dans un volume de 50 ul contenant 50 ng d'ADN matrice. Pour une réaction le mélange réactionnel contient 38µl d'eau pure, 5µl du Buffer, 1µl de dNTP, 0,5µl d'amorces (12,5µM), et 0,4µl de la Taq polymérase. 5µl d'ADN avec une concentration de 10ng/µl est ensuite ajouté pour chaque patient. Pour chaque essai de PCR, un témoin négatif

exempt d'ADN a été associé à l'ensemble des échantillons traités, ce qui permet de contrôler la qualité de la manipulation et s'assurer de l'absence des contaminants d'acides nucléiques. Ce protocole a nécessité initialement différents ajustements pour l'optimiser et obtenir les produits d'amplification attendus.



Figure 43 : Le Kit utilisé pour la PCR classique

Tableau 7 : Protocole de la PCR

Mix PCR	Volume
Buffer	2,5µl
dNTP	0,5µl
Amorce F	0,3µl
Amorce R	0,3µl
Taq ADN polymérase	0,15µl
H2O pure	21µl
ADN	2,5µl

Tableau 8 : Programme PCR de l'exon 18 - 21 du gène EGFR

Cycles	Temps	Température
Dénaturation	5min	94°C

Dénaturation	30sec	94°C
Hybridation	45sec	55-58-62°C
Elongation	1min	72°C
Elongation	10min	72°C
Conservation	∞	4°C



Figure 44 : Programme de la PCR du gène EGFR, laboratoire de pathologie moléculaire, CHU Hassan II de Fès

V.3.1.2.3 Contrôle des produits PCR par électrophorèse sur gel d'agarose :

Les produits PCR obtenus sont soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose 2% pour apprécier la qualité et la quantité des amplicons. Le gel utilisé contient 1 g de poudre d'agarose, 50 ml du tampon TBE 1X et 2 µl du bromure d'éthidium (10 mg/ml). Après migration sous champ électrique, les bandes ayant été séparées selon leurs poids moléculaires sont visualisées sous lumière UV grâce à l'intercalation du bromure d'éthidium entre les différentes paires de bases.

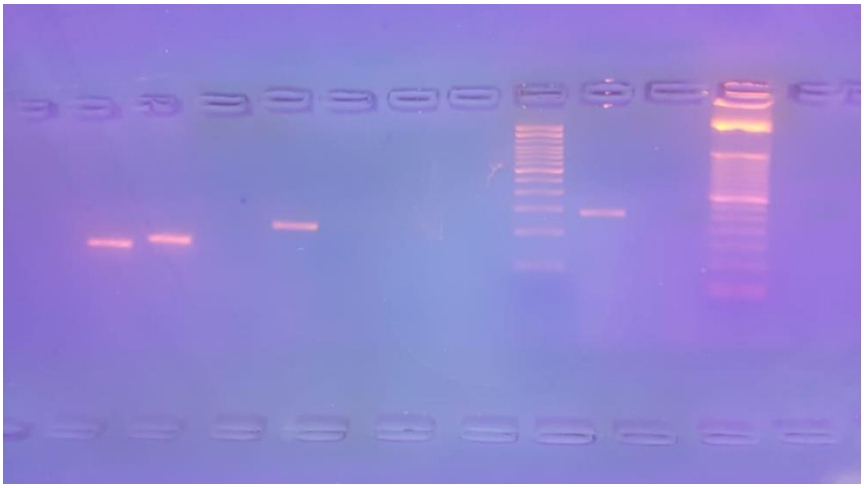


Figure 45 : Migration sur gel d'agarose 2%, laboratoire de pathologie moléculaire, CHU Hassan II de Fès

V.3.1.3 Séquençage Sanger (direct) :

Après la PCR pour les exons 18, 19, 20 et 21 du gène EGFR, les produits PCR obtenus doivent être purifiés pour éliminer l'excès de dNTP non incorporé, d'amorces, de sels, et d'enzymes qui peuvent interférer avec la séquence cible au moment du séquençage.

V.3.1.3.1 Purification des produits PCR obtenus :

Après PCR, une purification simple est rapide est réalisée au produit PCR à l'aide d'exoSAP It. Cette étape permet l'élimination des contaminants de types dNTPs et amorces non consommées qui, pourraient interférer avec les étapes de séquençage.

L'exoSAP It utilise deux enzymes hydrolytiques, l'exonucléase I et la phosphatase alcaline. L'exonucléase I supprime les amorces simple brins résiduelles et tous les ADNs simple brins étrangers produits dans la PCR. La phosphatase alcaline supprime les dNTPs restant dans le mélange de la PCR. Pour la purification des produits PCR, 2,5µl d'exoSAP It est ajouté directement à 5.5µl de produit PCR, le tout est incubé à 37°C pendant 2 min. Le réactif ExoSAP It est ensuite inactivé à 80°C pendant 3min.



Figure 46 : Produit utilisé pour la purification du produit PCR

V.3.1.3.2 Réaction de séquence :

On procède au séquençage des produits PCR obtenus après l'étape de purification. La méthode Sanger est une technique automatisée des interrupteurs de chaîne, adaptée à la fluorescence qui repose sur l'utilisation des Kits spécifiques contenant quatre types de marquages fluorochromes.

Cette technique est une réaction PCR spécifique qui utilise plus les réactifs classiques de la PCR, quatre didésoxyribonucléotides (ddNTP) marqués par différents fluorochromes avec des spectres d'émission spécifiques. Dans l'étape d'élongation, les ddNTPs une fois incorporés bloquent la polymérisation entrainant la génération de fragments d'ADN de différentes tailles avec un ddATP ou bien ddCTP/ddGTP/ddTTP à la fin de la séquence. Ensuite une électrophorèse sur gel de polyacrylamide permet la séparation des fragments selon leur poid moléculaire. Chaque spectre de fluorescence spécifique de chaque ddNTP est ensuite capté puis transformé en un pic (4 couleurs différentes). Pour chaque patient la succession des pics générés est tracée dans un électrophérogramme qui fera l'objet d'une analyse bio-informatique.

La composition du mix réactionnel de la PCR de séquence est résumée dans le tableau suivant:

Tableau 9 : Protocole de la réaction de séquence

Réactifs	Volumes
Eau	3
Tampon	1
Amorce	1
Big Dye terminator V3.1	1,5
Produit PCR purifié	4

Ce processus est suivi d'une étape de purification, qui vise à éliminer tout excès de réactif qui pourrait interférer avec les procédures suivantes.

Tableau 10 : Protocole de purification

Réactifs	Volumes

X-terminator	10
SAM (tampon)	45
Produit de séquence	10

A la fin du séquençage, on obtient des séquences nucléotidiques qui correspondent aux régions amplifiées des exons 18, 19, 20 et 21 du gènes EGFR des patients concernés. Ces différentes séquences sont sujettes à une analyse bio-informatique dans le but de rechercher la présence d'éventuelles mutations.

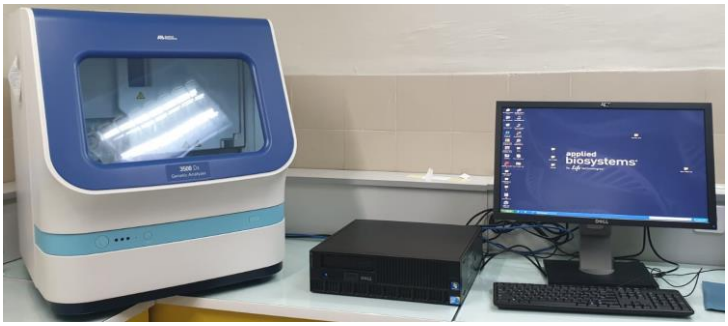


Figure 47 : Séquenceur Applied Biosystems™ 3500 Dx, laboratoire de pathologie moléculaire, CHU Hassan II de Fès

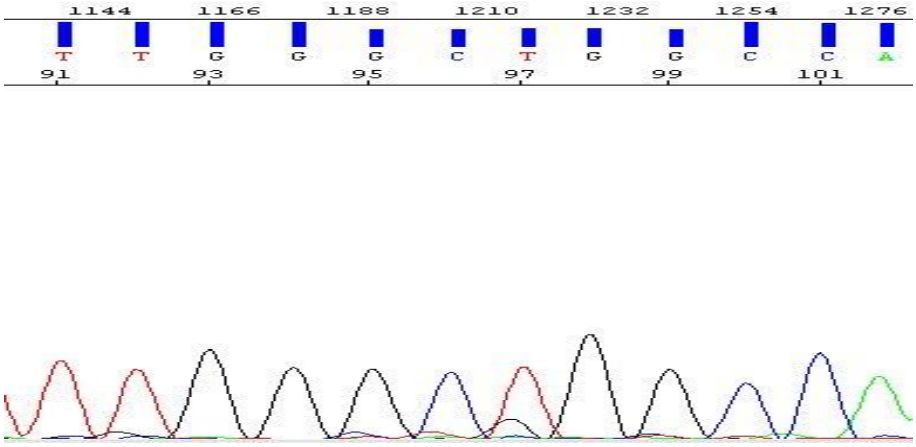


Figure 48 : Electropherogramme, laboratoire de pathologie moléculaire, CHU Hassan II de Fès

V.3.1.3.3 Analyse bio-informatique :

Une analyse avancée des séquences obtenues par les outils bioinformatiques, telles que le logiciel d'alignement des séquences de nucléotides (BLASTn), est nécessaire pour l'interprétation des résultats de la biologie moléculaire.

Chaque séquence obtenue est alignée dans une base de données de NCBI par le logiciel «Nucleotide BLAST» (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov). Ce dernier calcule le pourcentage de similarité entre toutes les séquences incluses dans la base de données pour trouver celles qui indiquent les séquences nucléotidiques les plus similaires à la séquence saisie pour chaque patient.

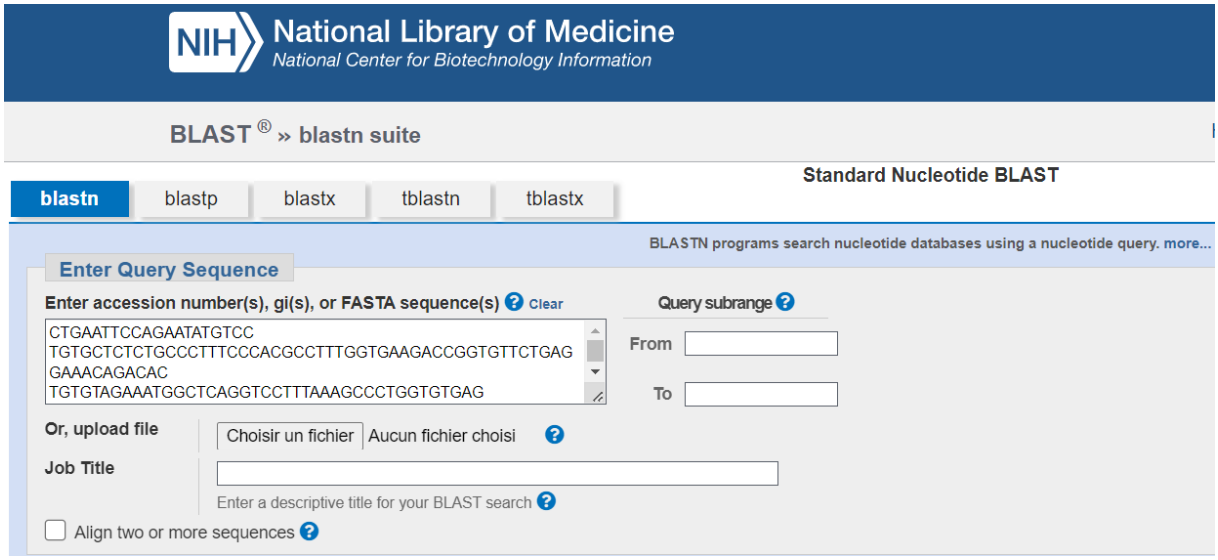


Figure 49 : Analyse de séquence par BLASTn

Après l'analyse de séquence, BLASTn affiche les séquences les plus similaires accompagnées des pourcentages d'identités correspondants. L'alignement des séquences similaires est également affiché en détail.

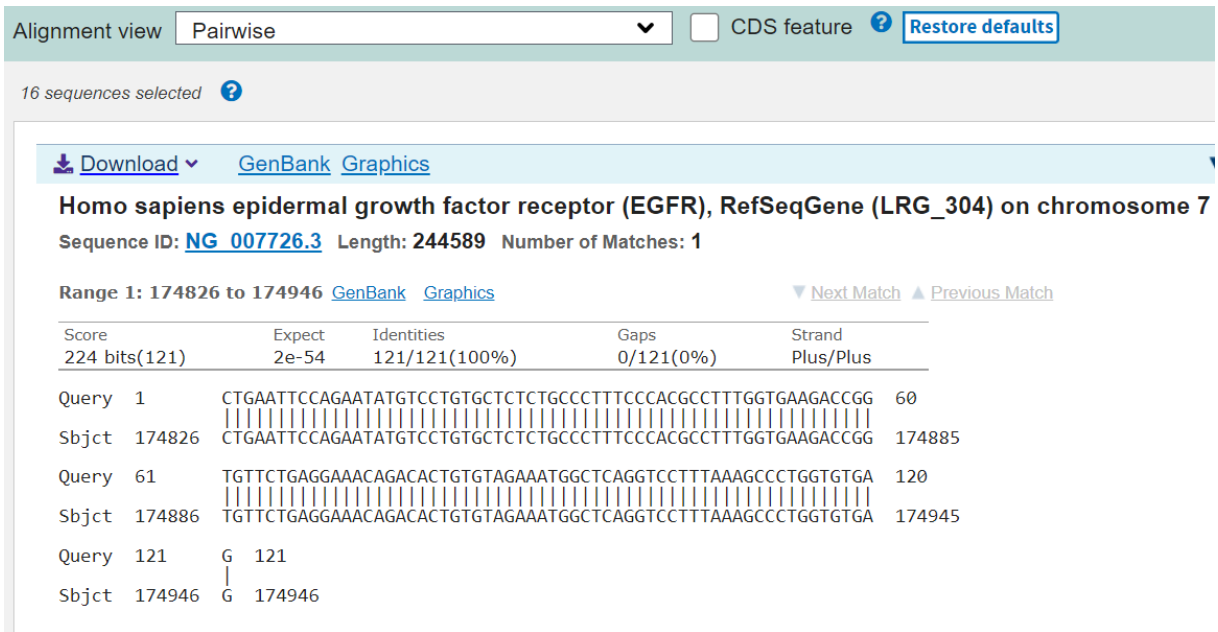


Figure 50 : L'alignement de la séquence cible en correspondance avec les séquences similaires

En l'absence de mutations, la séquence nucléotidique de la séquence requête doit être totalement identique à celle de la séquence de référence d'un individu sain. Toutefois, en présence de mutations, le pourcentage d'identité diminue à mesure que le nombre de différences observées augmente.

V.3.2 Techniques plus sensibles basé sur la PCR :

Le diagnostic histologique et moléculaire des patients atteint d'un cancer de poumon est souvent porté sur des prélèvements biopsiques de petites tailles en raison d'un diagnostic tardif. La méthode Sanger représente plusieurs inconvénients tel que la limite de sensibilité, la complexité, le taux de contamination élevé ..etc, ces inconvénients ont fait l'objet pour l'installation de nouvelles technologies plus sensibles et rapides afin d'assurer un diagnostic moléculaire dans des meilleurs conditions et les plus brefs délais.

V.3.2.1 PCR en temps réel :

La technique de PCR en temps réel est assurée par un thermocycleur de real-time PCR instauré au laboratoire de pathologie moléculaire de CHU Hassan II depuis l'année 2017, cette technique a pour objectif de :

- ✓ Détecter les mutations EGFR pour les cas avec les pourcentages de cellules tumorales faible (inférieur à 5%).
- ✓ Détecter les mutations EGFR pour les cas dont l'ADN a été dégradé dans la phase pré-analytique.
- ✓ Fournir des résultats fiables dans les plus brefs délai (3jours) pour assurer une prise en charge efficace et rapide.

V.3.2.1.1 Principe de la technique :

ARMS :

Le système ARMS (Amplification Refractory Mutation System) est utilisé pour réaliser une amplification sélective des allèles ou des mutants. L'ADN polymérase (Taq) fait efficacement la distinction entre un mismatch et un appariement à l'extrémité 3' d'une amorce PCR. Même dans les prélèvements où la majorité des séquences sont wild type WT (ne portent pas la mutation), les séquences présentant des mutations spécifiques sont amplifiées de manière sélective. L'efficacité de l'amplification est maximale lorsque les amorces sont entièrement

couplées. Une faible amplification de fond est obtenue dans le cas où la base 3' est mal appariée.

Scorpion :

La technologie Scorpions est utilisée pour détecter l'amplification. Une amorce PCR est attachée de manière covalente à une sonde dans les molécules Scorpions, ce qui les rend bifonctionnelles. Le fluorophore de cette sonde interagit avec un quencher, qui est également intégré à la sonde et diminue la fluorescence. Le fluorophore et le quencher se dissocient pendant la PCR lorsque la sonde s'hybride à l'amplicon, ce qui entraine par conséquent une nette augmentation de la fluorescence.

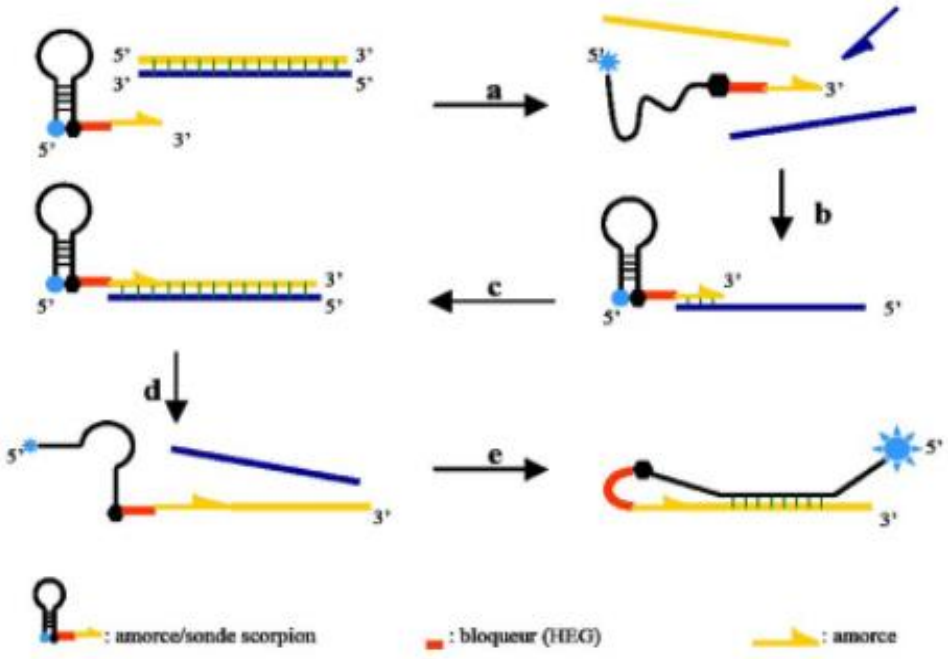


Figure 51 : Sonde d'hybridation scorpion

V.3.2.1.2 Therascreen EGFR RGQ PCR Kit :

Le kit TheraScreen EGFR RGQ PCR KIT (Qiagen, ALLEMAGNE), est utilisé pour la recherche des mutations du gène EGFR. Ce Kit comprend un test de diagnostic in vitro basé sur les technologies Scorpions® et ARMS (Amplification Refractory Mutation System) pour la détection de 29 mutations somatiques dans les exons 18, 19, 20 et 21 de l'oncogène EGFR en présence d'un fond d'ADN génomique de type sauvage.

La réaction PCR est réalisée par un thermocycleur de real-time PCR Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.



Figure 52 : Thermocycleur de real-time PCR Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM, laboratoire de pathologie moléculaire, CHU Hassan II de Fès

V.3.2.1.2.1 Protocol expérimental :

Ce test comprend une procédure en deux étapes.

V.3.2.1.2.1.1 Test de contrôle (CTRL) :

Lors de la première étape, le test de contrôle est effectué afin d'évaluer l'ADN d'EGFR amplifiable total d'un échantillon. Ce test permet l'amplification d'une région de l'exon 2 du gène EGFR. L'amorce et la sonde ont été désignées de façon à empêcher tout polymorphisme connu de l'EGFR.

En bref, le master mix de contrôle (mélange réactionnel de contrôle [CTRL] + la Taq polymérase) est préparé pour l'échantillon d'ADN a testé, une réaction avec le PC EGFR et une réaction avec le NTC.

Tableau 11 : Protocole de test de contrôle

Réactifs	Volumes
Mélange réactionnel de contrôle (CTRL)	19,5 µl × (n + 1)*
Taq ADN polymérase	0,5 µl × (n + 1)*
Totale	20µl/réaction

V.3.2.1.2.1.2 Test de mutation :

Une fois le test de contrôle d'ADN s'avère satisfaisant, celui-ci peut subir les tests de mutations EGFR. Cette étape est dédiée pour la détermination de la présence ou non d'ADN mutant. Le therascreen EGFR RGQ Kit permet l'identification de 29 mutations, dix-neuf

délétions dans l'exon 19, trois insertions dans l'exon 20 et les substitutions G719X (G719S, G719A ou G719C), S768I, T790M, L858R et la L861Q.

Pour ce faire, il faut préparer suffisamment de master mix pour les tests (Taq polymérase + les mélanges réactionnels des tests « CTRL, T790M, Délétions, L858R, L861Q, G719X, S768I et Insertions ») pour les échantillons d'ADN, une réaction avec le PC EGFR et une réaction avec le NTC.

Tableau 12 : Protocole des tests de mutation

Test	Tube de mélange réactionnel	Volume de mélange réactionnel	Volume de Taq ADN polymérase
Contrôle	CTRL	19,5 µl × (n + 1)*	0,5 µl × (n + 1)*
T790M	T790M	19,5 µl × (n + 1)	0,5 µl × (n + 1)
Délétions	Del	19,5 µl × (n + 1)	0,5 µl × (n + 1)
L858R	L858R	19,5 µl × (n + 1)	0,5 µl × (n + 1)
L861Q	L861Q	19,5 µl × (n + 1)	0,5 µl × (n + 1)
G719X	G719X	19,5 µl × (n + 1)	0,5 µl × (n + 1)
S768I	S768I	19,5 µl × (n + 1)	0,5 µl × (n + 1)
Insertions	Ins	19,5 µl × (n + 1)	0,5 µl × (n + 1)

L'analyse et la détection des mutations sont effectuées automatiquement une fois que le cycle est terminé par un système fermé.

Limites de la PCR en temps réel en utilisant le therascreen EGFR RGQ PCR Kit :

- ✓ Le produit est destiné à être utilisé uniquement sur un thermocycleur de real-time PCR Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.
- ✓ La technique nécessite une grande quantité d'ADN, alors qu'on travaille le plus souvent sur des biopsies bronchiques de très petite taille.
- ✓ Si l'un des test PC et/ou NTC sont invalide, tout le Run est invalide.
- ✓ Système fermé, l'analye se fait automatiquement.
- ✓ Le Kit ne permet que la détection de 29 mutations déjà connues, la découverte de nouvelles mutations est impossible.

V.3.3 Pyroséquençage :

La technologie de Pyroséquençage est instaurée au laboratoire de pathologie moléculaire de CHU Hassan II depuis l'année 2017, elle a les mêmes objectifs que la PCR en temps réel.

V.3.3.1 Principe de la technique :

Le pyroséquençage est une méthode quantitative en temps réel permettant d'examiner des régions de 300 pb. Il s'agit d'un séquençage par synthèse (SBS) qui permet la détection de l'activité de l'ADN polymérase en temps réel.

La première étape du pyroséqueçage est une amplification d'un segment d'ADN, le brin matrice du pyroséquençage est biotinylé. Les nucléotides sont ensuite ajoutés un par un. Une incorporation du premier nucléotide complémentaire dans le brin néosynthétisé est catalysée par l'ADN polymérase. Après chaque incorporation, un pyrophosphate (PPi) est libéré en une quantité proportionnelle au nombre de nucléotides intégrés. En présence d'adénosine 5' phosphosulfate, une ATP sulfurylase convertit le PPi en ATP (APS). Avec l'aide de la luciférase, la molécule d'ATP est ensuite utilisée pour convertir la luciférine en oxyluciférine. Cela produit un signal lumineux, recueilli par le capteur CCD (Charge Coupled Device) du séquenceur et reproduit en un pic sur le pyrogramme. Le nombre de nucléotides insérés détermine la hauteur de chaque pic (signal lumineux). Le brin d'ADN complémentaire est créé au fur et à mesure que le processus séquentiel d'addition de nucléotides se poursuit, et la séquence à examiner est déterminée à partir des pics de signal dans le pyrogramme.

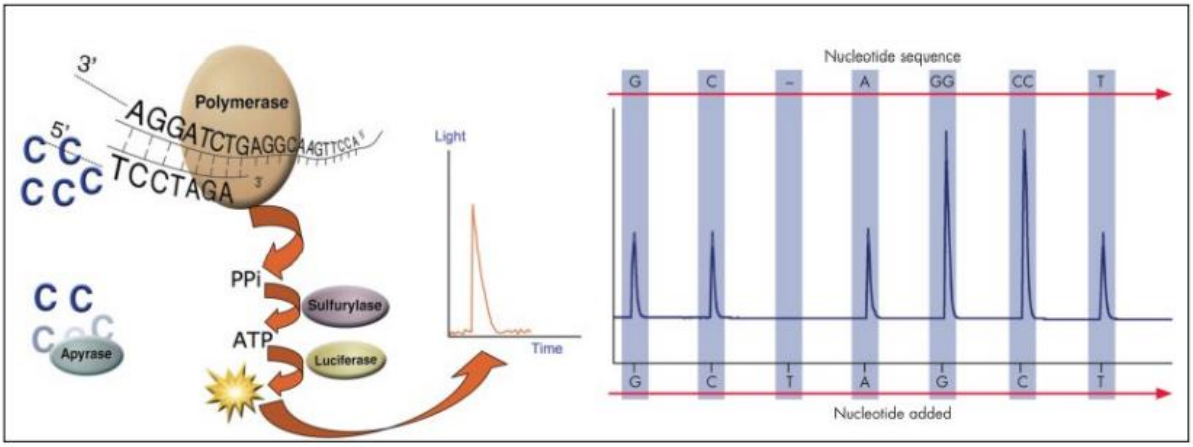


Figure 53 : Principe du pyroséquençage

V.3.3.2 Therascreen® EGFR Pyro® Kit :

Le kit therascreen EGFR Pyro est un test de détection in vitro basé sur le Pyrosequencing® pour la détection quantitative des mutations dans les codons 719, 768, 790 et 858-861, ainsi que des délétions et des mutations complexes du gène EGFR humain dans l'ADN génomique provenant d'échantillons de tissus humains.

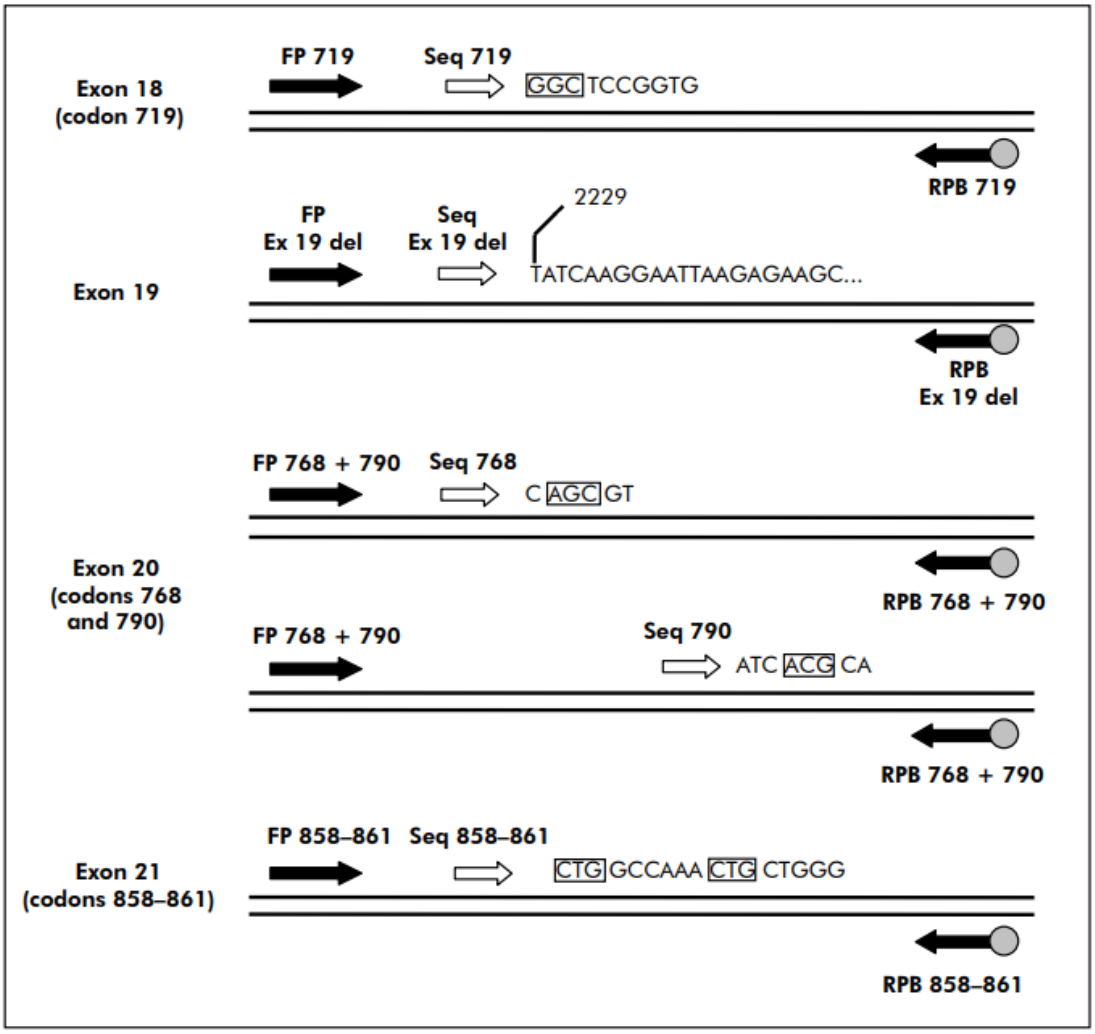


Figure 54 : Illustration du test EGFR

La séquence indiquée est la séquence analysée pour un échantillon de type sauvage. FP : amorces Forward ; RPB : amorces Reverse (B indique la biotinylation) ; Seq : amorces de séquençage (HB)

V.3.3.2.1 Protocole expérimentale :

La technique de pyroséquençage consiste à suivre les étapes suivantes :

V.3.3.2.1.1 La réaction PCR :

Le protocole indiqué dans le tableau 14 est destiné à 4 amplifications PCR distinctes des régions contenant le codon 719 (exon 18), les codons 768 et 790 (exon 20), les codons 858-861 (exon 21), ou des délétions et des mutations complexes dans l'exon 19 en utilisant les amorces Pyro EGFR therascreen.

Tableau 13 : Mix réactionnel pour la PCR

Component	Volume/reaction (µl)
PyroMark PCR Master Mix, 2x	12.5
CoralLoad Concentrate, 10x	2.5
PCR Primer EGFR 719 **or** PCR Primer EGFR Ex19 Del **or** PCR Primer EGFR 768 and 790 **or** PCR Primer EGFR 858–861	1.0
Water (H_2O, supplied)	4.0
Total volume	**20.0**

Après la préparation du Mix, 5 µl d'ADN matrice (2-10 ng d'ADN génomique) est ajouté dans les tubes PCR individuels.

La PCR est réalisée sur un thermocycleur selon le programme suivant :

Tableau 14 : Programme de la PCR

			Comments
Initial activation step:	15 minutes	95°C	HotStarTaq DNA polymerase is activated by this heating step.
3-step cycling:			
Denaturation	20 seconds	95°C	
Annealing	30 seconds	53°C	
Extension	20 seconds	72°C	
Number of cycles	42		
Final extension:	5 minutes	72°C	

Un contrôle négatif (CN) + un contrôle positif (CP : ADN non méthylé) sont inclus dans chaque Run afin de s'assurer de l'absence de contamination (CN), d'une interprétation adéquate des résultats (CP) et l'identification des mutations du faible niveau (CP).

V.3.3.2.1.2 Immobilisation des produits PCR

Ce protocole (Tableau) concerne l'immobilisation de l'ADN matrice sur les billes Sepharose Streptavidine Haute Performance (GE Healthcare) avant l'analyse sur le système PyroMark Q24.

Tableau 15 : Protocol d'immobilisation

Component	Volume/sample (µl)
Streptavidin Sepharose High Performance	2
PyroMark Binding Buffer	40
Water (H_2O, supplied)	28
Total volume	**70**

Après la préparation du Mix, 70 µl du mix est ensuite mélangé avec 10µl de produit PCR biotinylé dans une barrette qui sera scellée à l'aide de bouchons puis par un film adhésif pour empêcher toute fuite éventuelle. La plaque est ensuite placée sur un agitateur à température ambiante pendant 5-10 min à 1400 rpm.

V.3.3.2.1.3 Hybridation des amorces de séquence avec les produits PCR :

Les amorces de séquençage sont ensuite diluées dans un tampon d'hybridation Pyromark (Tableau).

Tableau 16 : Dilution des amorces de séquençage

Component	Volume/sample (µl)	Volume for 9 + 1 reactions (µl)
Seq Primer EGFR 719 **or** Seq Primer EGFR Ex 19 Del **or** Seq Primer EGFR 768 **or** Seq Primer EGFR 790 **or** Seq Primer EGFR 858–861	0.8	8
PyroMark Annealing Buffer	24.2	242
Total volume	**25**	**250**

L'hybridation des amorces de séquence avec les produits PCR est réalisée sur une station de travail sous vide Pyromark Q24. Avant l'étape d'hybridation l'ADN fixé aux billes de sépharose est aspiré et immobilisé sur un filtre, ensuite, il subit une série d'étapes de traitement par des solutions d'éthanol, de dénaturation et du lavage. L'hybridation est réalisée par l'immersion du filtre dans 20µl d'amorce de séquence préalablement diluée et déposée sur la plaque Pyromark de 24 puits. Cette dernière est ensuite incubée sur une plaque chauffante à 80°C pendant 5 minutes puis refroidit à température ambiante pendant 15 à 25°C.



Figure 55 : La station PyroMark Q24, laboratoire de pathologie moléculaire, CHU Hassan II de Fès

V.3.3.2.1.4 Préparation de la cartouche et lancement du Run :

La cartouche PyroMark Q24 doit être remplie avant de lancer le Run. Elle contient les solutions d'enzymes, de substrats et de nucléotides (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) nécessaire pour le séquençage. Une fois la plaque et la cartouche remplies sont placées dans le PyroMark Q24, le test peut être lancé.



Figure 56 : PyroMark Q24, laboratoire de pathologie moléculaire, CHU Hassan II de Fès

V.3.3.2.1.5 Analyse des résultats :

L'analyse des résultats obtenus par le test EGFR en utilisant le Kit therascreen EGFR Pyro est réalisée par le logiciel PyroMark Q24.

L'ADN de contrôle non méthylé inclus dans chaque série de test permet la comparaison et le contrôle du bruit de fond qui peut fausser l'analyse des résultats. La fréquence mesurée de l'échantillon de contrôle doit être inférieure ou égale à la limite du blanc (LOB) (Tableau).

Tous les échantillons doivent être examinés par rapport à la limite de détection (LOD) et interprétés comme suit :

- ✓ Fréquence de mutation < LOD : type sauvage (WT)
- ✓ Fréquence de mutation>LOD + 3 % unités : Mutation confirmé
- ✓ Fréquence de mutation ≥ LOD et ≤ LOD + 3 % unités : Mutation de faible niveau potentiel à confirmer.

Tableau 17 : LOB et LOD déterminé pour chaque mutation

Mutation	Amino acid substitution	LOB (% units)	LOD (% units)	COSMIC ID* (V47)
Exon 18 codon 719 (GGC)				
AGC	G719S	0.9	1.5	6252
TGC	G719C	1.0	1.6	6253
GCC	G719A	4.7	9.1	6239
Exon 20 codon 768 (AGC)				
ATC	S768I	2.6	5.0	6241
Exon 20 codon 790 (ACG)				
ATG	T790M	7.0	10.7	6240
Exon 21 codon 858 (CTG)				
CGG	L858R	0.6	2.6 (5.5)‡	6224
Exon 21 codon 861 (CTG)				
CAG	L861Q	3.2	4.3	6213
CGG	L861R	1.9	4.2	12374
Exon 19 deletions				
2233del15	K745_E749del	0.6	1.6	26038
2235_2248>AATTC	E746_A750>IP	0.8	1.6	13550
2235_2252>AAT	E746_T751>I	1.1	2.8	13551
2235del15†	E746_A750del	0.9	1.8	6223
2236del15†	E746_A750del	0.2	1.2	6225
2237_2252>T	E746_T751>V	0.8	2.4	12386
2237_2255>T†	E746_S752>V	0.6	1.6	12384
2237del15†	E746_T751>A	0.9	1.9	12678
2237del18	E746_S752>A	0.5	1.7	12367
2238_2248>GC	L747_A750>P	0.8	2.5	12422
2238_2252>GCA	L747_T751>Q	0.2	0.6	12419
2238del18	E746_S752>D	0.3	1.1	6220
2239_2248>C†	L747_A750>P	1.8	2.5	12382
2239_2251>C	L747_T751>P	0.6	1.7	12383
2239_2258>CA	L747_P753>Q	1.3	3.9	12387
2239del18†	L747_S752del	0.6	1.5	6255
2239del9	L747_E749del	2.0	3.7	6218
2240del12	L747_T751>S	0.4	1.5	6210
2240del15†	L747_T751del	0.9	1.9	12369
2240del18†	L747_P753>S	0.9	1.9	12370

Dans le cas de détection de mutation de faible niveau potentiel, la présence d'une mutation ne peut être prise en considération que par confirmation. Pour ce faire le test

EGFR doit être relancée avec le cas de doute en duplicat et en présence d'un ADN de contrôle non méthylé. Après analyse, la présence de mutation n'est confirmée que par la détection de la même mutation chez les deux duplicats avec une valeur >LOD, le contrôle (ADN méthylé) doit être WT. Dans le cas contraire, le cas en doute doit être considéré WT.

Le bruit de fond généré lors d'une analyse de pyroséquençage peut influencer la quantification des allèles surtout pour les mutations de faible niveau potentiel. La présence d'un bruit de fond peut être détecté par la comparaison du LOB de la mutation à la valeur obtenue pour le contrôle positif.

Dans le cas de mutation de faible niveau potentiel, trois situations peuvent être rencontré après l'analyse :

- ✓ Valeurs d'ADN de contrôle > LOB de la mutation correspondante : Mutation non confirmé (non détectée).
- ✓ Analyse du même échantillon en duplicat avec des résultats différents : Mutation non confirmé (non détectée).
- ✓ Analyse du même échantillon en duplicat avec le même résultat et la valeur d'ADN de contrôle <LOB de la mutation correspondante : Mutation confirmée.

VI. Analyse statistique :

VI.1 Analyse descriptive :

Une description complète de la population d'étude a représenté l'étape initiale de l'analyse statistique. Les données ont été analysées à l'aide du logiciel IBM SPSS Statistic 21. Les données cliniques, pathologiques et moléculaires ont été présentées sous forme de moyenne, d'écart-type (m ± ET) pour les variables quantitatives et de pourcentage (%) pour les variables qualitatives.

VI.2 Etude analytique :

Les tests exacts de Chi-carré/Fishers ont été utilisés pour évaluer la corrélation entre les groupes. Une valeur P <0,05 a été considérée comme un test statistiquement significatif.

VI.3 Analyse de survie :

L'analyse de survie a été comparée et estimée par la méthode de Kaplan-Meier et le test de log-ran, en utilisant le logiciel SPSS (version 21.0) (SPSS Inc., Chicago, Illinois, États-Unis).

La survie globale (SG) estimée par mois a été calculée par la différence entre la date du diagnostic et la date de décès ou de censure, que le patient soit vivant ou perdu de vue.

La survie sans rechute (SSR) estimée par mois a été calculée par la différence entre la date du diagnostic et la date d'apparition de récidive que ce soit locale ou à distance ou bien la date de la dernière consultation pour les perdus de vue.

RESULTATS

I. Analyse descriptive :

I.1 Description de la population de l'étude :

I.1.1 Schéma de l'étude :

Une série de 302 patients atteints d'un CBNPC ont été recrutés au CHU HASSAN II de Fès, cette étude a été étalée sur une période allant du Novembre 2017 au Mai 2022. Tous les patients atteints d'un adénocarcinome pulmonaire et, certains sujets ayant un carcinome épidermoïde ou NOS avec des critères spéciaux tels que le jeune âge et le statut non-tabagique ont été inclus.

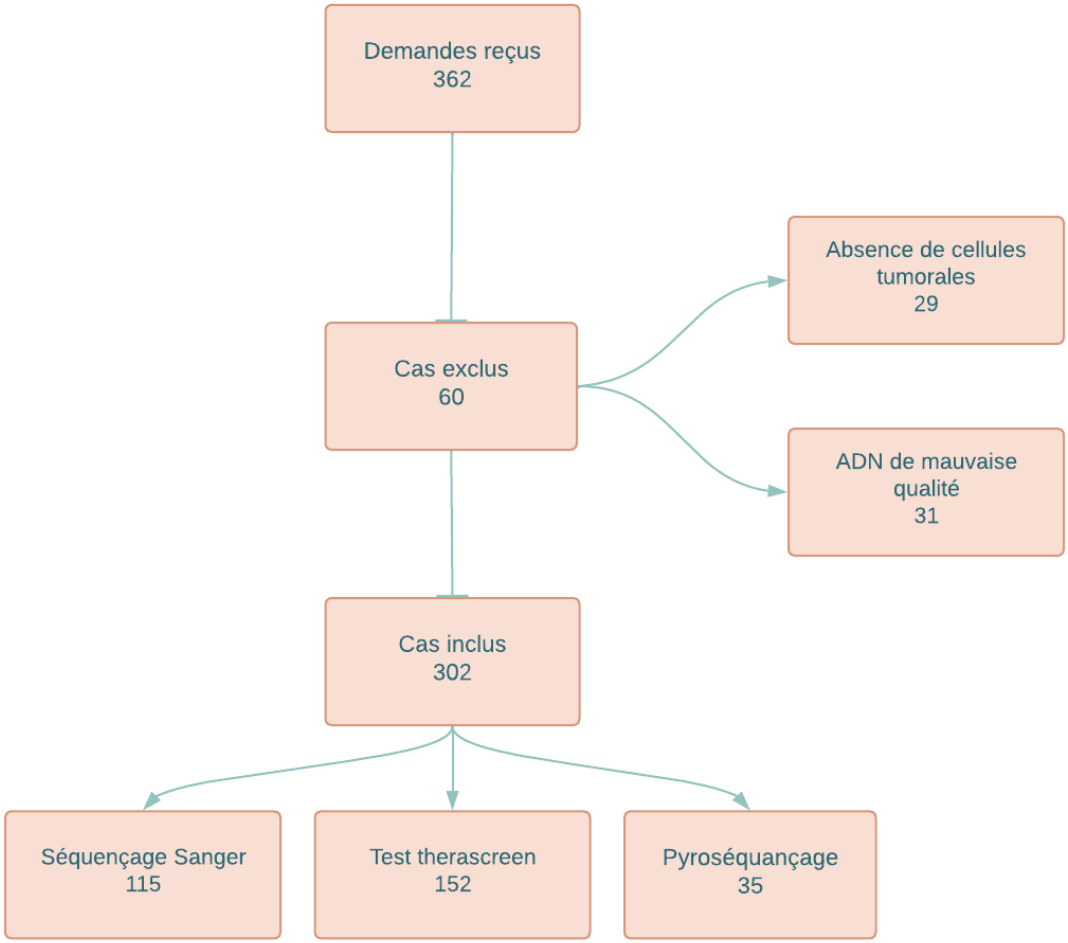
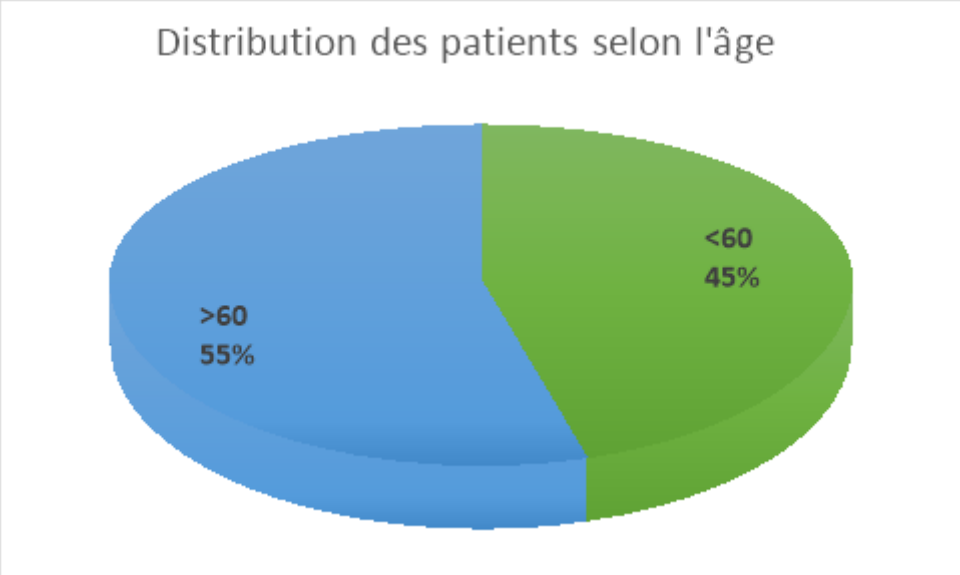
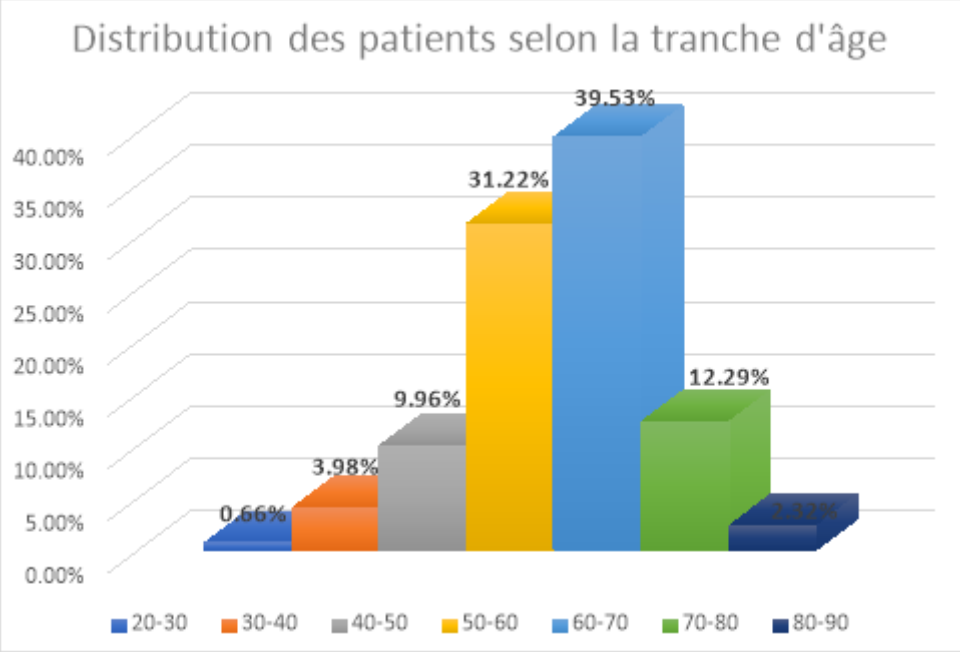


Figure 57 : Schéma de l'étude

I.1.2 Distribution des patients selon l'âge :

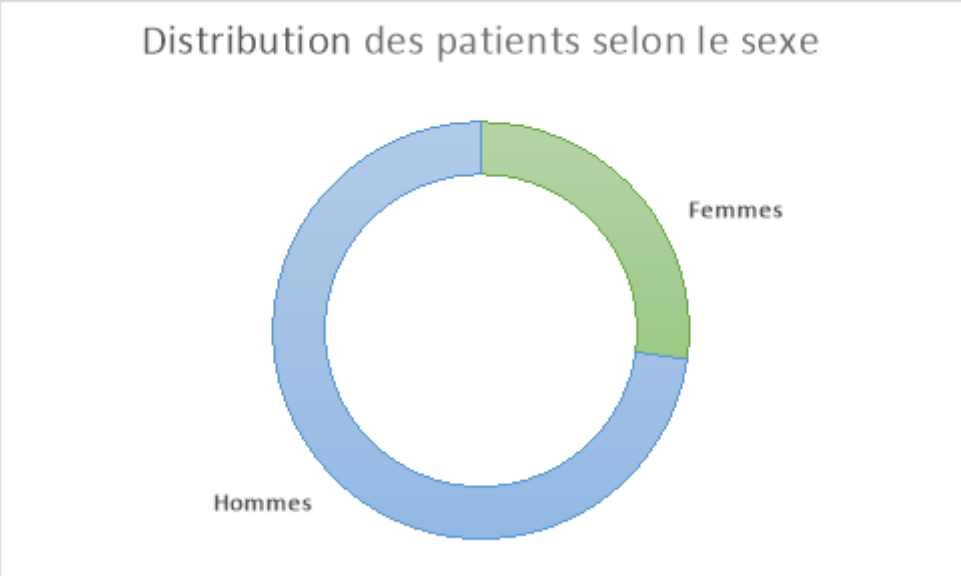
L'âge des patients varie entre 26 et 91 ans avec une moyenne de 60,34 ± 10,80 ans, 54,6% des cas avaient un âge supérieur à 60 ans. La tranche d'âge de 60 à 70 ans était la plus fréquente.





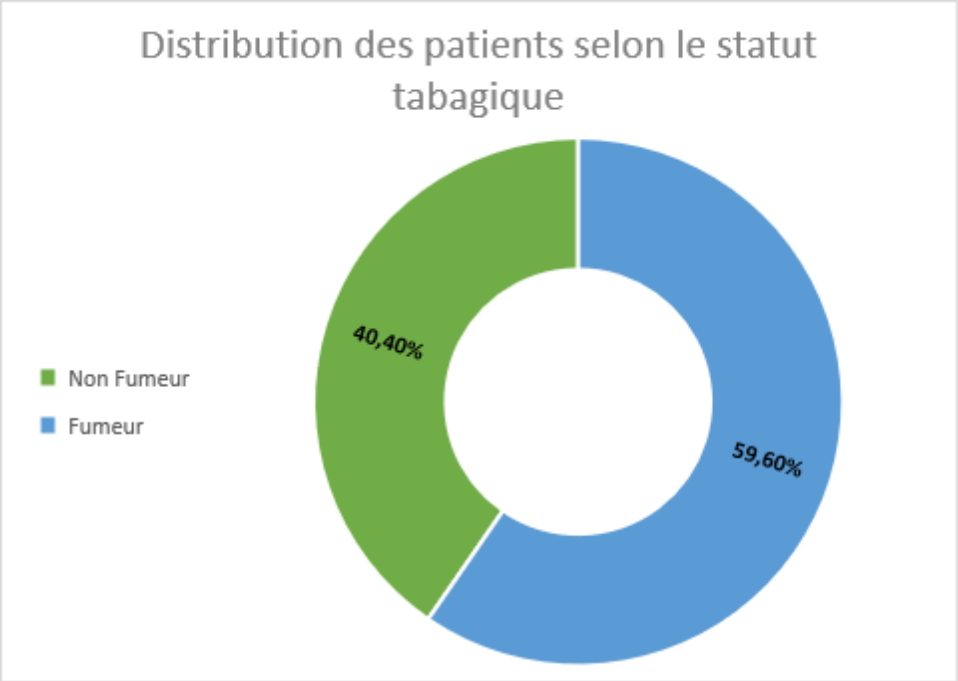
I.1.3 Distribution des patients selon le sexe :

Cette étude comprend 220 hommes et 82 femmes. Une nette prédominance masculine (72,8%) a été observée avec un sex-ratio de 2,67.



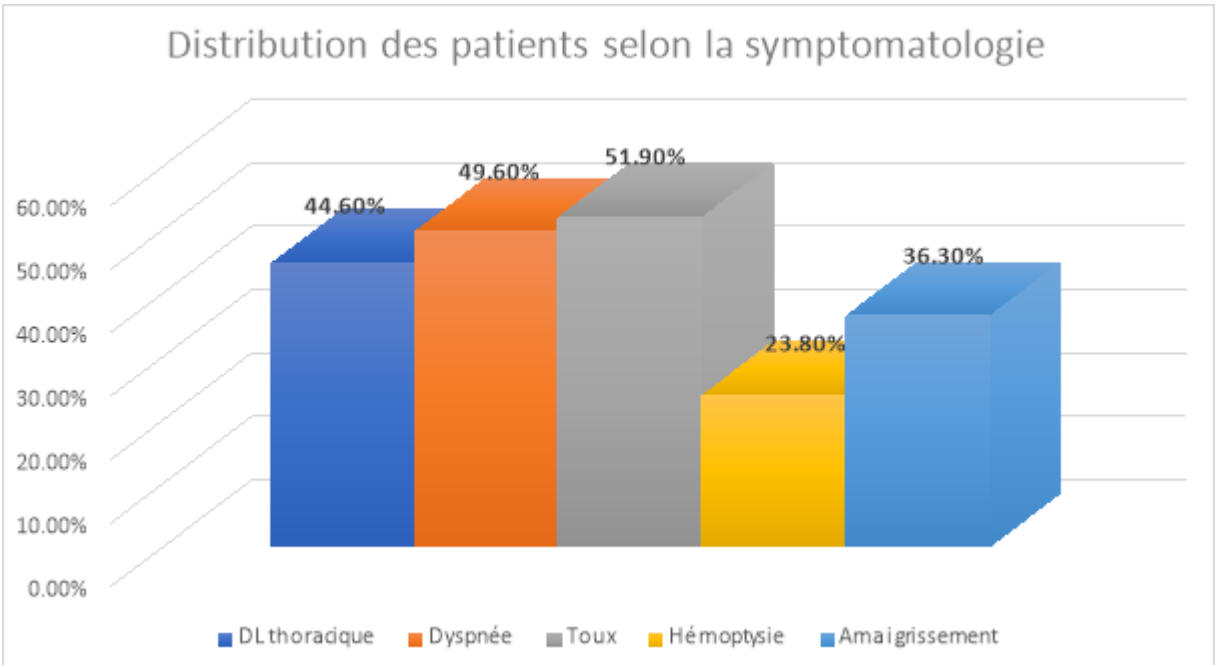
I.1.4 Distribution des patients selon le statut tabagique :

59,60% des patients étaient des tabagiques chronique, la majorité sont de sexe masculin, la notion du tabagisme a été révélé chez 4 femmes sur 82.



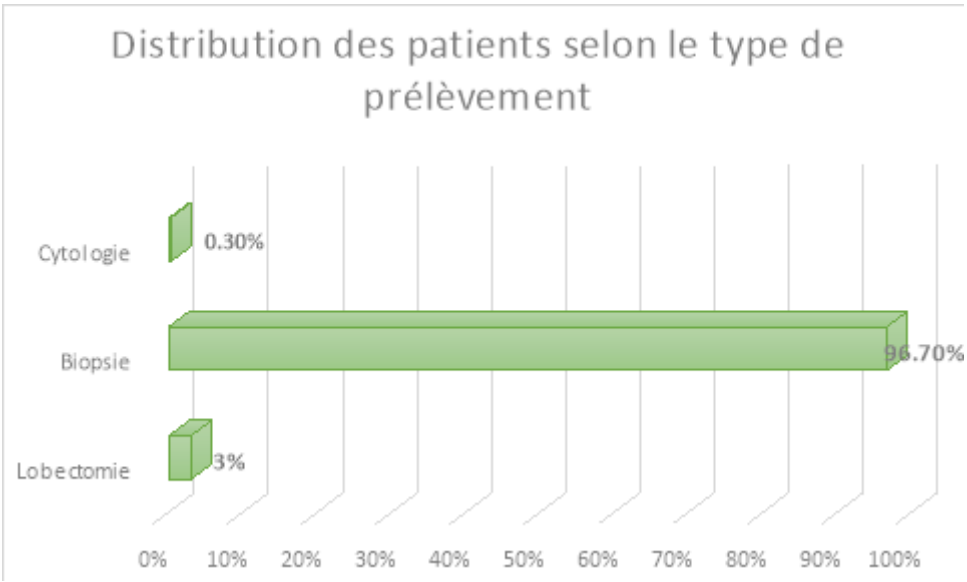
I.1.5 Répartition selon la symptomatologie :

La toux et la dyspnée représentent les symptômes les plus fréquents dans notre population, ils étaient le plus souvent associés.



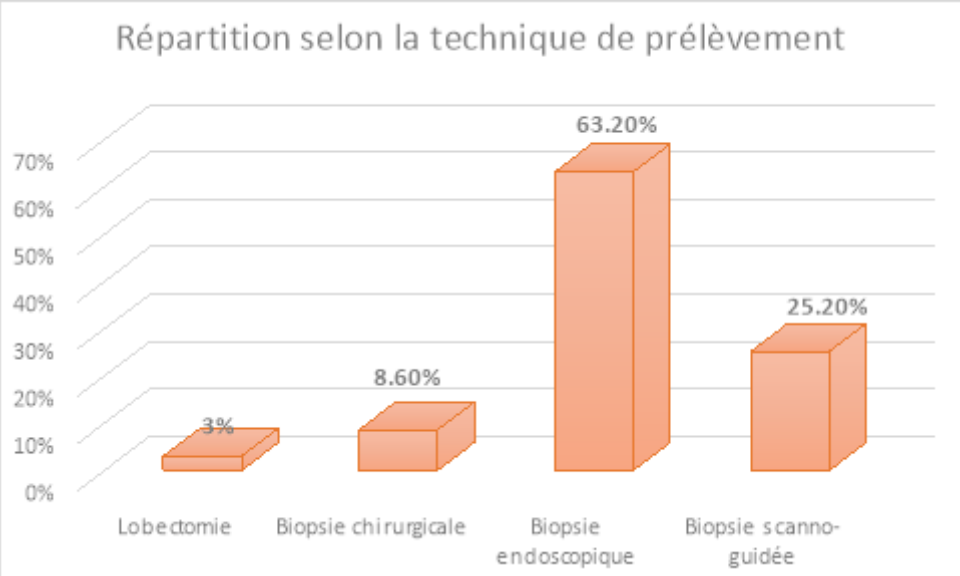
I.1.6 Répartition selon le type de prélèvement :

La majorité des prélèvements reçus ont été des biopsies de petites tailles.



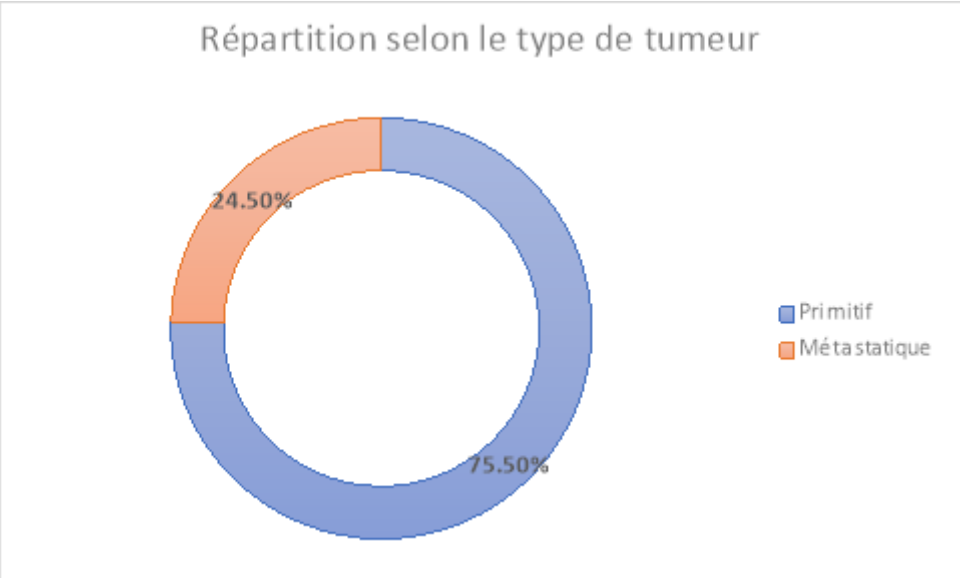
I.1.7 Répartition selon la technique de prélèvement :

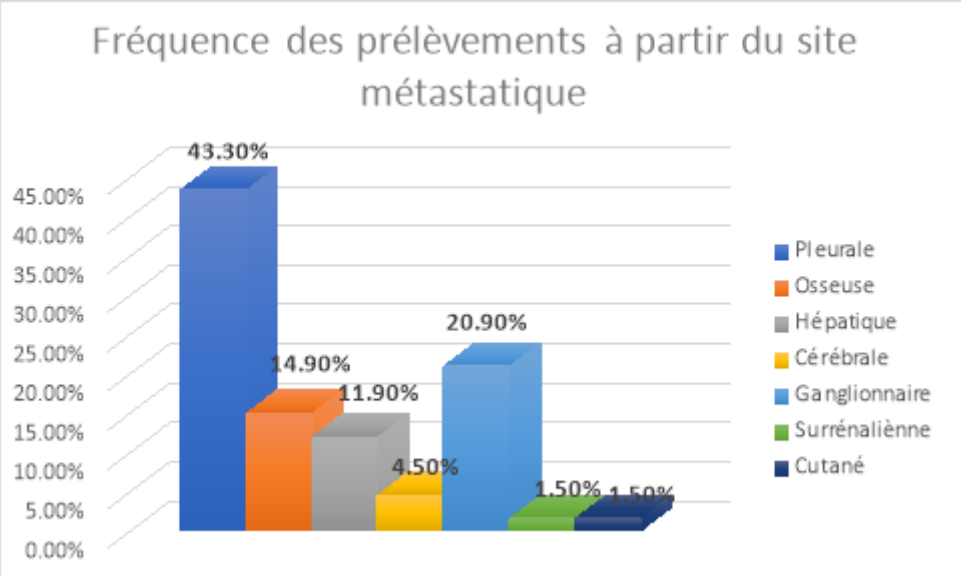
La biopsie endoscopique a été la méthode de prélèvement la plus utilisée dans cette étude, suivie par la biopsie scanno-guidée.



I.1.8 Répartition selon le type de tumeur :

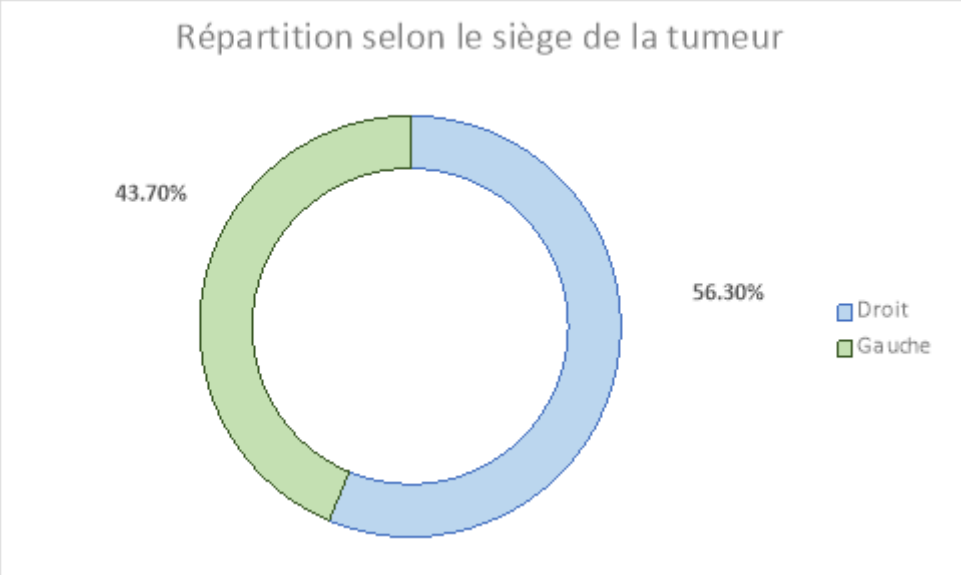
La majorité des prélèvements ont été obtenus à partir de la tumeur primitive. La biopsie pleurale était le site de prélèvement métastatique le plus fréquent (43,3%) suivie par la biopsie ganglionnaire (20,9%).





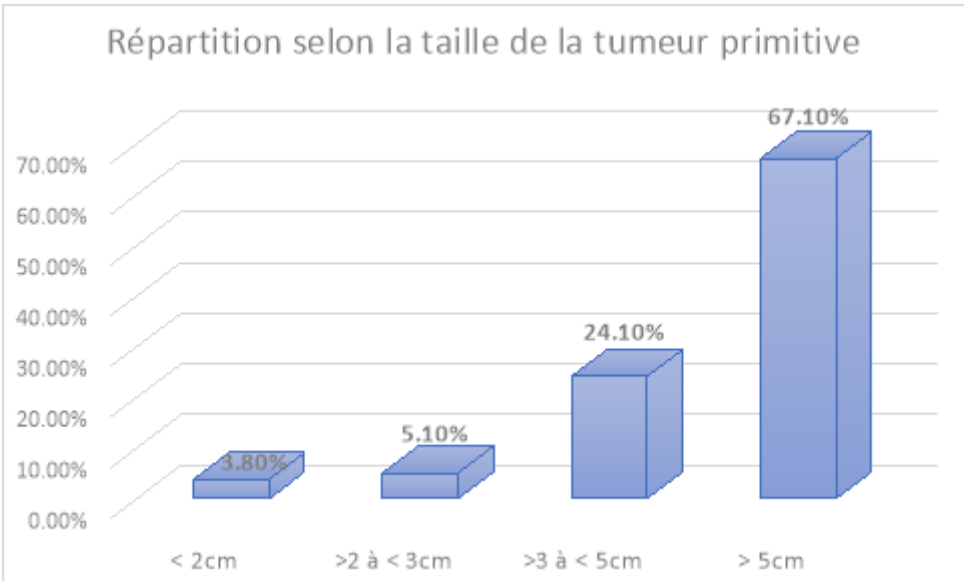
I.1.9 Répartition selon siège de la tumeur :

Les tumeurs du poumon droit ont été observée chez 56,30% des cas, alors que 43,70% des patients représentaient des tumeurs au niveau du poumon gauche.



I.1.10 Répartition selon la taille de la tumeur primitif :

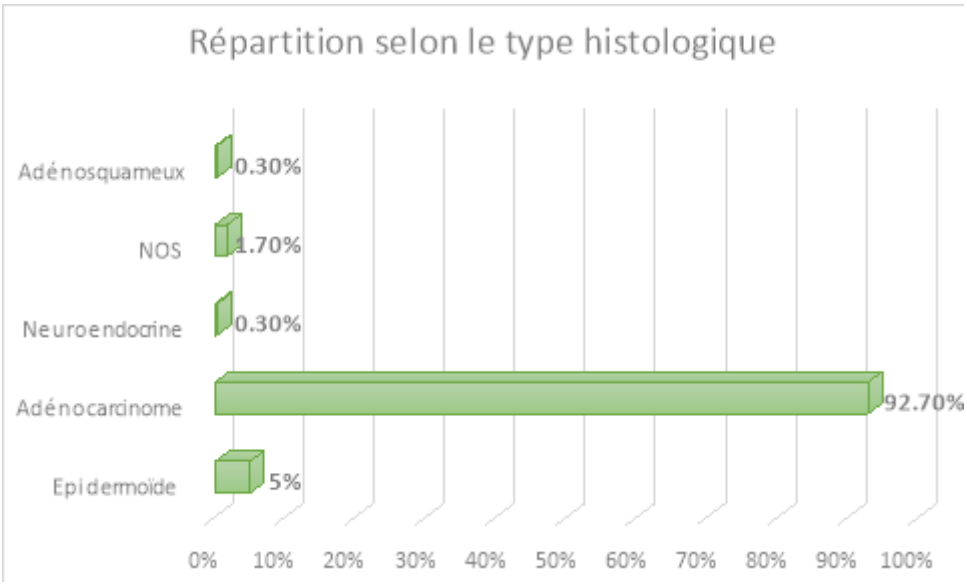
Plus de 67% des cas présentaient une taille de la tumeur primitive supérieure à 5cm.



I.2 Aspect histologique de la tumeur :

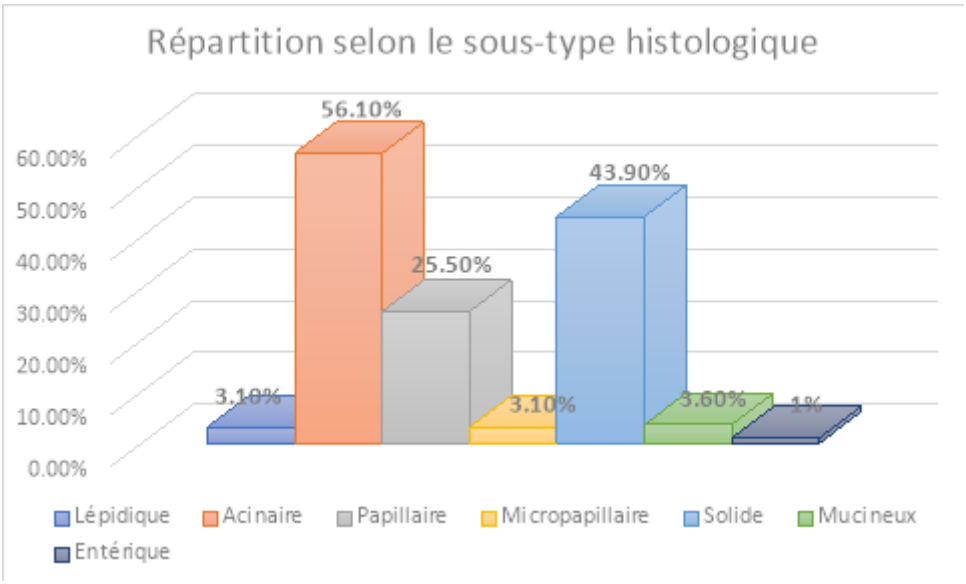
I.2.1 Type histologique :

Le type histologique le plus fréquent était l'adénocarcinome pulmonaire avec un pourcentage de 92,7%, suivi du carcinome épidermoïde 5%.



I.2.2 Répartition selon le sous type histologique :

Le sous-type histologique d'adénocarcinome a été définie pour 196 patients. L'adénocarcinome d'architecture acinaire était le sous-type histologique le plus fréquent (56,10%) suivi par le sous-type solide (43,9%), papillaire (25,50%), mucineux (3,60%), lépidique et micropapillaire (3,10%), alors que le sous-type entérique ne présentait que 1%.



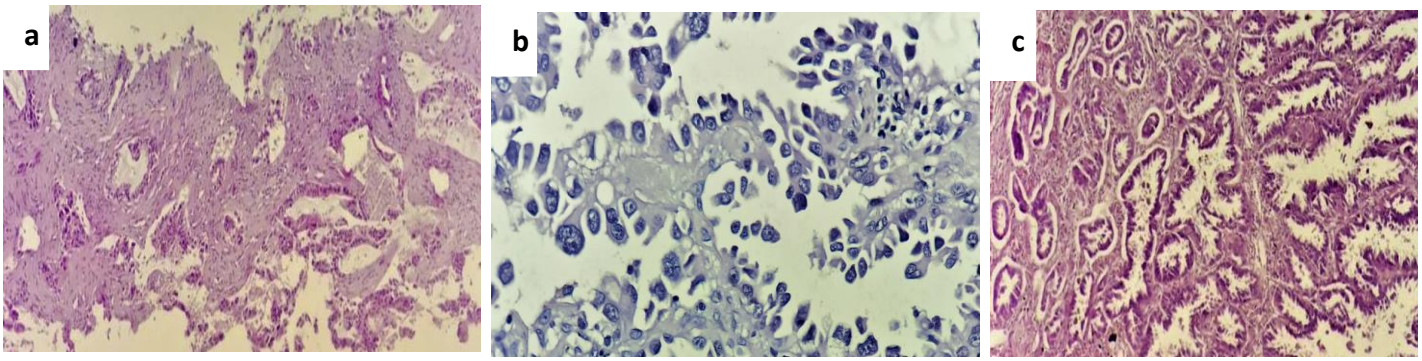
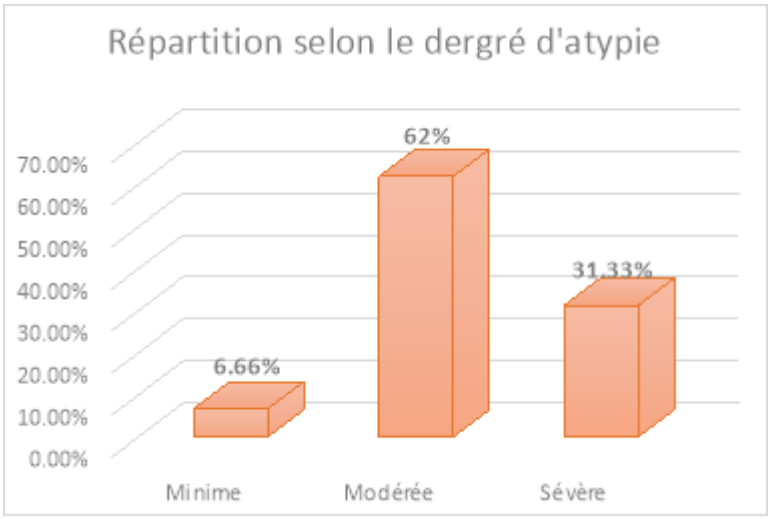


Figure 58 : Les sous-types histologique d'adénocarcinome pulmonaire

a. Sous-type acinaire ; b. Sous-type papillaire ; c. Sous-type mixte " acinaire et papillaire

I.2.3 Répartition selon l'atypie cellulaire :

Dans notre série, l'atypie cellulaire a été définie pour 150 patients. L'atypie modérée représente la fréquence la plus élevée dans notre population (62%), suivi de l'atypie sévère alors que l'atypie minime ne présente que 6,66%.



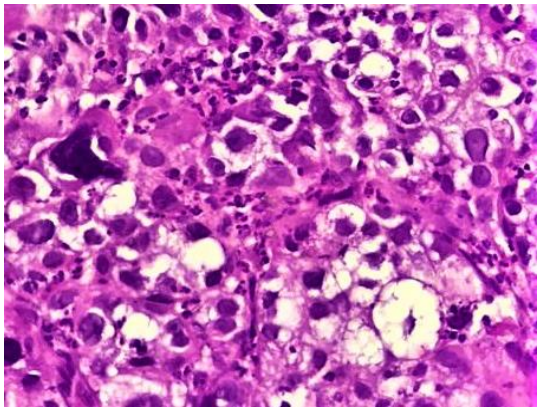
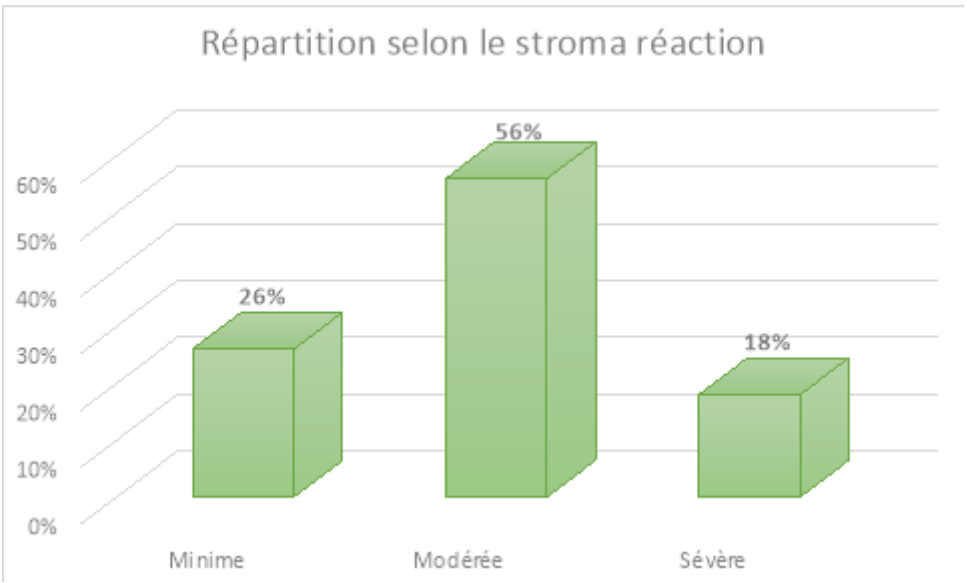


Figure 59 : Coupe histologique d'un adénocarcinome pulmonaire représentant une atypie cellulaire sévère

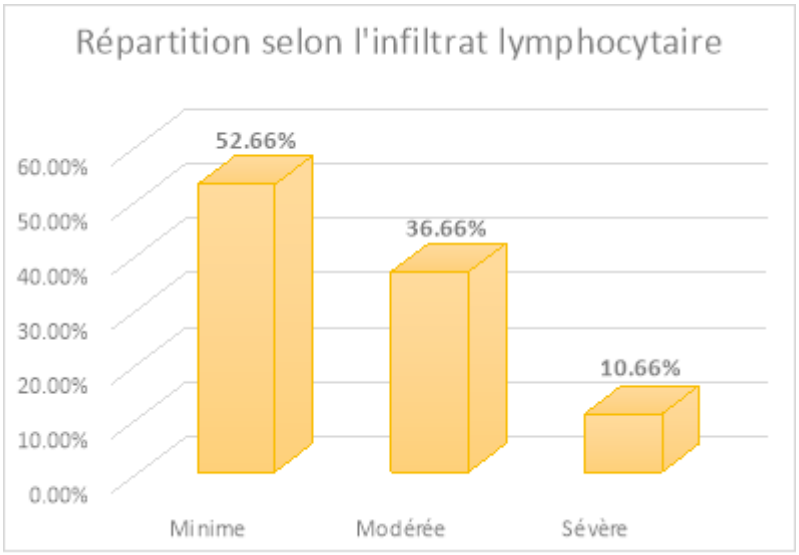
I.2.4 Répartition selon le stroma réaction :

Le stroma réaction a été déterminé pour 150 cas. Une fibreuse modérée a caractérisé 56% des tumeurs analysée, suivi d'une fibreuse minime 26% et sévère 18%.



I.2.5 Répartition selon l'infiltration lymphocytaire :

Le degré d'infiltration lymphocytaire a été analysé pour 150 tumeurs. Une infiltration lymphocytaire minime a été observée chez 52,66% des cas, suivie par une infiltration modérée 36,66% alors que l'infiltration sévère n'a été observée que chez 10,66% des cas.



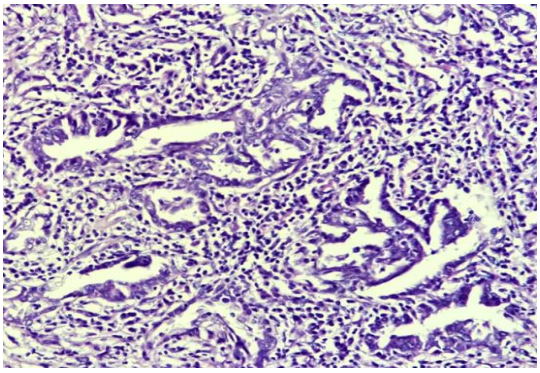
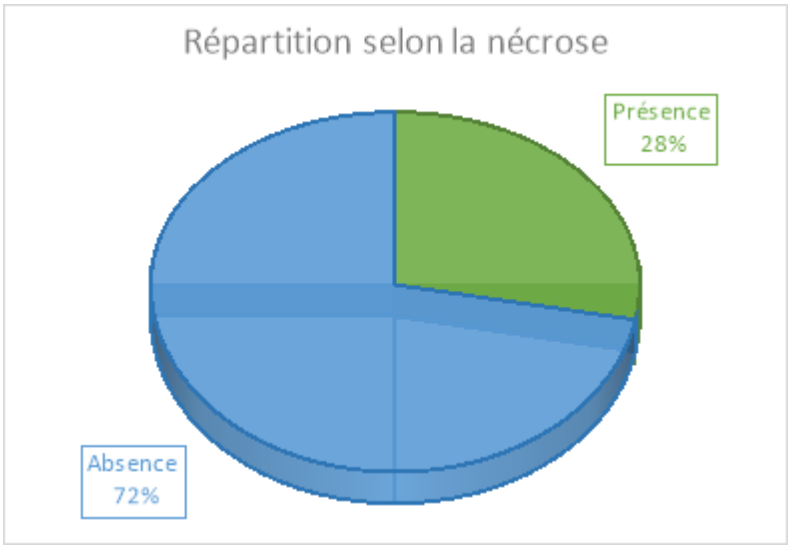


Figure 60 : Coupe histologique d'un adénocarcinome pulmonaire représentant un infiltrat lymphocytaire dense

I.2.6 Répartition selon la nécrose :

La présence ou l'absence de nécrose a été établie pour 150 cas. Les tumeurs de la majorité des cas ne présentaient pas de nécrose 72%.



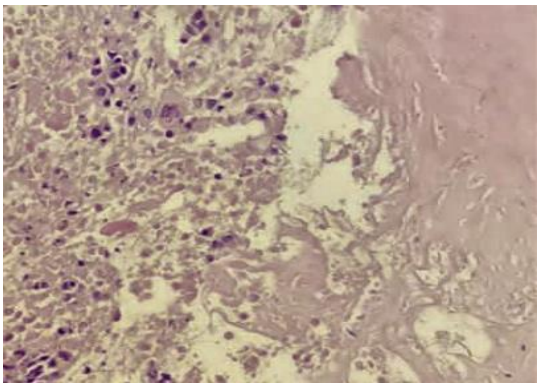
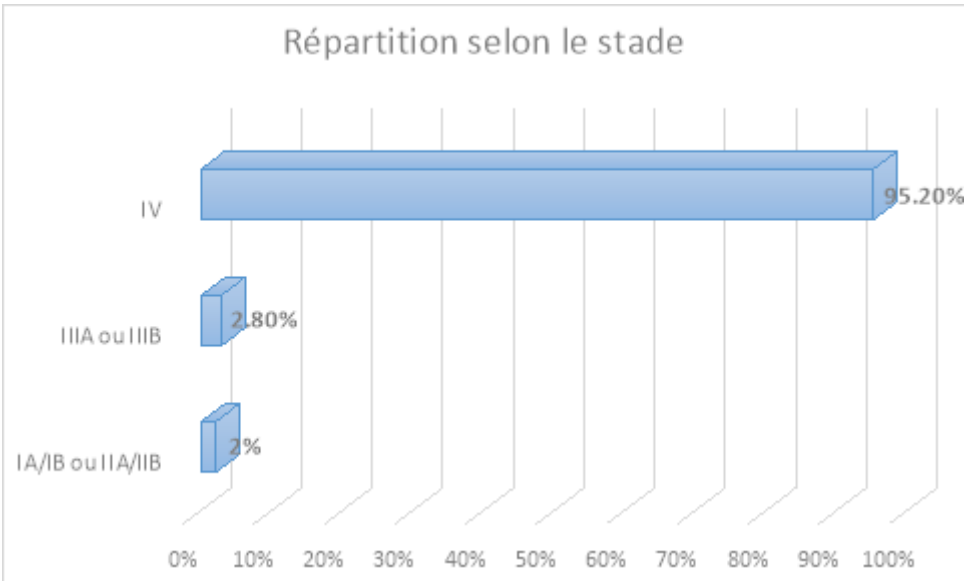


Figure 61 : Coupe histologique d'un adénocarcinome pulmonaire représentant une nécrose tumorale

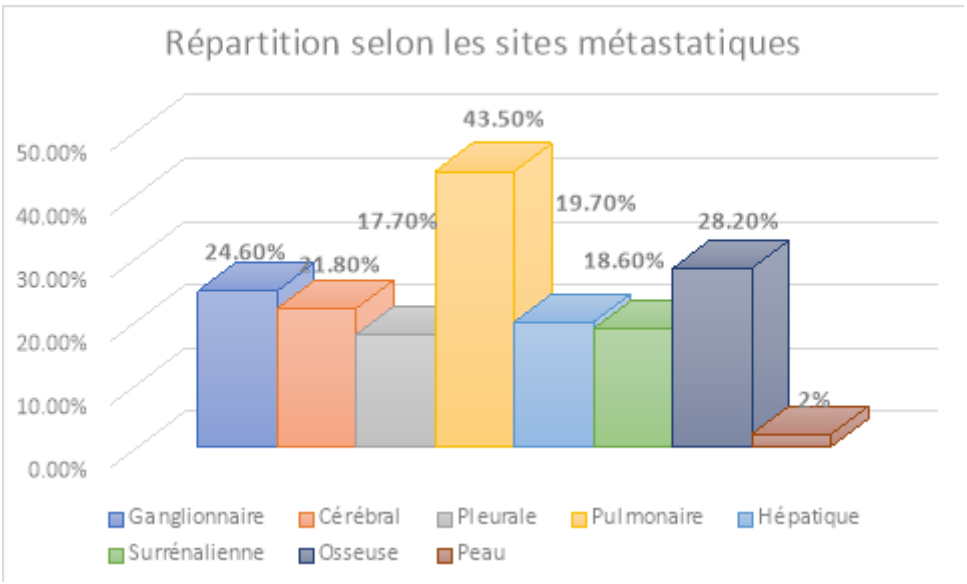
I.2.7 Répartition selon le stade :

La majorité des patients 95,2% présentaient des métastases au moment du diagnostic.



I.2.8 Répartition selon les sites métastatiques :

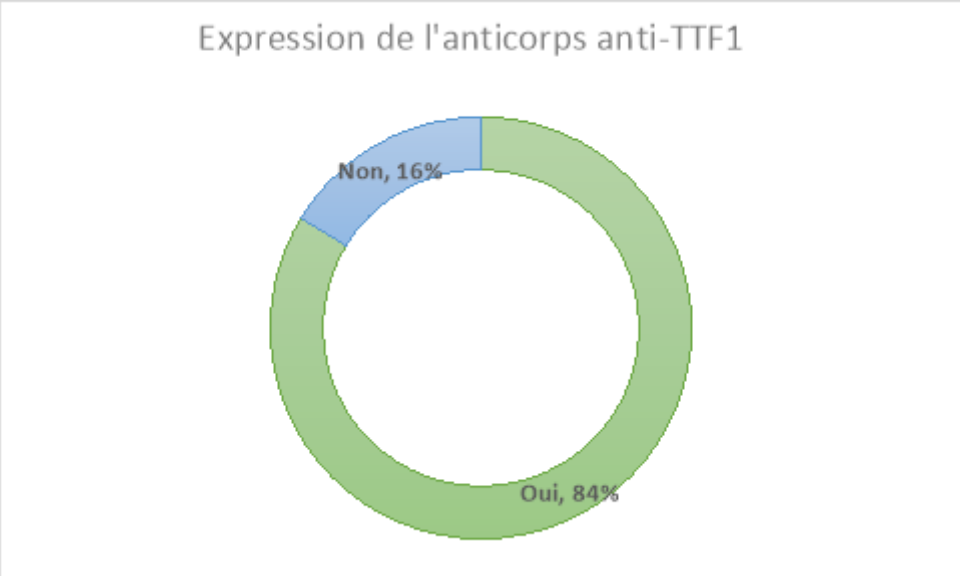
Le site métastatique le plus fréquent était le poumon 43,5% suivi des métastases osseuses 28,2% et ganglionnaire 24,6%. La majorité des patients avaient plus de deux sites métastatiques au moment du diagnostic.



I.3 Aspect immunohistochimique de la tumeur :

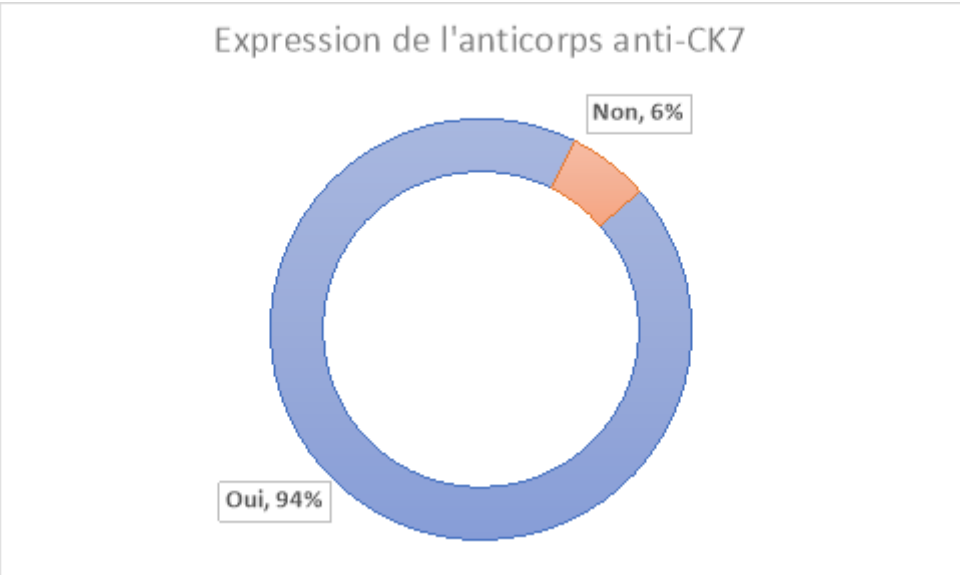
I.3.1 Le TTF1 :

L'étude immunohistochimique du facteur de transcription de la thyroïde 1 a été réalisée pour 233 cas. Une expression positive du TTF1 a été révélée chez 83,7%.



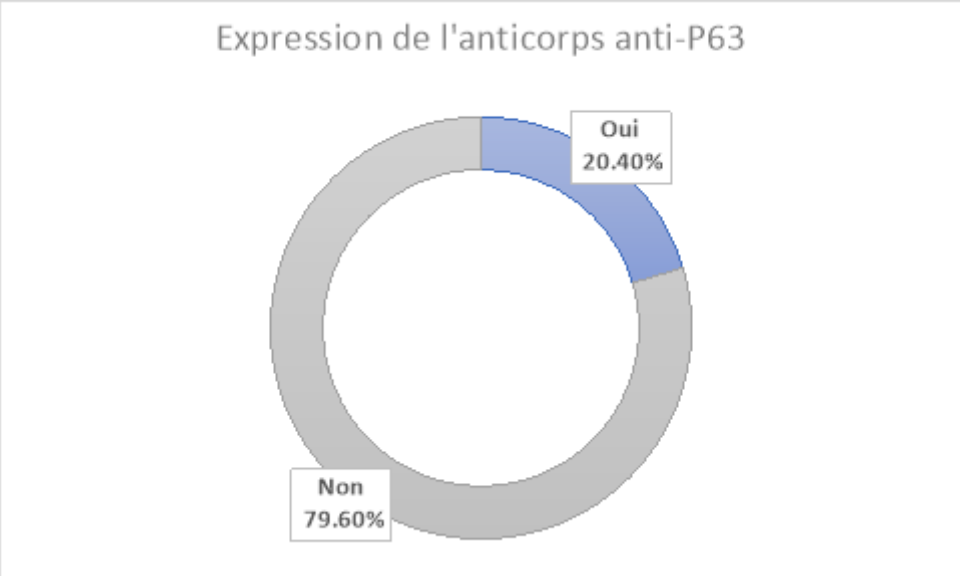
I.3.2 La CK7 :

L'expression de la cytokératine 7 a été évaluée pour 176 cas. La majorité des tumeurs 94% présentaient une forte expression de la CK7.



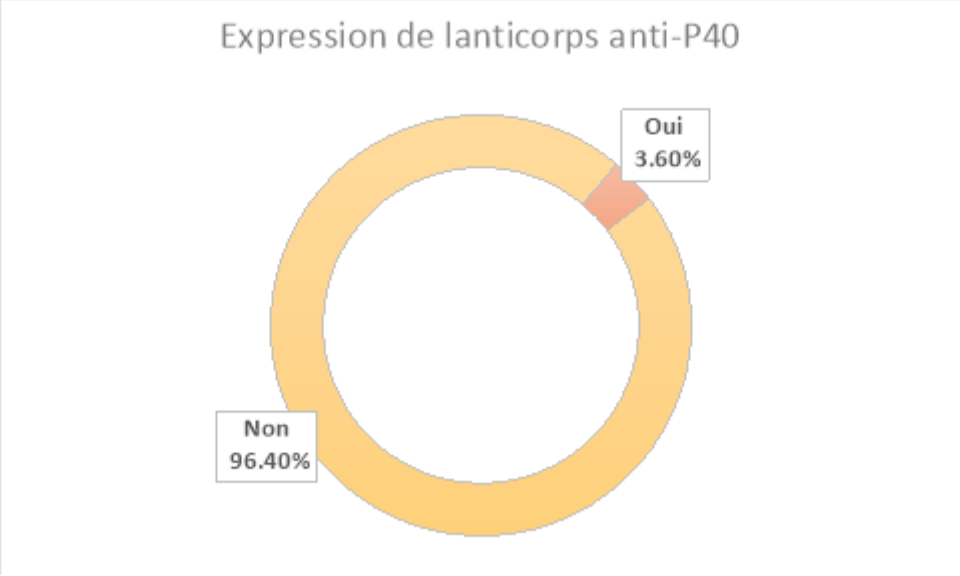
I.3.3 La P63 :

Dans notre série, l'expression de l'anticorps anti-P63 a été analysée pour 54 patients. 79,6% des cas ont été P63 négatifs contre 20,4% positifs.



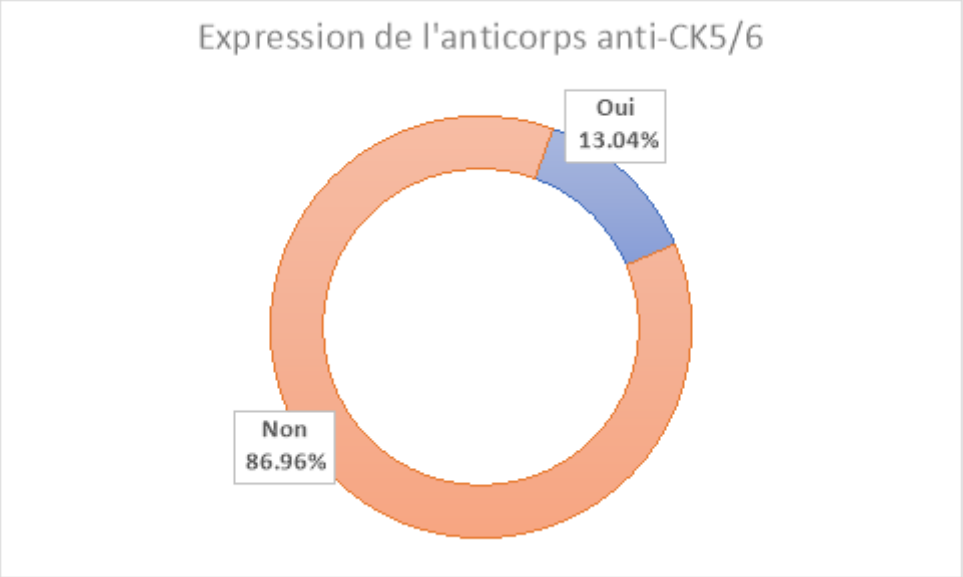
I.3.4 La P40 :

L'étude immunohistochimique de l'expression de la P40 a été réalisée pour 55 patients. La majorité des tumeurs 96,4% présentaient un marquage négatif pour la P40.



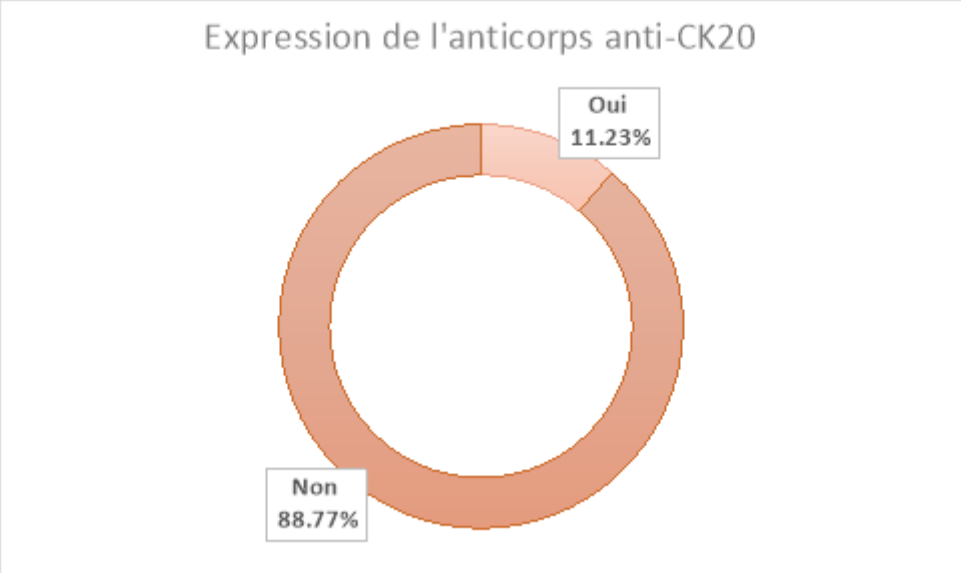
I.3.5 La CK5/6 :

L'expression immunohistochimique de la CK5/6 a été réalisée pour 46 patients. Seulement 13,04% des cas présentaient une expression de la CK5/6.



I.3.6 La CK20 :

Dans notre étude, l'expression de l'anticorps anti-CK20 a été détectée chez 89 patients. Une expression positive de la CK20 n'a été révélée que chez 11,23% des cas.

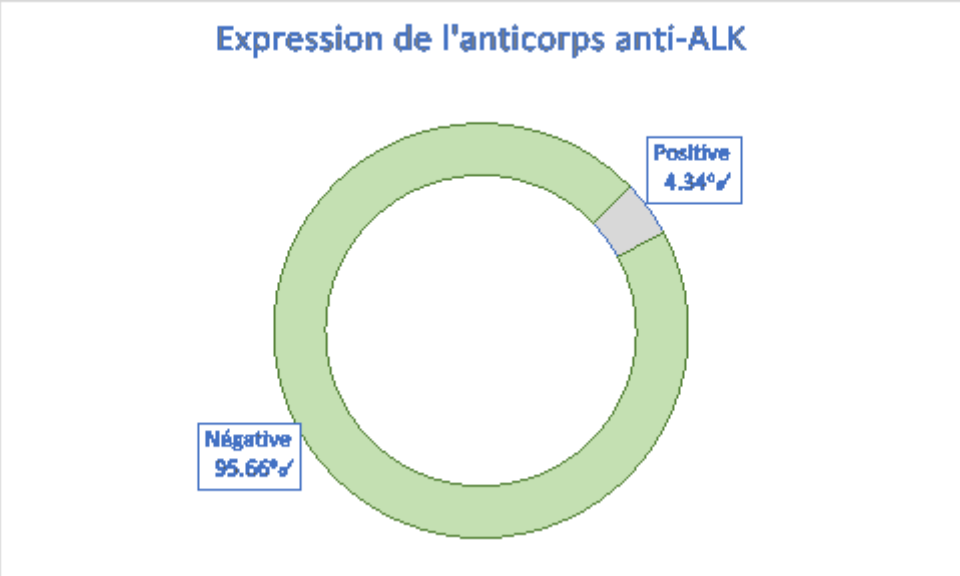


I.3.7 Anaplasic Lymphoma Kinase ALK :

À l'ère des thérapies ciblées, la recherche des biomarqueurs prédictifs est devenue une percée majeure dans la prise en charge des CBNPC. La technique d'immunohistochimie (IHC) représente l'une des méthodes les plus utilisées pour les tests des biomarqueurs prédictifs. Elle peut fournir des résultats cliniquement significatifs avec un délai d'exécution rapide, ce qui rend d'elle un test beaucoup plus rentable que les plateformes moléculaires. En fait, plusieurs tests d'IHC pour les biomarqueurs prédictifs ont déjà été mis en œuvre dans la

pratique courante de la pathologie pulmonaire. Dans cette étude la détection des réarrangement ALK a été réalisée par immunohistochimie sur l'automate Ventana Benchmark pour 69 patients entre une période d'Avril 2021 et Janvier 2022.

Selon la littérature, l'incidence du réarrangement ALK dans le cancer du poumon non à petites cellules est de 5 à 6%. préva



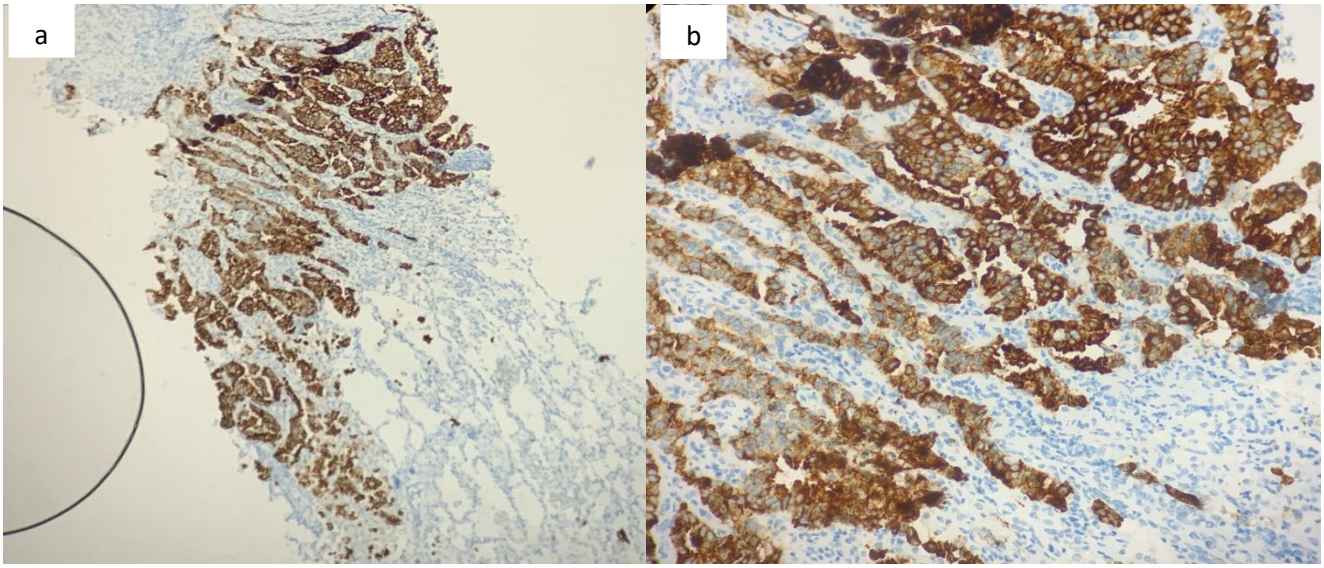


Figure 62 : Expression de l'anticorps anti-ALK dans le cancer de poumon (a : x100 ; b : x400), laboratoire de pathologie moléculaire, CHU Hassan II de Fès

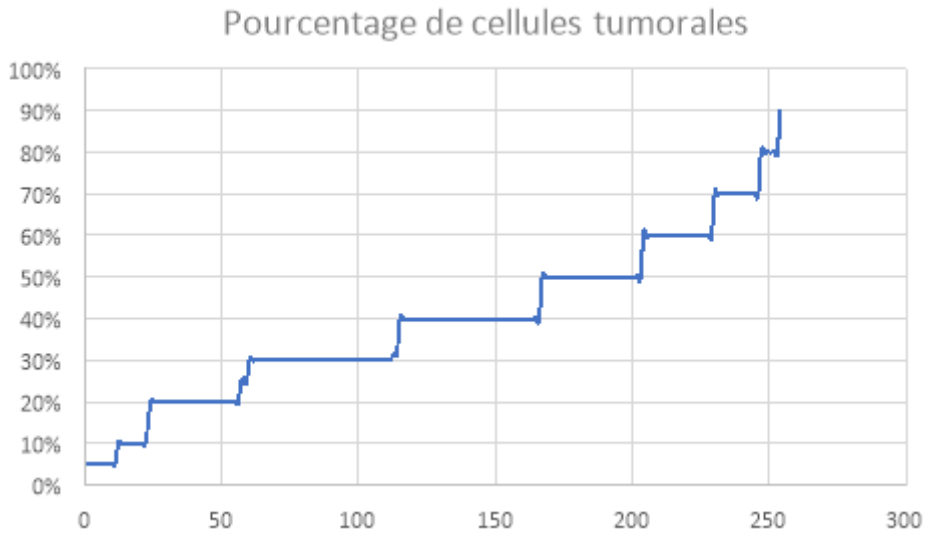
I.4 Aspect moléculaire de la tumeur :

Il a été démontré en 2004 qu'une réponse clinique majeure aux inhibiteurs de la tyrosine-kinase du récepteur du facteur de croissance épidermique a été révélée que chez les patients atteints d'un CBNPC présentant des mutations activatrices du gène EGFR. Avec cette découverte, les tumeurs avec EGFR muté sont reconnues comme un sous-type de CBNPC défini sur le plan moléculaire. Chez ces patients, un traitement de première ligne par les ITKs d'EGFR augmente à la fois le taux de réponse et la survie sans progression par rapport à la chimiothérapie. De ce fait, un tel traitement personnalisé nécessite obligatoirement un test de mutation EGFR rapide et fiable.

Dans notre laboratoire, le testing EGFR a été réalisée par trois techniques différentes en fonction du matériel et de la disponibilité du laboratoire. La détection des mutations du gène EGFR au niveau des exons 18, 19, 20 et 21 a été réalisée avec succès chez 302 patients atteints d'un CBNPC.

I.4.1 Pourcentage de cellules tumorales et concentration d'ADN :

Le pourcentage de cellules tumorales a été estimé par un pathologiste qualifié. Dans notre série le pourcentage de cellules tumorales varie entre 5 et 90%.



Dans notre série, la concentration d'ADN extrait à partir du tissu fixé et inclus en paraffine varie entre (0,4 et 200%).

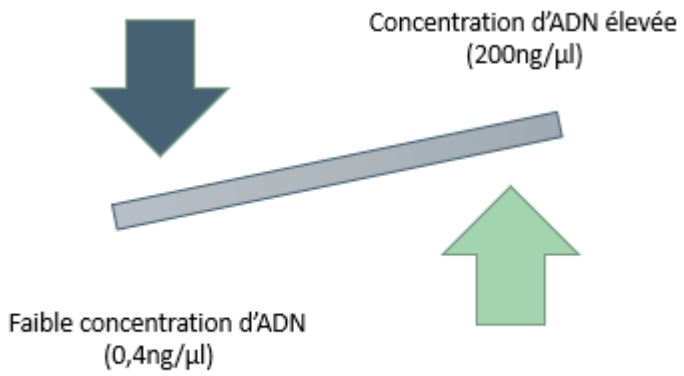
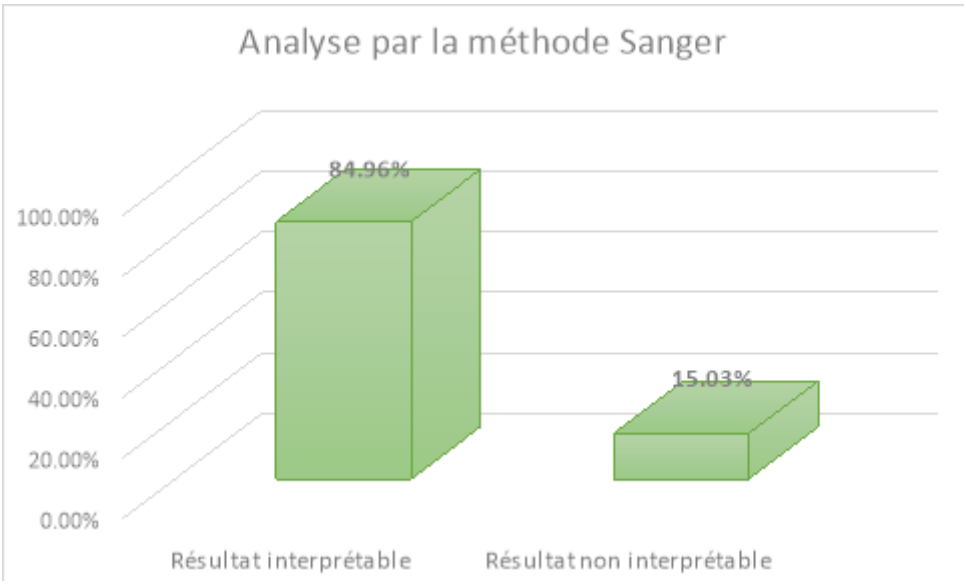


Figure 63 : Concentration d'ADN

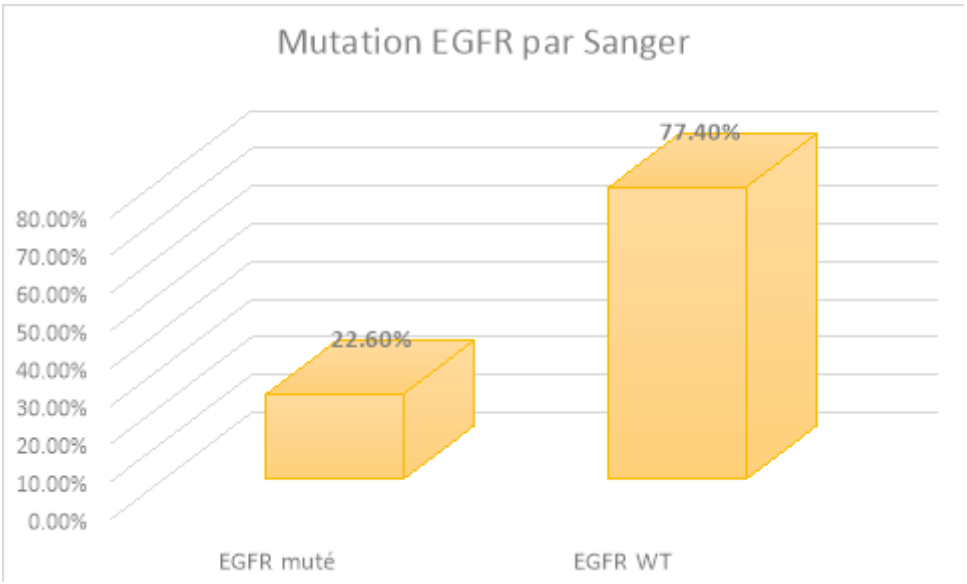
I.4.2 Séquençage SANGER :

Le séquencage Sanger ou direct permet la détection de toutes les mutations présentes au niveau des exons 18, 19, 20 et 21 du gène EGFR. Au laboratoire de pathologie moléculaire de CHU Hassan II, cette technique a été utilisée pour la détection des mutations EGFR depuis Mars 2018 jusqu'au Janvier 2020.

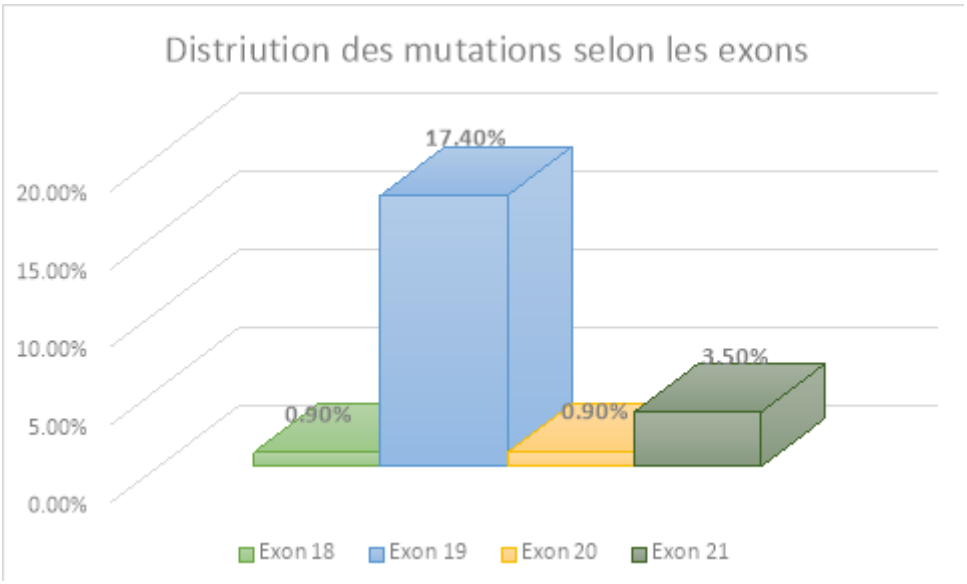
Dans cette étude, 115 cas ont été analysés avec succès par séquençage direct. 20 cas ont été exclus en raison du faible pourcentage de cellules tumorales (<25%). 20 échantillons n'ont pas pu être analysés par le séquençage direct en raison de la mauvaise qualité d'ADN.



La fréquence des mutations EGFR par séquençage Sanger était de 22,12%.



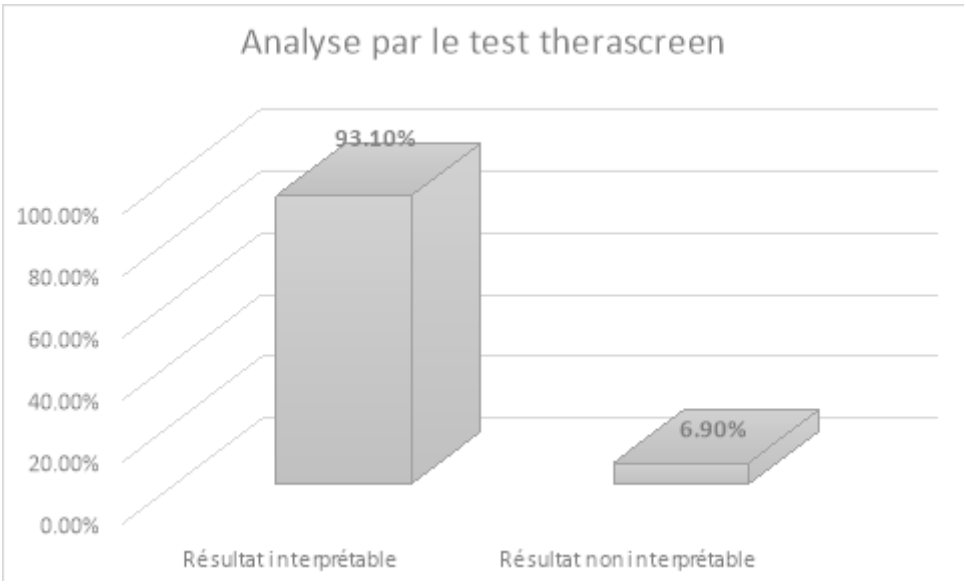
En ce qui concerne la distribution des mutations selon les exons, les délétions au niveau de l'exon 19 étaient les plus fréquents (17,4%), suivie de l'exon 21 (3,4%) et l'exon 18 et 20 (0,9%).



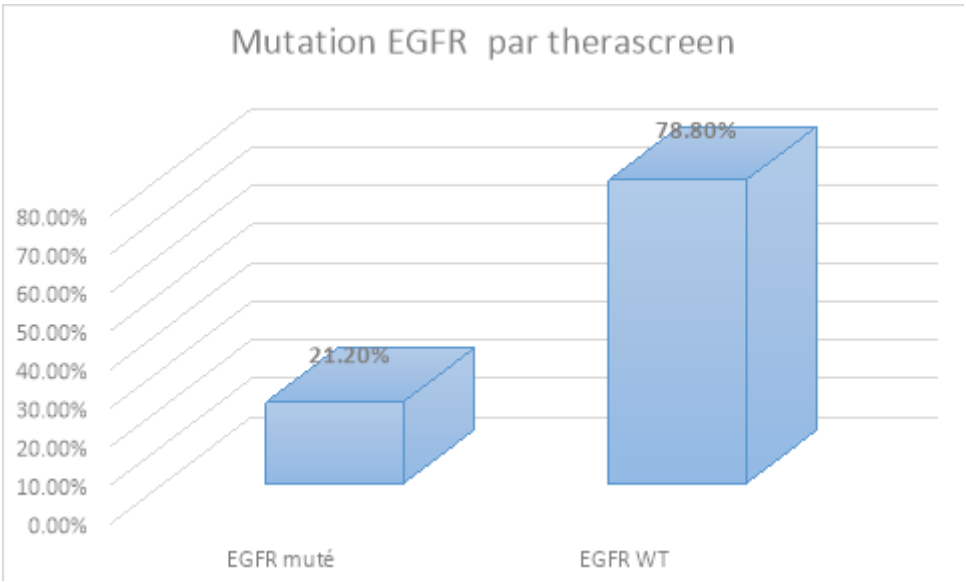
I.4.3 PCR en temps réel :

La PCR en temps réel a été réalisée par le therascreen EGFR RGQ Kit. Ce test de diagnostic permet la détection de 29 mutations au niveau des exons 18, 19, 20 et 21 du gène EGFR. Cette technique a été utilisée depuis Novembre 2017 au Février 2018 et à partir de Février 2020 jusqu'au Mai 2022.

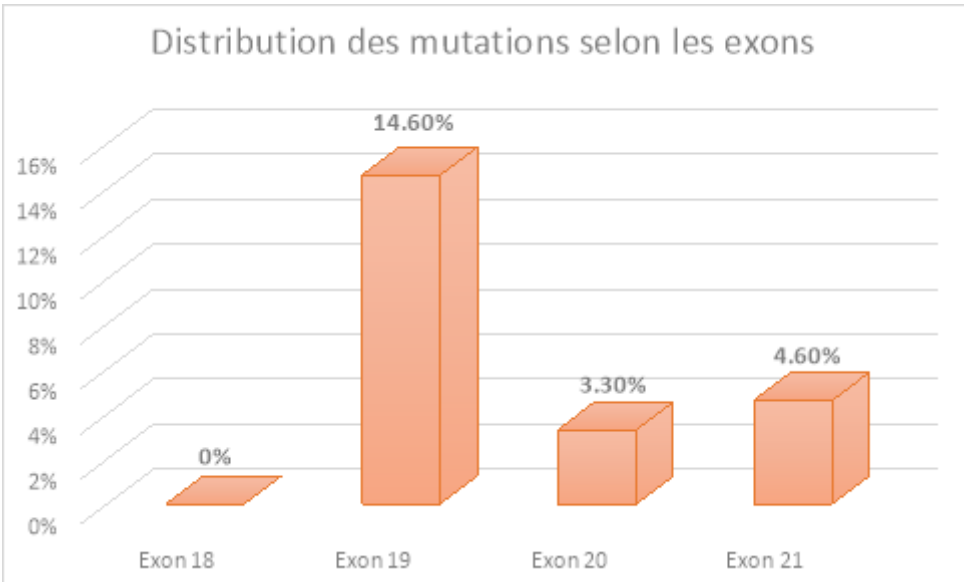
152 échantillons ont été testés par le test therascreen, 92% des cas ont été analysés avec succès par le test therascreen, un pourcentage de 7% de cas n'ont pas pu être analysés par le therascreen kit en raison de la mauvaise qualité d'ADN extrait.



32 mutations équivalentes à un pourcentage de 21,2% ont été révélées par PCR en temps réel.



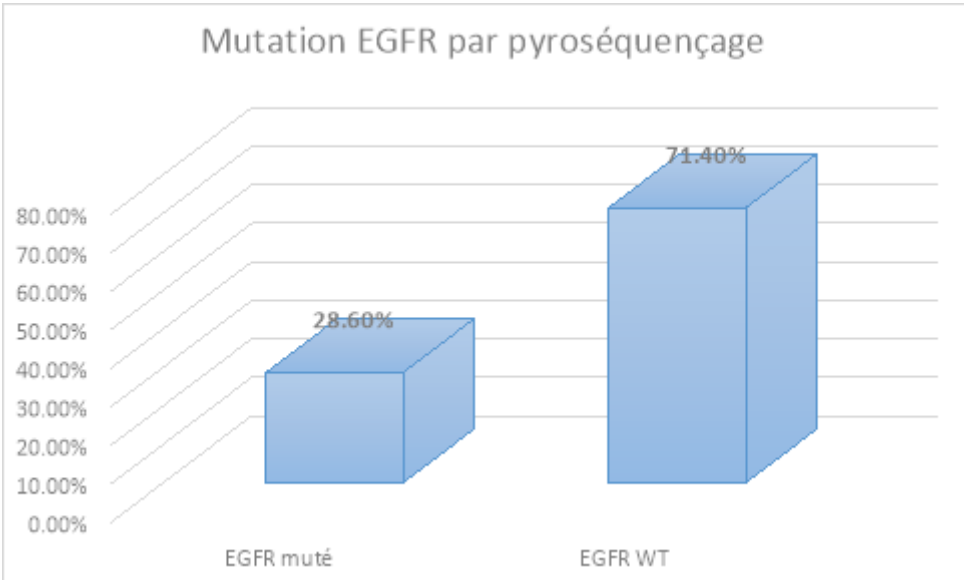
La distribution des mutations selon les exons était similaire à celle observée par la méthode Sanger, les délétions au niveau de l'exon 19 étaient les plus communes (14,6%), suivie de l'exon 21 (4,6%) et 20 (3,3%).



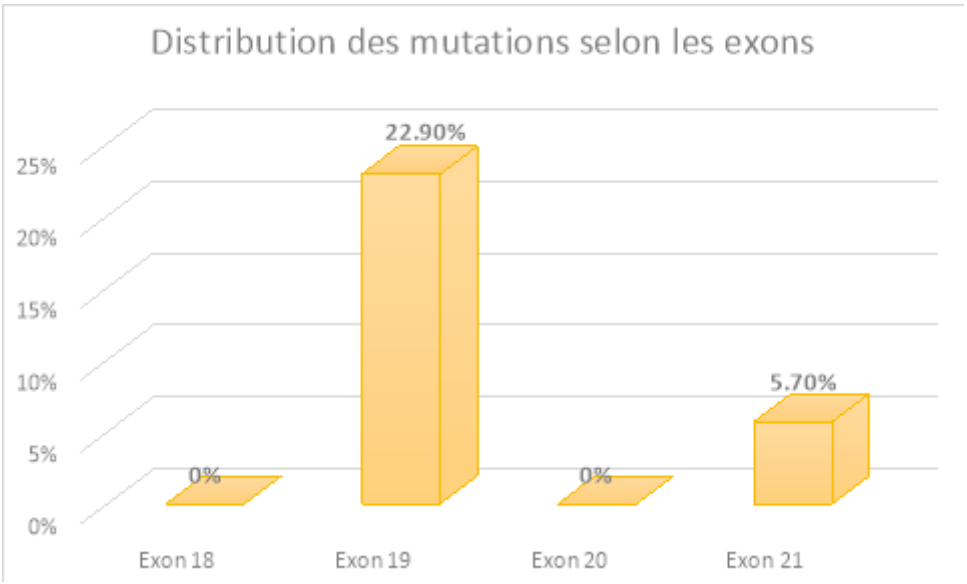
I.4.4 Pyroséquençage :

Le pyroséquençage a été réalisé à l'aide du kit therascreen EGFR Pyro qui permet la détection quantitative des mutations au niveau des exons 18, 19, 20 et 21 du gène EGFR. Cette méthode a été utilisée depuis Février 2022 jusqu'à Mai 2022.

35 cas ont été testés avec succès par le test Pyro. 10 mutations équivalentes à un pourcentage de 28,6% ont été révélées par pyroséquençage.



Les délétions exon 19 ont été détectées chez 8 cas soit 22,90%, les mutations ponctuelles au niveau de l'exon 21 ont été révélée chez 2 cas soit 5,70%.



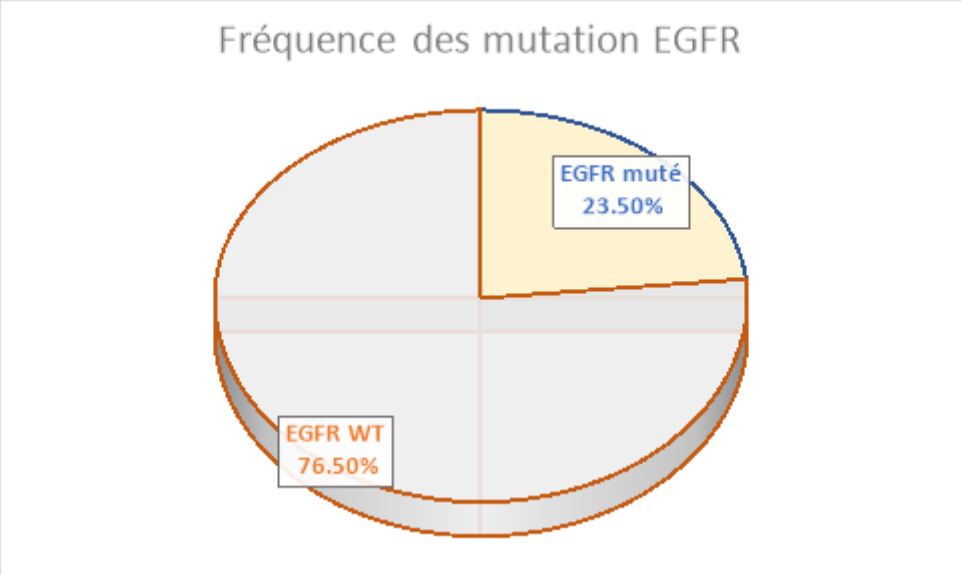
I.4.5 Comparaison entre les techniques moléculaires :

Tableau 18 : Comparaison des techniques moléculaires

Séquençage Sanger	**PCR en temps réel**	**Pyroséquençage**
Détection de toutes les mutations EGFR	Ne permet que la détection de 29 mutations	Permet la détection de 5 mutations ponctuelles et les délétions au niveau de l'exon 19
Nécessite une quantité d'ADN de 100ng	Nécessite une quantité d'ADN de 300ng	Nécessite une quantité d'ADN de 180 ng
Faible sensibilité (>25 de CT)	Très sensible (1% de CT)	Très sensible (5% de CT%)
Lourde et complexe (4-5 jours)	Très simple (72H)	Simple (72H)
Taux de contamination élevée	Faible taux de contamination	Faible taux de contamination
Interprétation des résultats	Résultats automatisés	Résultats semi-automatisés
Gout élevé	Gout moins cher	Gout moins cher

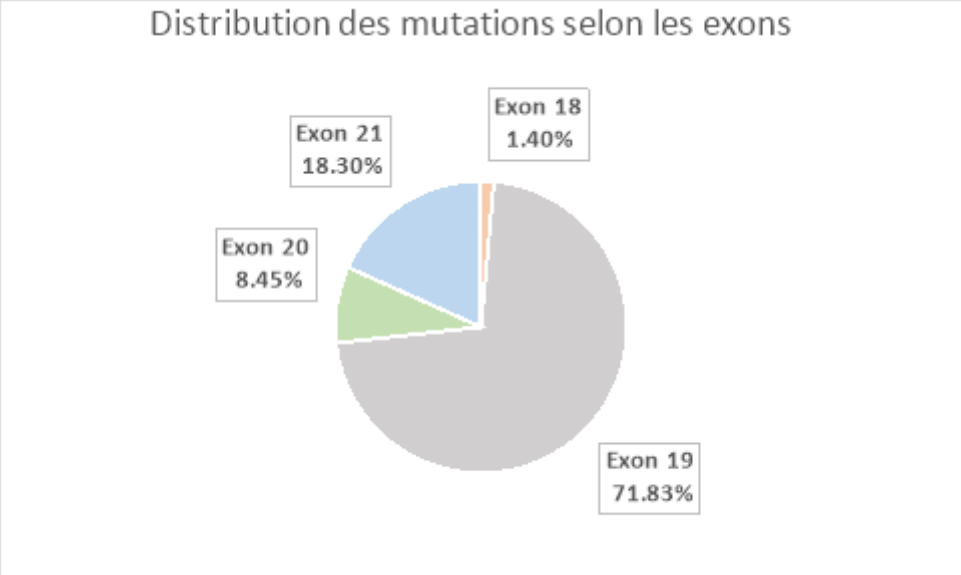
I.4.6 Fréquence des mutations EGFR dans toute la population :

Le diagramme ci-dessous représente la fréquence des mutations EGFR pour 302 cas testés. 69 tumeurs sur 302 (22,8%) étaient EGFR muté. Une double mutation au niveau de deux exons différents a été révélée chez deux patients donc 71 mutations EGFR ont été révélées dans une série de 302 patients.



I.4.7 Distribution selon les exons :

La distribution des mutations EGFR selon les exons était similaire à celle généralement rapporté dans la littérature. L'exon 19 représente l'exon le plus muté avec un pourcentage de (71,83%) suivi de l'exon 21 (18,30%), l'exon 20 (8,45%) et l'exon 18 (1,40%).



I.4.8 Sous-type mutationnel :

La délétion E746_A750del au niveau de l'exon 19 était la mutation la plus fréquente (24/71, 33,8%) dans toute la population. L'automate Rotor Gene utilisé pour la PCR en temps réel est un système fermé qui n'a pas permis la nomenclature des délétions pour 23 cas. La deuxième mutation la plus fréquente était la substitution L858R de l'exon 21 (11/71, 15,49%). 3 patients présentaient la mutation S768I au niveau de l'exon 20 (3/71, 4,22%), d'autres types de mutations ont été observée dans l'exon 20 sont, deux insertions détectées chez deux cas (2/71, 2,81%) et la mutation T790M connue de résistance révélée chez un seul patient (1/71, 1,40%). La mutation ponctuelle L861Q a été identifiée chez 2 patients (2/71, 2,81%). D'autres mutations rares au niveau de l'exon 19 ont été retrouvées tels que la délétion insertion K745_E746insTPVAIK, la E746_S752>A, la E746_A752>V et la L747_572>HQ. Au niveau de l'exon 18, la seule mutation détectée était la substitution A720V (1/71, 1,40%).

Tableau 19 : Sous-types mutationnels

Types de mutation	Fréquence
Exon 18	
Exon 18 A702V	1 (1,40%)
Exon 19	
Del 19	23 (32,39%)
Exon 19 E746_A750del	24 (33,80%)
Exon 19 K745-E746insTPVAIK	1 (1,40%)
Exon 19 E746_S752>A	1 (1,40%)
Exon 19 E746_A752>V	1 (1,40%)
L747_572>HQ	1 (1,40%)
Exon 20	
Exon 20 insertions	2 (2,81%)
Exon 20 S768I	3 (4,22%)
Exon 20 T790M	1 (1,40%)
Exon 21	
Exon 21 L858R	11 (15,49%)
Exon 21 L861Q	2 (2,81%)

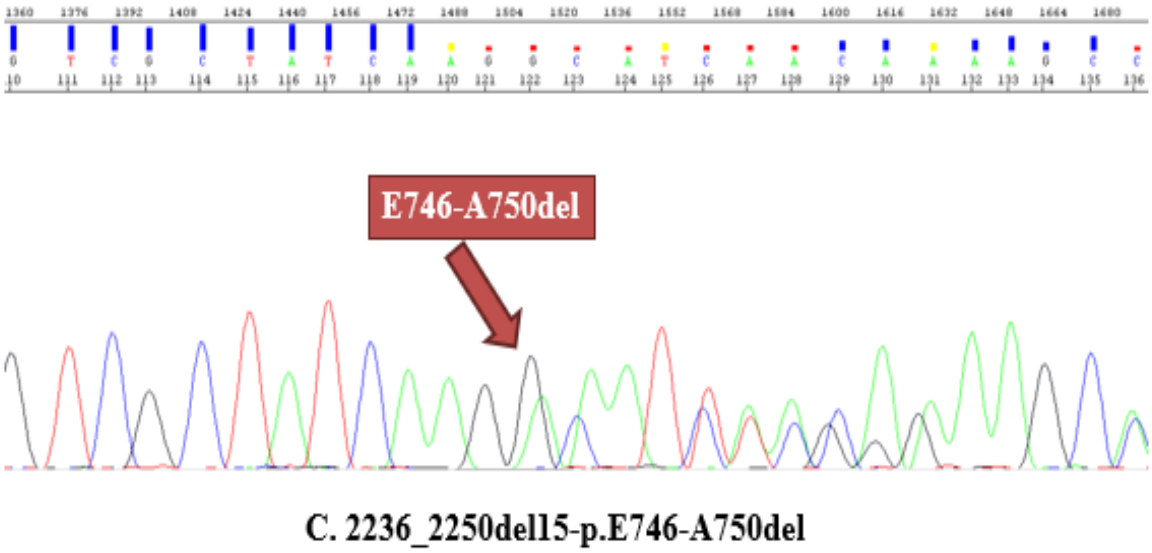


Figure 64 : Electrophérogramme de la délétion E746_A750del

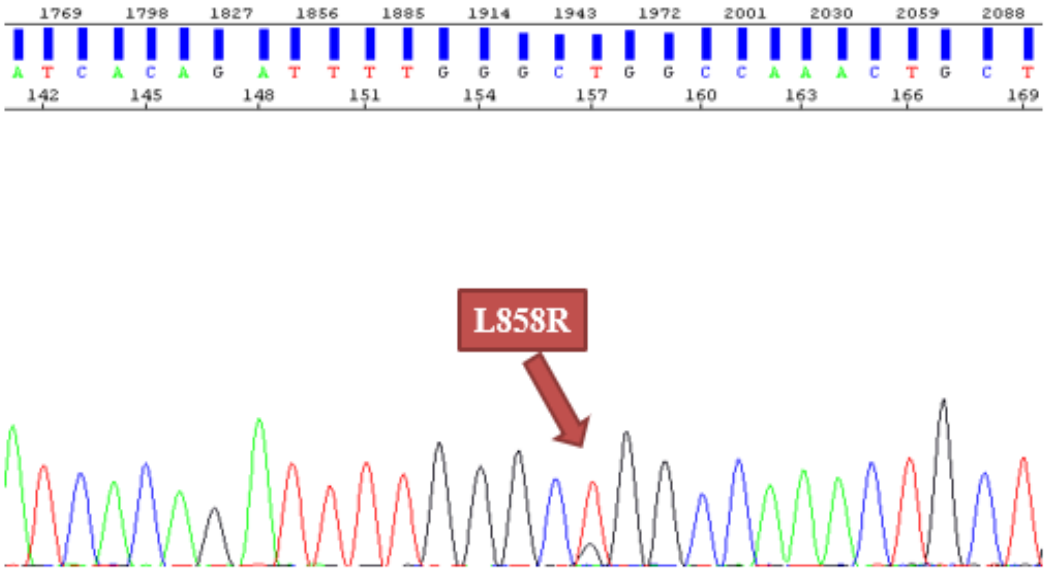


Figure 65 : Electrophérogramme de la mutation L858R

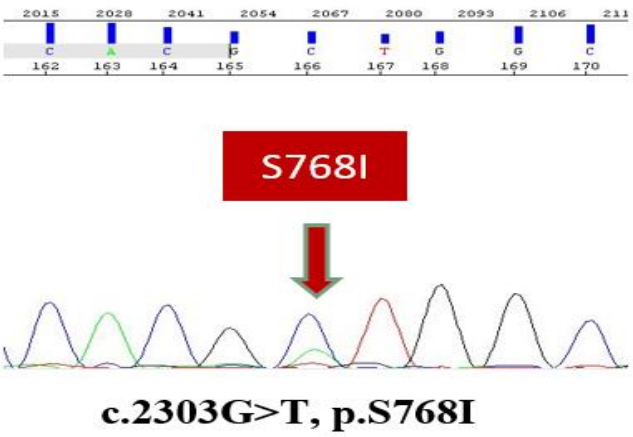


Figure 66 : Electrophérogramme de la mutation S768I

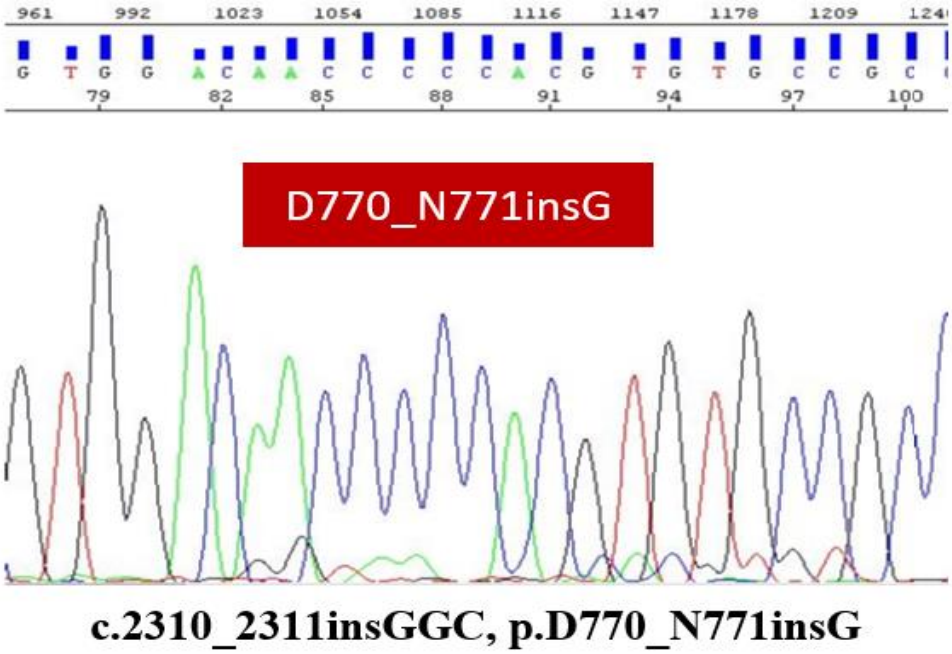
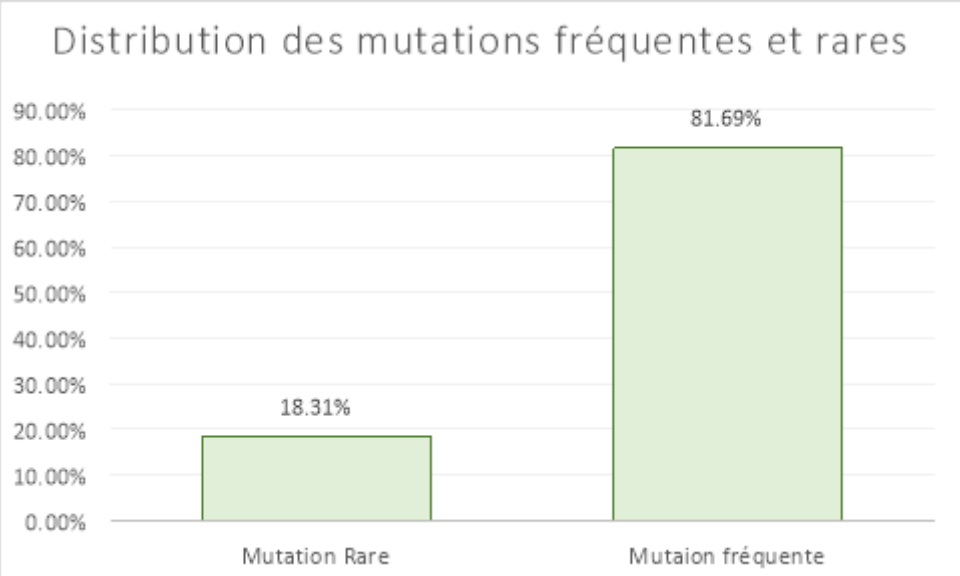


Figure 67 : Electrophérogramme de l'insertion D770_N771insG

I.4.9 Fréquence des mutations rares :

Dans cette étude, les délétions exon 19 et la mutation L858R connus sous le nom des mutations communes du gène EGFR, ensemble représentaient 81,69% de toutes les mutations. Les mutations rares regroupent la mutation d'exon 18, les délétions insertion (délins) de l'exon 19, les insertions de l'exon 20 et les mutation ponctuelles S768I, T790M de l'exon 20 et la L861Q de l'exon 21. Les mutations rares représentaient un pourcentage de 18,3%.



Dans le groupe des mutations rares, la substitution S768I représente la mutation la plus fréquente (23,07%) suivie des insertions aux niveau de l'exon 20 (15,38%) et la mutation L861Q (15,38%).

Tableau 20 : Fréquence des mutations rares

Mutation rare (n=13)	**Fréquence**
Exon 18 A702V	7,69%
Exon 19 K745-E746insTPVAIK	7,69%
Exon 19 E746_S752>A	7,69%
Exon 19 E746_A752>V	7,69%
L747_572>HQ	7,69%
Exon 20 insertions	15,38%

Exon 20 S768I	23,07%
Exon 20 T790M	7,69%
Exon 21 L861Q	15,38%

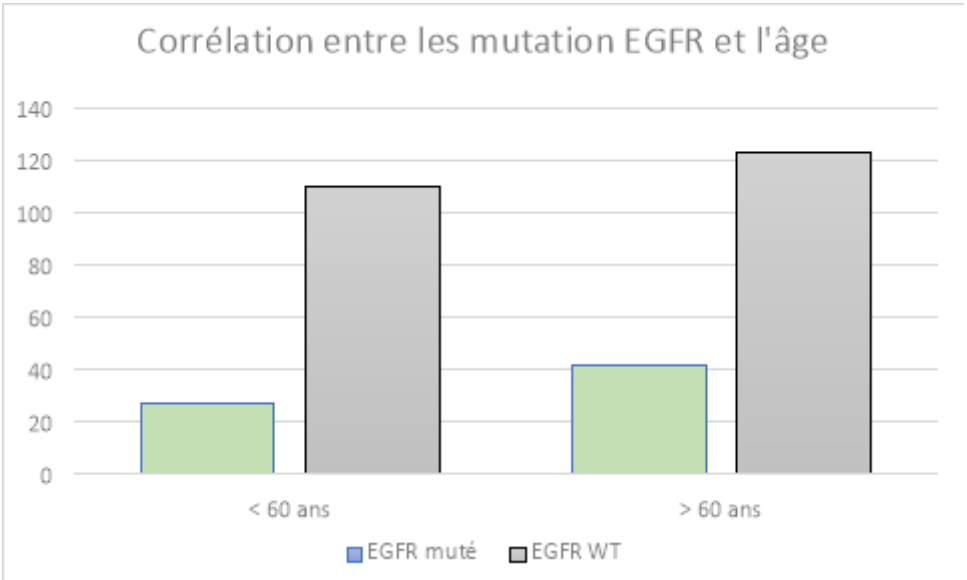
II. Analyse de corrélation :

II.1 Analyse de corrélation entre les mutations EGFR et les différents paramètres clinicopathologiques et histologique :

II.1.1 Association entre les mutations EGFR et les paramètres clinicopathologiques :

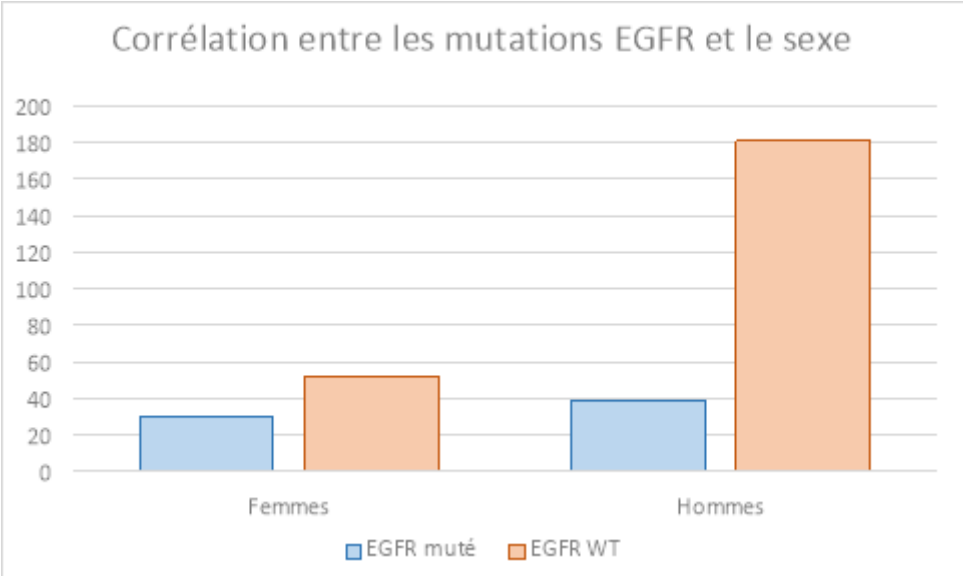
II.1.1.1 Association entre les mutations EGFR et l'âge des patients :

Dans notre série l'âge moyen du groupe positif était de 60,57 ans (tranche d'âge, 27-79) et était similaire à celui des cas négatifs 60,27 (tranche d'âge, 26-91). Il n'existe pas d'association significative entre les mutations EGFR et l'âge des patients au moment du diagnostic p=0,2.



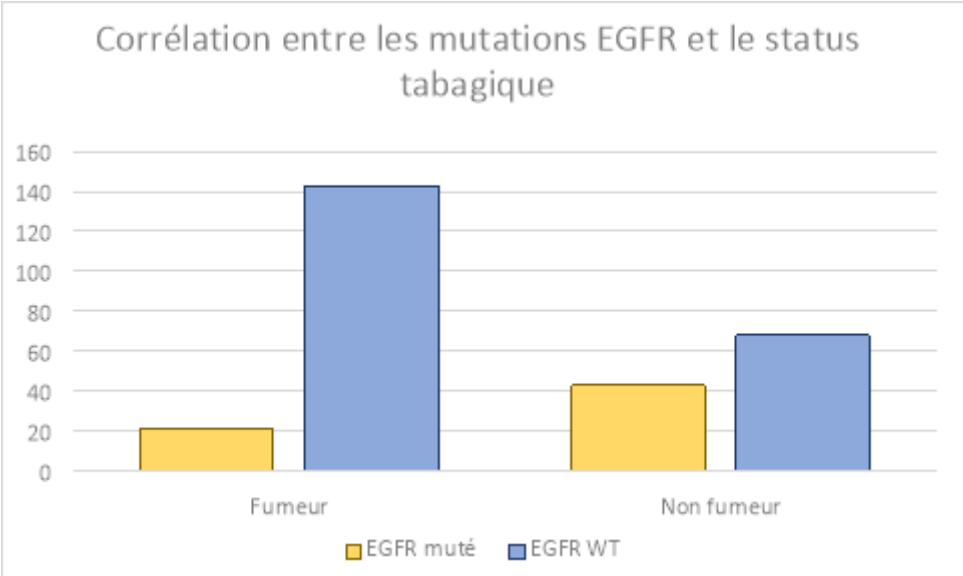
II.1.1.2 Association entre les mutations EGFR et le sexe :

Sur les 82 femmes incluses dans l'étude, 36,58% présentaient une mutation positive au niveau du gène EGFR par rapport à 17,72% des hommes. L'association entre les mutations EGFR et le sexe féminin était statistiquement significative (p=0,001).



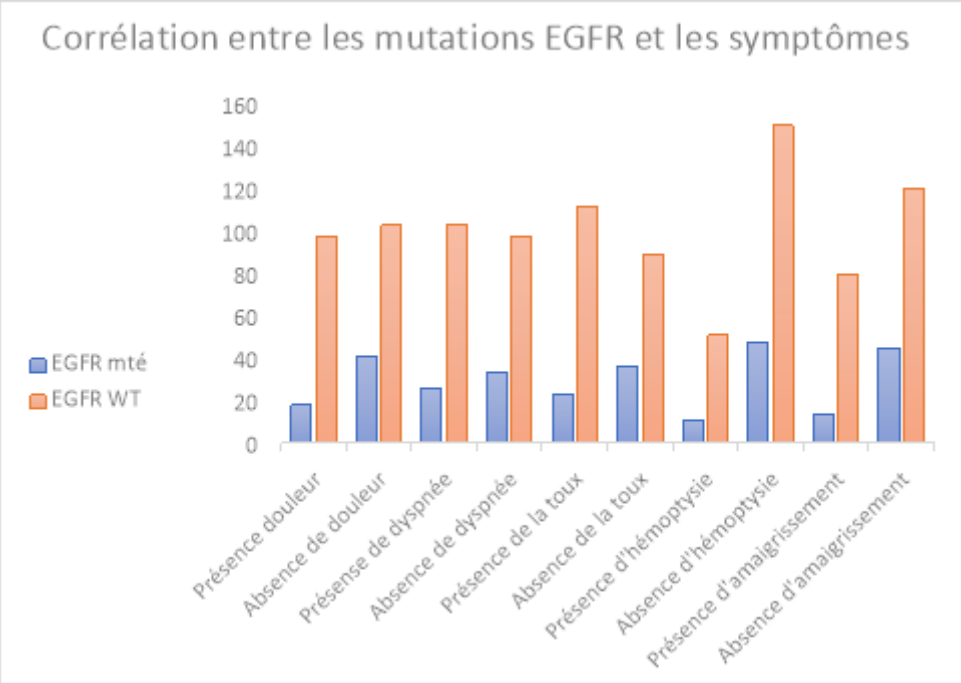
II.1.1.3 Association entre les mutations EGFR et le statut tabagique :

Comme prévu, la plupart des patients dont les tumeurs portaient une mutation positive du gène EGFR ont été des non-fumeurs (67,18%) (p<0,0001).



II.1.1.4 Association entre les mutations EGFR et les symptômes cliniques des patients :

La dyspnée était la symptomatologie la plus fréquente chez les patients avec EGFR muté 44,06%, suivie par la toux 38,98%, la douleur 30,5%, l'amaigrissement 23,7% et l'hémoptysie 18,6%.



II.1.1.5 Association entre les mutations EGFR et les autres caractéristiques :

La présence d'une mutation EGFR a été détectée chez 55,8% des cas dont le poumon droit était le siège de la tumeur primitive. 92,8% des mutation ont été détectée sur des biopsie le plus souvent prélevées à partir de la tumeur primitive (66,7%) et par la technique endoscopique (66,7%). La taille de processus tumorales était supérieure à 5cm pour la majorité des cas EGFR muté (68,8%).

Tableau 21 : Caractéristiques des cas EGFR muté

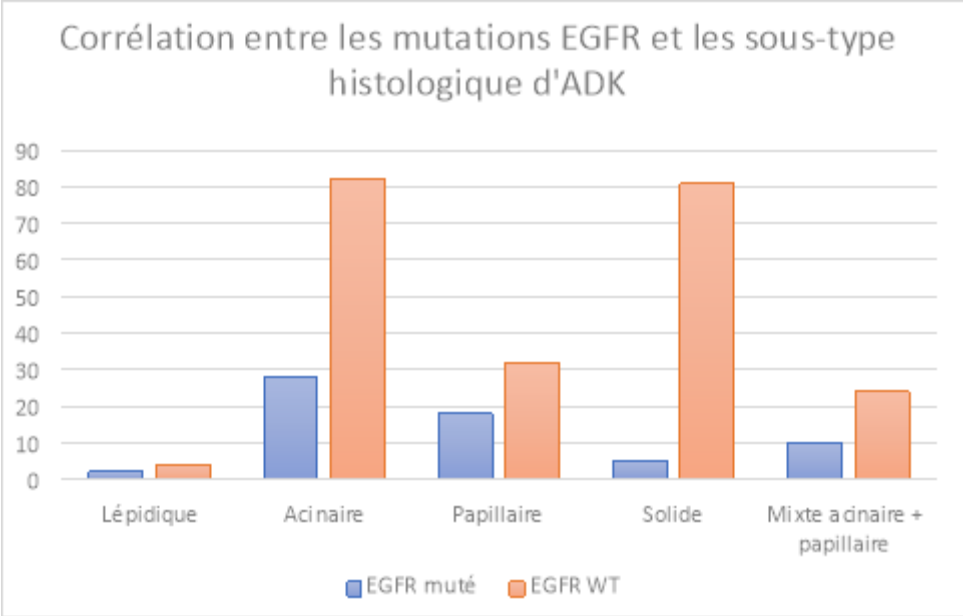
Paramètres	EGFR muté	EGFR WT	La valeur P
Siège de la tumeur			
Poumon gauche	43,1%	43,9%	P=0,5
Poumon droit	56,9%	56,1%	
Type de prélèvement			
Lobectomie	5,8%	2,1%	
Biopsie	92,8%	97,4%	P=0,09

Technique de prélèvement			
Endoscopique	66,7%	62,2%	P=0,3
Scanno-guidé	17,4%	27,5%	
Chirurgical	15,9%	10,3%	
Prélèvement primitif	66,7%	78,1%	P=0,04
Prélèvement métastatique	33,3%	21,9%	
Taille de la tumeur			
< 2	8,3%	2,6%	P=0,2
> 2 à < 3	4,2%	5,3%	
> 3 à < 5	18,8%	25,4%	
> 5	68,8%	66,7%	
Test EGFR			
Séquençage directe	37,7%	38,2%	P=0,2
PCR en temps réel	46,4%	51,1%	
Pyroséquençage	14,5%	10,7%	

II.1.2 Association entre les mutations EGFR et les paramètres histologiques de la tumeur :

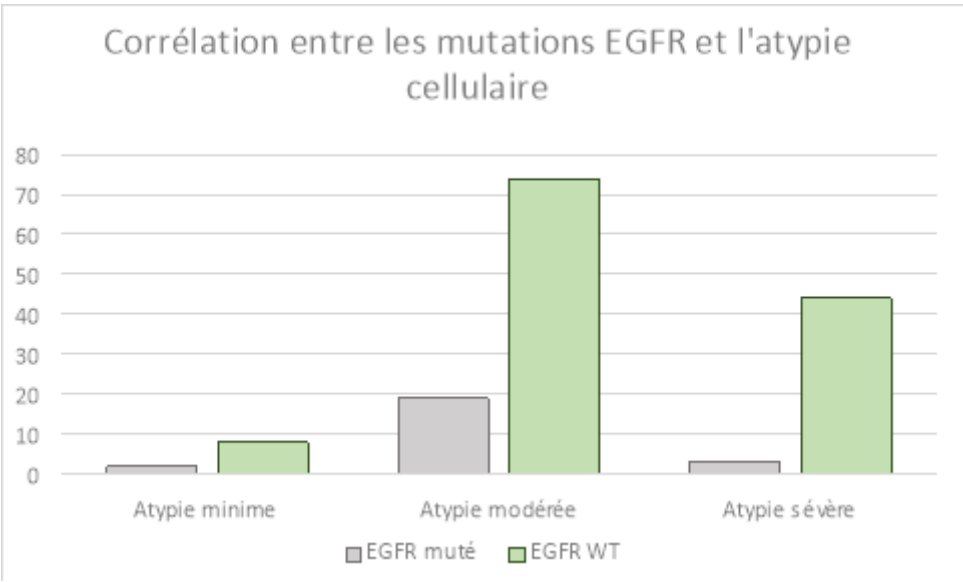
II.1.2.1 Association entre les mutations EGFR et les sous types histologiques d'adénocarcinome pulmonaire :

Une corrélation significative a été signalée entre les mutations EGFR et le sous type papillaire (p=0,002) et acinaire (p=0,03). L'adénocarcinome d'architecture papillaire a été muté dans 36% des cas, suivi par l'acinaire 25,45%, alors que le sous type solide n'a été muté que dans 5,81% des cas. Les mutations EGFR étaient fréquemment trouvées dans les tumeurs présentant une architecture acinaire ou papillaire. Une corrélation négative a été révélée entre le sous type solide et la présence d'une mutation EGFR (p<0,0001).



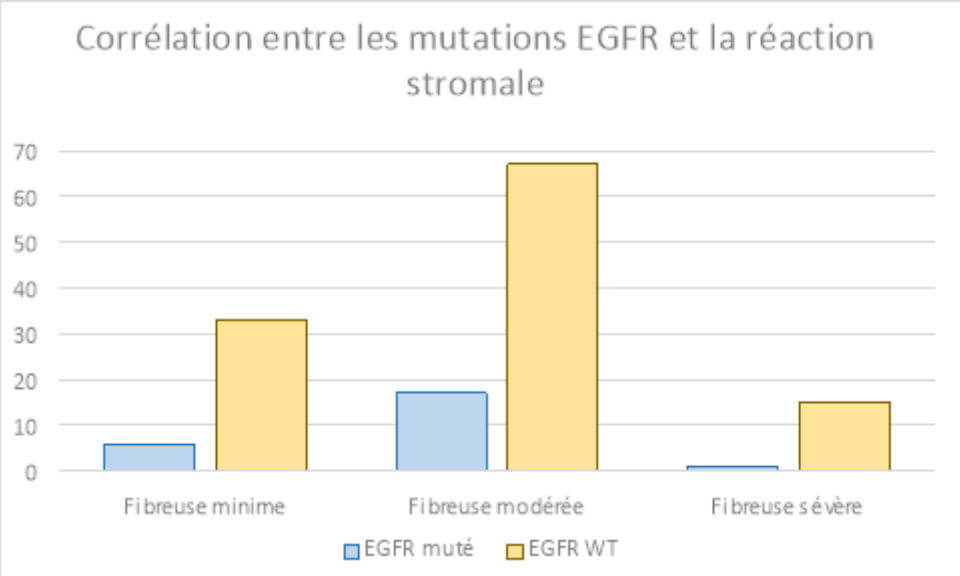
II.1.2.2 Association entre les mutations EGFR et l'atypie cellulaire :

Une association significative (p=0,04) a été détectée entre l'atypie modérée et la présence d'une mutation EGFR. 79,2% du groupe EGFR muté présentaient une atypie cellulaire modérée, contre 58% dans le groupe Wild-Type.



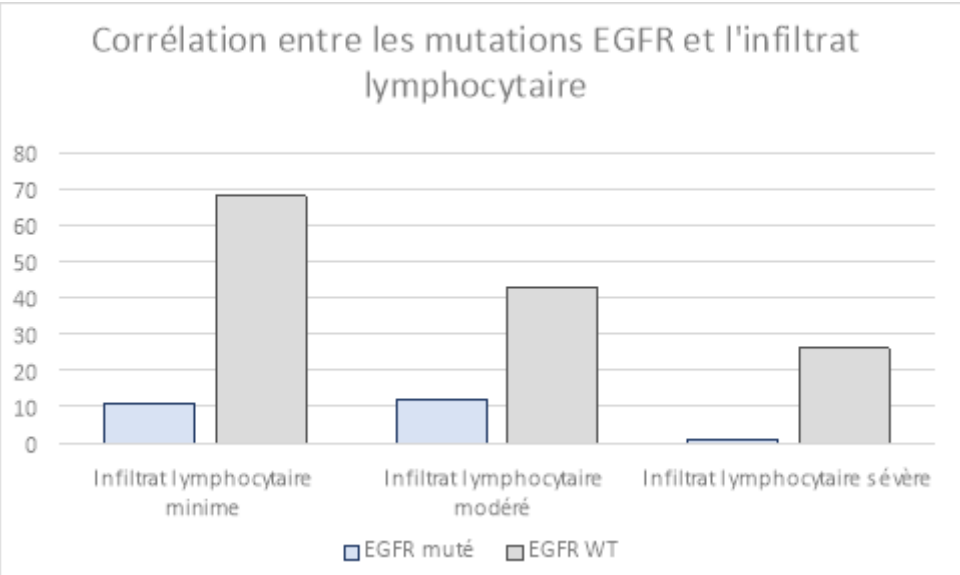
II.1.2.3 Association entre les mutations EGFR et le stroma réaction :

70,8% des tumeurs EGFR mutés présentaient un stroma fibreux modéré contre 53,2% dans le groupe WT (p=0,08).



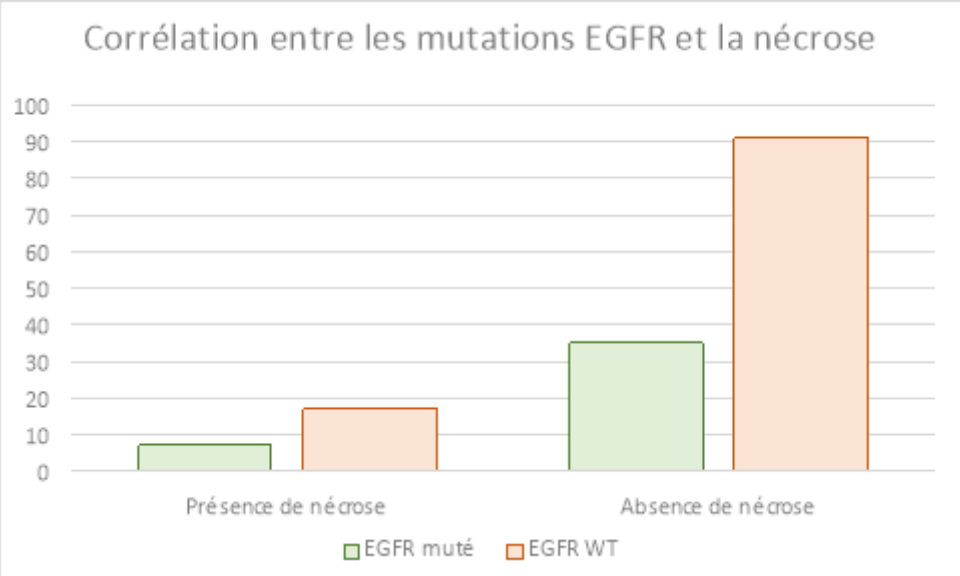
II.1.2.4Association entre les mutations EGFR et l'infiltrat lymphocytaire :

Les lymphocytes infiltrant la tumeur étaient modérés dans 50 % des tumeurs EGFR mutés EGFR, alors que 54 % du groupe EGFR WT présentaient une infiltration minimale.



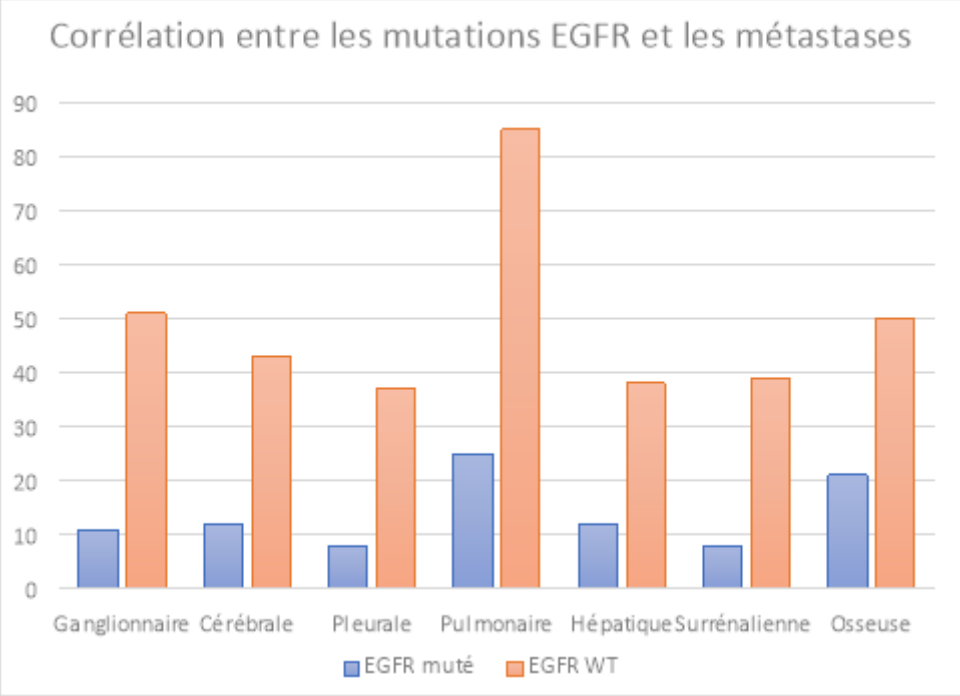
II.1.2.5Association entre les mutations EGFR et la nécrose :

La présence de nécrose a été révélée chez 28% des cas, dont 16,66% ont été EGFR mutés et 83,33% ont été EGFR WTs (p=0,1).



II.1.2.6Association entre les mutations EGFR et les sites métastatiques :

La majorité des patients muté pour l'EGFR (96,6%) présentaient des métastases au moment du diagnostic. Les métastases au niveau pulmonaires étaient les plus fréquentes dans le groupe EGFR muté (43,9%), suivie des métastases osseuses (37,5%), cérébrale (21,4%), hépatique (21,1%), ganglionnaire (19,6%), pleurale (14,3%) et surrénalienne (14%). Une association significative a été observée entre les mutations EGFR et les métastases osseuses (p=0,05).



II.1.3 Association entre les différents biomarqueurs moléculaires :

Un marquage positif pour l'anticorps anti-CK7 a été observée chez 100% des tumeurs EGFR mutés. Une corrélation significative (p=0,001) a été révélée entre les mutations EGFR et l'expression de l'anticorps anti-TTF1. La P63 et la P40 ont été positives dans (14,3% et 10% respectivement) des cas présentant une mutation EGFR. Un marquage positif des anticorps anti-CK5/6 et anti-CK20 a été révélé dans (16,7% et 13,3% respectivement) des cas EGFR mutés. Les trois cas avec un réarrangement ALK ont été EGFR wild type.

Tableau 22 : Association des différents biomarqueurs moléculaires

Marqueurs immunohistochimiques	EGFR positif	EGFR négatif	La valeur p
TTF1			
Positive	98%	79,9%	P=0,001
Négative	2%	20,1%	
CK7			
Positive	100%	99,2%	P=0,7
Négative	0%	0,8%	
P63			
Positive	14,3%	21,3%	P=0,5
Négative	85,7%	78,7%	
P40 (n=55)			
Positive	10%	2,2%	P=0,3
Négative	90%	97,8%	
CK5/6 (n=46)			
Positive	16,7%	10,3%	P=0,5
Négative	83,3%	89,7%	
CK20			
Positive	13,3%	9,6%	P=0,4
Négative	86,7%	90,4%	

II.1.4 Comparaison des caractéristiques clinicopathogiques des patients avec exon 19Del et L858R :

Les patients présentant une mutation L858R étaient significativement plus âgés que les patients avec une délétion exon 19. L'incidence du statut non tabagique chez les patients avec L858R était plus élevée que celle observée chez le groupe avec la Del 19 (81,8% vs 52,9%). Une association significative a été observé entre le statut non tabagique et les deux types de mutations. Le taux de mutation L858R chez les femmes était inférieur à celui du groupe avec Del 19 (36,4 % contre 47,9 %). Sur le plan histologique, une corrélation significative a été révélée entre les délétions 19 et le sous type acinaire. La mutation L858R a été détectée dans 90,9% des cas provenant de tumeurs primitives, tandis que les délétions 19 ont été détectées dans 64,7% des cas provenant du site primitif. Une association négative a été révélée entre la présence d'une délétion au niveau de l'exon 19 et la symptomatologie de la douleur, la toux et la taille tumorale de la tumeur primitive inférieure à 2cm. Une corrélation statistiquement significative a été retrouvée ente l'expression du marqueur protéiqueTTF1 et la présence d'une délétion exon 19.

Tableau 23 : Caractéristiques clinicopathologiques des tumeurs avec délétion exon 19 et avec la mutation L858R

Paramètre	Délétion exon 19	Exon 19 WT	La valeur P	Mutation L858R	Absence de mutation L858R	La valeur P
Age						
< 60 ans	45,4%	45,1%	P=0,5	18,2%	46,4%	
>60 ans	54,6%	54,9%		81,8%	53,6%	P=0,05
Sexe						
Femme	47,1%	23,1%	P=0,001	36,4%	26,8%	P=0,3
Homme	52,9%	76,9%		63,6%	73,2%	
Statut tabagique						
Fumeur	30,4%	65,5%		18,2%	61,4%	
Non-fumeur	69,6%	34,5%	P<0,0001	81,8%	38,6%	P=0,004

Symptômes						
Douleur	27,9%	47,9%	P=0,01	33,3%	45,0%	P=0,3
Dyspnée	46,5%	50,2%	P=0,3	44,4%	49,8%	P=0,5
Toux	37,2%	54,8%	P=0,02	33,3%	52,6%	P=0,2
Hémoptysie	18,6%	24,9%	P=0,2	22,2%	23,9%	P=0,6
Amaigrissement	25,6%	38,4%	P=0,07	0,0%	37,6%	P=0,01
Type de prélèvement						
Lobectomie	7,8%	2,0%		0,0%	3,1%	
Biopsie	90,2%	98,0%	P=0,015	100%	96,6%	P=0,6
Cytologie	2,0%	0,0%		0,0%	0,3%	
Technique de prélèvement						
Biopsie chirurgicale						
Endoscopique	11,8%	8,0%	P=0,09	0,0%	8,9%	P=0,2
Scanno-guidé	60,8%	63,7%		90,9%	62,2%	
	19,6%	26,3%		9,1%	25,8%	
Type de tumeur						
Tumeur primitive	64,7%	77,7%	P=0,04	90,9%	74,9%	P=0,2
Tumeur métastatique	35,3%	22,3%		9,1%	25,1%	
Siège de la tumeur						
Poumon gauche	47,2%	43,0%	P=0,3	44,4%	43,7%	
Poumon droit	52,8%	57,0%		55,6%	56,3%	P=0,6
Taille de la tumeur						
< 2	11,4%	2,5%	P=0,02	0,0%	3,9%	
> 2 à < 3	0,0%	5,9%		0,0%	5,2%	
> 3 à < 5	20,0%	24,8%		12,5%	24,5%	
> 5	68,6%	66,8%		87,5%	66,4%	P=0,1
Histologie						
Solide	10,0%	50,0%		28,6%	25,4%	P=0,1
Acinaire	63,3%	54,8%		85,7%	55,0%	
Papillaire	53,3%	20,5%	P<0,0001	28,6%	44,4%	
Tumeur pure	66,7%	65,6%	P=0,5	57,1%	66,1%	P=0,4
Tumeur mixte	33,3%	34,4%		42,9%	33,9%	
Sites métastatiques						
Ganglionnaire	17,5%	26,9%	P=0,1	22,2%	25,5%	P=0,5
Cérébral	25,0%	21,7%	P=0,3	33,3%	21,8%	P=0,3
Pleural	17,5%	17,8%	P=0,5	0,0%	18,4%	P=0,1

Pulmonaire	40,0%	44,3%	P=0,3	55,6%	43,2%	P=0,3
Hépatique	24,4%	19,2%	P=0,2	11,1%	20,4%	P=0,4
Surrénalien	17,1%	19,3%	P=0,4	11,1%	19,3%	P=0,4
Osseux	35,0%	27,4%	P=0,2	22,2%	28,8%	P=0,5
Marqueurs protéiques						
CK5/6 (n=46)	0,0%	14,3%	P=0,5	100%	11,1%	P=0,1
P63 (n=54)	20,0%	20,4%	P=0,7	0,0%	20,8%	P=0,7
P40 (n=55)	12,5%	2,1%	P=0,2	0,0%	3,7%	P=0,9
TTF1 (n=234)	97,2%	81,3%	P=0,009	100%	83,2%	P=0,2
CK7 (n=177)	100,0%	92,7%	P=0,1	100%	93,5%	P=0,6
CK20 (89)	7,1%	10,7%	P=0,5	0,0%	10,2%	P=0,8
Test de mutation						
Séquençage directe	39,2%	37,8%	P=0,4	27,3%	38,5%	P=0,3
PCR en temps réel	43,1%	51,4%	P=0,1	54,5%	49,8%	
Pyroséquençage	15,7%	10,8%	P=0,2	18,2%	11,3%	

II.1.5 Comparaison des caractéristiques clinicopathologiques des patients avec les mutations fréquentes et rares :

Le tableau ci-dessous présente la comparaison des différents paramètres clinicopathologiques entre les mutations rares et fréquentes. Les patients dont les tumeurs portent des mutations rares partagent presque les mêmes caractéristiques que ceux avec les mutations fréquentes. Sauf pour le statut tabagique, contrairement aux mutations fréquentes, on note une association significative entre les mutations rares et le statut tabagique des patients (p=0,02).

Tableau 24 : Comparaison des caractéristiques clinicopathologiques des patients portants des mutations fréquentes et des mutations rares

Paramètres	Mutation fréquente	EGFR WT	La valeur P	Mutation rare	EGFR WT		La valeur P	Mutation fréquente	Mutation rare	La valeur P
Age										
< 60 ans	38,2%	47,0%	P=0,1	38,5%	45,7%		P=0,4	39,3%	38,5%	P=0,6
>60 ans	61,8%	53,0%		61,5%	54,3%			60,7%	61,5%	
Sexe										
Femme	47,3%	22,7%	P<0,0001	30,8%	27,0%		P=0,4	46,4%	30,8%	
Homme	52,7%	77,3%		69,2%	73,0%			53,6%	69,2%	P=0,2
Statut tabagique										
Fumeur	26,9%	67,3%	P<0,0001	63,6%	59,5%		P=0,5	26,4%	63,6%	P=0,02
Non-fumeur	73,1%	32,7%		36,4%	40,5%			73,6%	36,4%	

Symptômes										
Douleur	29,2%	48,1%	P=0,01	36,4%	45,0%		P=0,4	29,2%	36,4%	P=0,4
Dyspnée	41,7%	51,4%	P=0,1	54,5%	49,4%		P=0,4	41,7%	54,5%	P=0,3
Toux	35,4%	55,7%	P=0,009	54,5%	51,8%		P=0,5	35,4%	54,5%	P=0,2
Hémoptysie	16,7%	25,5%	P=0,1	27,3%	23,7%		P=0,5	16,7%	27,3%	P=0,3
Amaigrissement	20,8%	39,8%	P=0,009	36,4%	36,3%		P=0,6	20,8%	36,4%	P=0,2
Type de prélèvement										
Lobectomie	7,3%	2,0%		0,0%	3,1%		P=1	7,1%	0,0%	P=0,3
Biopsie	90,9%	97,6%	P=0,03	100%	96,2%			91,1%	100%	
Cytologie	0,0%	1,8%		0,0%	0,3%			1,8%	0,0%	
Technique de prélèvement										
Biopsie chirurgicale	10,9%	8,1%		7,7%	8,7%		P=0,9	10,7%	7,7%	P=0,7
Endoscopique	67,3%	62,3%	P=0,05	69,2%	63,0%			66,1%	69,2%	
Scanno-guidé	14,5%	27,5%		23,1%	25,3%			16,1%	23,1%	
Type de tumeur										
Tumeur primitive	69,1%	76,9%	P=0,1	53,8%	76,5%		P=0,06	69,6%	53,8%	P=0,2
Tumeur métastatique	30,9%	23,1%		46,2%	23,5%			30,4%	46,2%	
Siège de la tumeur										
Poumon gauche	51,2%	42,0%	P=0,1	10,0%	45,3%		P=0,02	51,2%	10,0%	P=0,01
Poumon droit	48,8%	58,0%		90,0%	54,7%			48,8%	90,0%	
Taille de la tumeur										
< 2	9,8%	2,6%	P=0,05	0,0%	3,9%		P=0,7	9,8%	0,0%	P=0,5
> 2 à < 3	0,0%	6,1%	P=0,09	28,6%	4,3%		P=0,04	0,0%	28,6%	P=0,01
> 3 à < 5	19,5%	25,0%	P=0,2	14,3%	24,3%		P=0,4	19,5%	14,3%	P=0,6
> 5	70,7%	66,3%	P=0,3	57,1%	67,4%		P=0,4	70,7%	57,1%	P=0,3
Histologie										
Solide	12,1%	50,3%		16,7%	44,7%			11,8%	16,7%	P=0,4
Acinaire	66,7%	54,0%		83,3%	55,3%		P=0,1	67,6%	83,3%	
Papillaire	51,5%	20,2%	P<0,0001	16,7%	25,8%			50,0%	16,7%	

Tumeur pure	66,7%	65,6%	P=0,5	66,7%	65,8%		P=0,6	67,6%	66,7%	P=0,6
Tumeur mixte	33,3%	34,4%		33,3%	34,2%			32,4%	33,3%	
Sites métastatiques										
Ganglionnaire	17,8%	27,1%	P=0,1	36,4%	24,9%		P=0,2	17,8%	36,4%	P=0,1
Cérébral	24,4%	21,7%	P=0,4	18,2%	22,4%		P=0,5	24,4%	18,2%	P=0,5
Pleural	11,1%	19,1%	P=0,1	27,3%	17,3%		P=0,3	11,1%	27,3%	P=0,1
Pulmonaire	40,0%	44,4%	P=0,3	54,5%	43,2%		P=0,3	40,0%	54,5%	P=0,2
Hépatique	22,2%	19,6%	P=0,4	25,0%	19,8%		P=0,4	22,2%	25,0%	P=0,5
Surrénalien	13,3%	20,2%	P=0,1	25,0%	18,7%		P=0,4	13,3%	25,0%	P=0,2
Osseux	35,6%	27,1%	P=0,1	45,5%	27,8%		P=0,1	35,6%	45,5%	P=0,3
Marqueurs protéiques										
CK5/6 (n=46)	20,0%	12,2%	P=0,5	0,0%	13,3%		P=0,8	20,0%	0,0%	P=0,8
P63 (n=54)	16,7%	20,8%	P=0,6	0,0%	20,8%		P=0,7	16,7%	0,0%	P=0,8
P40 (n=55)	14,3%	2,1%	P=0,2	0,0%	3,8%		P=0,8	14,3%	0,0%	P=0,7
TTF1 (n=234)	97,4%	81,0%	P=0,005	100%	83,0%		P=0,1	97,5%	100%	P=0,8
CK7 (n=177)	100%	92,6%	P=0,1	87,5%	94,1%		P=0,4	100%	87,5%	P=0,2
CK20 (n=90)	7,7%	11,7%	P=0,5	33,3%	10,3%		P=0,3	7,7%	33,3%	P=0,3
Test de mutation										
Séquençage directe	38,2%	38,1%		38,5%	38,1%			37,5%	38,5%	P=0,5
PCR en temps réel	45,5%	51,0%	P=0,2	46,2%	50,2%		P=0,5	46,4%	46,2%	
Pyroséquençage	14,5%	10,9%		15,4%	11,4%			14,3%	15,4%	

II.2 Analyse de corrélation entre le réarrangement ALK et les différents paramètres clinicopathologiques et histologiques :

Les translocations ALK ont été détectées chez 3 patients, deux femmes et un homme dans une série de 69 cas. L'âge médian des cas ALK réarrangés était de 61 ans avec une tranche d'âge de (44 à 74). Avec une différence proche de la signification (p=0,08), les patients présentant un réarrangement ALK avaient tendance à être associés au statut non tabagique. La dyspnée était la symptomatologie la plus fréquente chez le groupe ALK réarrangé. Tous les patients dont les tumeurs présentent une translocation ALK ont été stade IV au moment du diagnostic, avec des métastases au niveau pulmonaire, cérébral, osseux, pancréatique et l'estomac. Sur le plan histologique, 2 cas ALK réarrangés ont présenté une tumeur mixte avec une architecture

solide et acinaire, alors que l'architecture lépidique a été observé chez le seul patient de sexe masculin présentant une translocation ALK. L'expression de l'anticorps anti-TTF1 a été positive chez les trois cas ALK réarrangé.

Tableau 25 : Association entre la présence d'une translocation ALK et les paramètres clinicopathologiques des patients

Paramètres	ALK réarrangé	ALK WT	La valeur P
Age			
< 60 ans	66,7%	34,8%	P=0,2
>60 ans	33,3%	65,2%	
Sexe			
Femme	66,7%	24,2%	P=0,1
Homme	33,3%	75,8%	
Statut tabagique			
Fumeur	0,0%	57,4%	P=0,08
Non-fumeur	100%	42,6%	
Symptômes			
Douleur	0,0%	41,5%	P=0,2
Dyspnée	66,7%	37,7%	P=0,3
Toux	33,3%	47,2%	P=0,5
Hémoptysie	0,0%	24,5%	P=0,4
Amaigrissement	33,3%	34,0%	P=0,7
Type de prélèvement			
Lobectomie	0,0%	3,0%	
Biopsie	100%	97,0%	P=0,9
Technique de prélèvement			
Biopsie chirurgicale	33,3%	6,1%	
Endoscopique	33,3%	74,2%	P=0,2
Scanno-guidé	33,3%	16,7%	
Type de tumeur			
Tumeur primitive	100%	68,2%	P=0,3
Tumeur métastatique	0,0%	31,8%	
Siège de la tumeur			
Poumon gauche	50,0%	41,3%	P=0,6
Poumon droit	50,0%	58,7%	
Taille de la tumeur			
< 2	33,3%	0,0%	P=0,06
> 2 à < 3	33,3%	2,4%	
> 3 à < 5	0,0%	28,6%	
> 5	33,3%	69,0%	

Histologie			
Solide	66,7%	40,0%	
Acinaire	66,7%	40,0%	P=0,3
Papillaire	0,0%	20,0%	
Tumeur pure	33,3%	79,2%	P=0,1
Tumeur mixte	66,7%	20,8%	
Sites métastatiques			
Ganglionnaire	0,0%	21,6%	P=0,4
Cérébral	33,3%	29,4%	P=0,6
Pleural	0,0%	11,5%	P=0,7
Pulmonaire	33,3%	62,7%	P=0,3
Hépatique	0,0%	11,8%	P=0,6
Surrénalien	0,0%	15,7%	P=0,6
Osseux	33,3%	29,4%	P=0,6

III. Analyse de survie :

III.1 Survie globale et survie sans rechute :

Le suivi des patients inclus dans cette étude a été réalisé prospectivement. La médiane de survie globale de nos patients était de 21 mois avec un intervalle de 1 à 90 mois, le taux de survie globale était de 45,52% [33,36 %; 51,68 %]. La majorité des patients présentaient des métastases au moments du diagnostic. Le délai médian de survie sans rechute par l'apparition d'une nouvelle métastase est de 6 mois avec des extrémités allant de 1 à 55mois. Le taux de survie sans rechute était de 19,71% [13,18 %; 26,23 %].

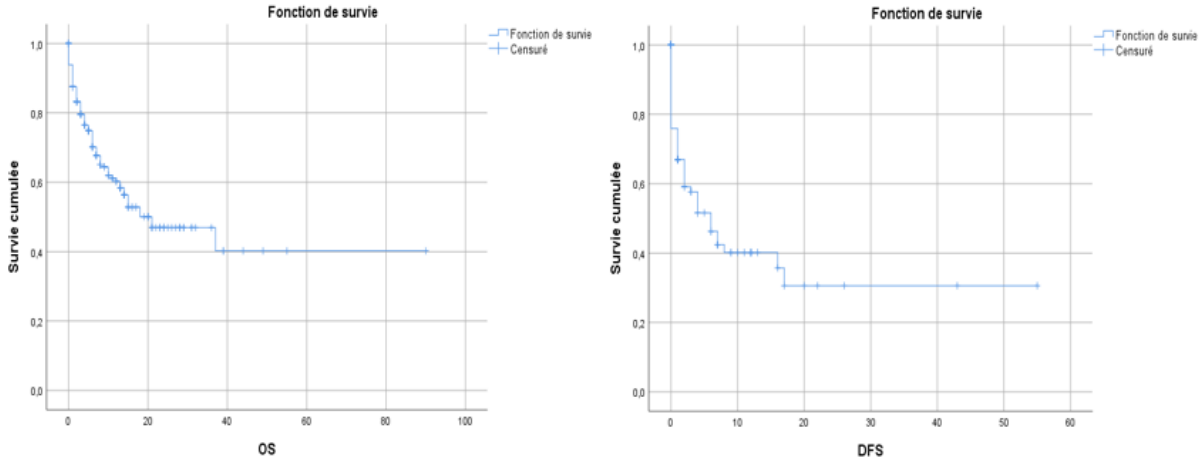


Figure 68 : Survie globale et survie sans progression (mois)

III.2 Survie globale et facteurs Clinicopathologiques :

Le tableau : présente la survie globale en fonction des caractéristiques clinicopathologiques des patients. Une survie globale de plus de 85 mois a été observée chez les patients avec un âge moins de 60 ans (85 mois vs 48 mois), moyenne (49,54% vs 30,72%) (p=0,7) de sexe féminin (85 mois vs 48 mois), moyenne (39,79% vs 29,32%) (p=0,8) et qui sont non-fumeurs (85 mois vs 43mois), moyenne (51,89% vs 25,08%) (p=0,2). L'absence du symptôme d'amaigrissement était significativement associée à une survie globale meilleure (21,47% vs 56,94% ; p=0,02).

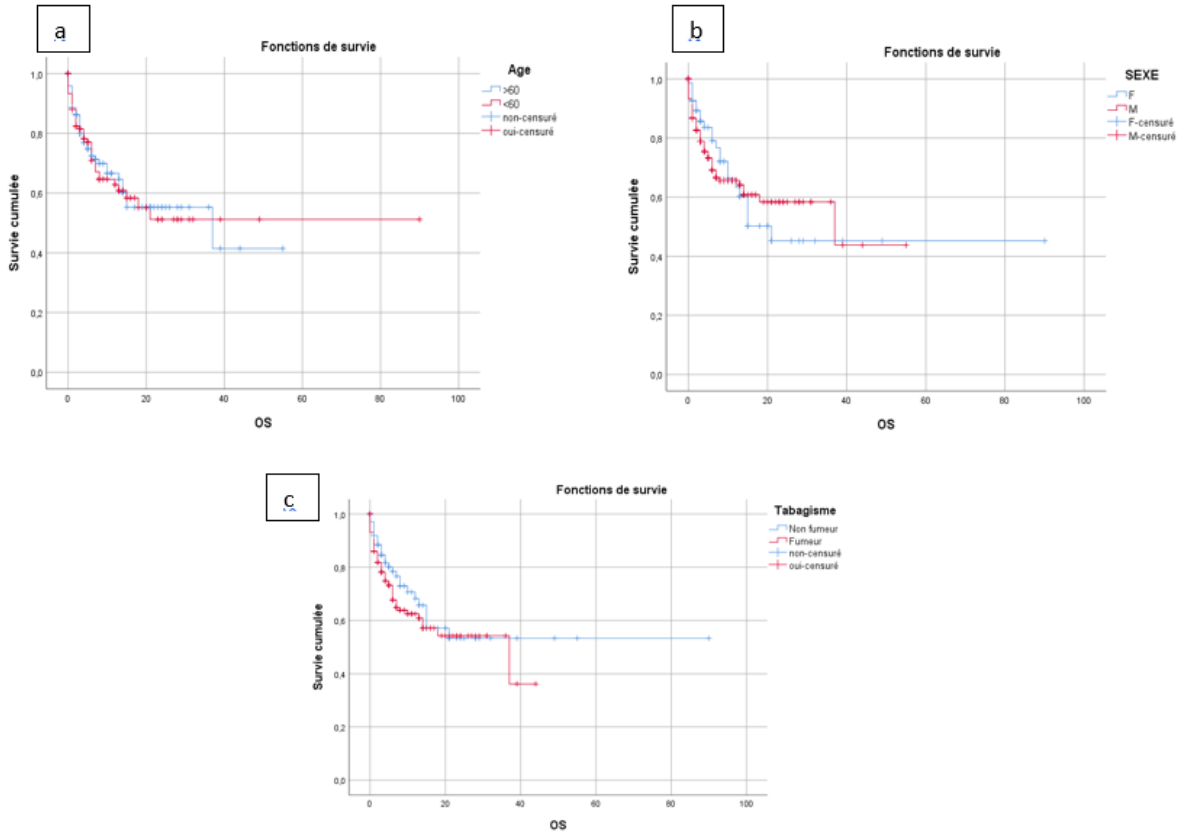


Figure 69 : Survie globale en fonction des caractéristiques clinicopathologiques (a) l'âge, (b) le sexe, (c) le statut tabagique

Tableau 26 : Corrélation entre la survie globale et les paramètres clinicopathologiques

Variables	Moyenne de survie globale par mois (95% CI)	La valeur P
Symptômes		
Douleur	40,84 [26,66 – 55,02]	P=0,3
Dyspnée	48,07 [37,71 – 58,43]	P=0,3
Toux	31,00 [24,82 – 37,18]	P=0,7
Hémoptysie	32,55 [24,63 – 40,47]	P=0,6
Amaigrissement	21,47 [16,46 – 26,48]	P=0,02

Siège de la tumeur		
Poumon gauche	27,06 [21,87 – 32,26]	P=0,8
Poumon droit	45,90 [32,39 – 59,41]	
Médiastin	28,07 [14,96 – 41,18]	
Taille de la tumeur		
< 2	25,33 [17,18 – 33,48]	
> 2 à < 3	17,54 [11,69 – 23,39]	
> 3 à < 5	31,88 [24,81 – 38,94]	
> 5	39,63 [26,56 – 52,70]	P=0,1
Sites métastatiques		
Ganglionnaire	32,17 [24,10 – 40,25]	P=0,8
Cérébral	25,61 [19,00 – 32,21]	P=0,9
Pleural	18,60 [14,14 – 23,06]	P=0,9
Pulmonaire	53,49 [41,17 – 65,80]	P=0,1
Hépatique	19,67 [15,05 – 24,29]	P=0,6
Surrénalien	17,08 [12,99 – 21,17]	P=0,4
Osseux	22,64 [17,89 – 27,39]	P=0,2

III.3 Survie globale et caractéristiques histologiques :

De point de vue histologique, aucune association significative n'a été révélée entre la survie et les caractéristiques histologiques, tandis que la meilleure survie globale a été observé chez les patients dont la tumeur présente une architecture acinaire 46,03 (36,48% – 55,59% ; p=0,5) et non pas une architecture papillaire 30,43 (21,37% - 39,50%) (p=0,9) et solide 23,36 (17,68% - 29,04% ; p=0,6). Le taux de survie globale chez les patients présentant une tumeur mixte acinaire et papillaire est de 26,23 (15,74% - 36,72% ; p=0,2) et mixte acinaire et solide de 22,10 (14,05% - 30,15% ; p=0,8) soit une diminution de 19,8 et 23,93 mois respectivement par rapport ou groupe acinaire.

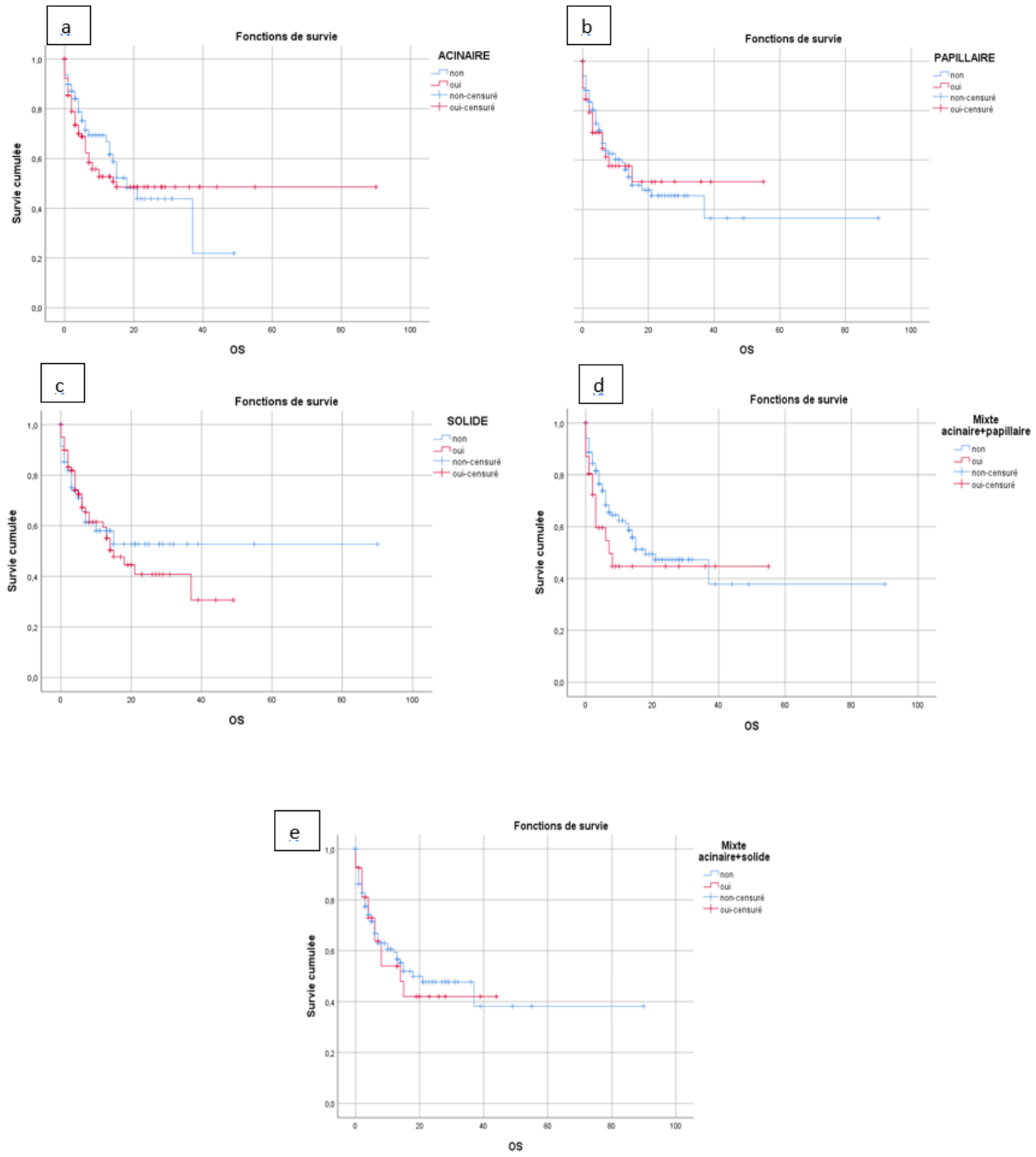


Figure 70 : Survie globale en fonction des caractéristiques histologiques (a) sous-type acinaire, (b) sous-type papillaire, (c) sous-type solide, (d) sous-type mixte acinaire et papillaire, (e) sous-type mixte acinaire et solide

L'atypie cellulaire, le stroma réaction, l'infiltrat lymphocytaire et la nécrose ont été définie pour 150 patients. L'atypie cellulaire minime était significativement associée à une meilleure survie globale avec une moyenne de 39,68 (21,87% - 54,15% ; p=0,05). Le groupe stroma réaction minime a montré une moyenne de survie globale de 38,88 (p=0,8) largement supérieur à celle observée chez le groupe stroma réaction modérée (23,69%) et/ou sévère (15,07%). Pour l'infiltrat lymphocytaire la moyenne de survie globale la plus élevée a été

retrouvée chez le groupe présentant un infiltrat lymphocytaire modérée (29,26%) (p=0,4). La survie globale était plus élevé chez les patients dont les tumeurs ne présentant pas de nécrose (40,58) (31,59% - 49,58% ; P=0,3) par rapport à ceux avec la présence de nécrose (15,90) (10,11% - 21,68% ; p=0,3).

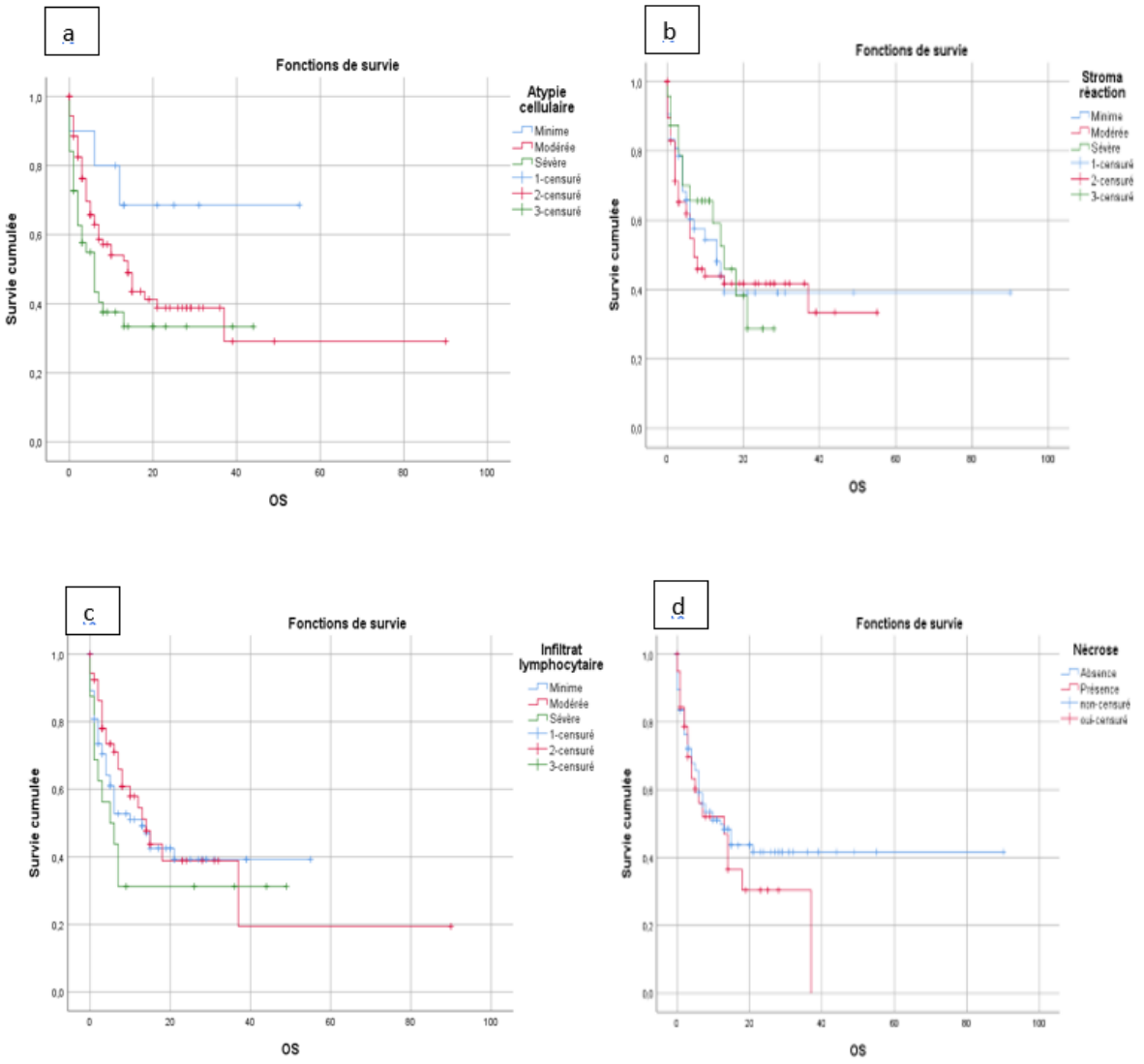


Figure 71 : Survie globale en fonction des caractéristiques histologiques (a) atypie cellulaire, (b) stroma réaction, (c) infiltrat lymphocytaire, (d) nécrose

III.4 Survie globale et biomarqueurs moléculaires :

L'analyse de l'impact pronostique des biomarqueurs moléculaires, a révélé que la meilleure survie globale a été significativement associée au groupe présentant une mutation EGFR avec une moyenne de 68,28 (56,41% – 80,15% ; p=0,02). Avec une différence proche de la signification (p=0,08), la meilleure survie globale a été observée chez les patients présentant une mutation commune avec une moyenne de 67,85 (54,49% – 81,22%), suivie du

groupe avec les mutations rares avec une moyenne de 42,91 (28,00% - 57,82%) et le groupe EGFR wild type avec une moyenne de 25,79 (21,48% - 30,09%). Pour les patients présentant une mutation EGFR, un bénéfice net en termes de survie a été observé chez les patients traité par la combinaison de la chimiothérapie et des ITKs Alors que pour les patients avec EGFR WT la meilleure survie a été observé chez les patients traités par chimiothérapie.

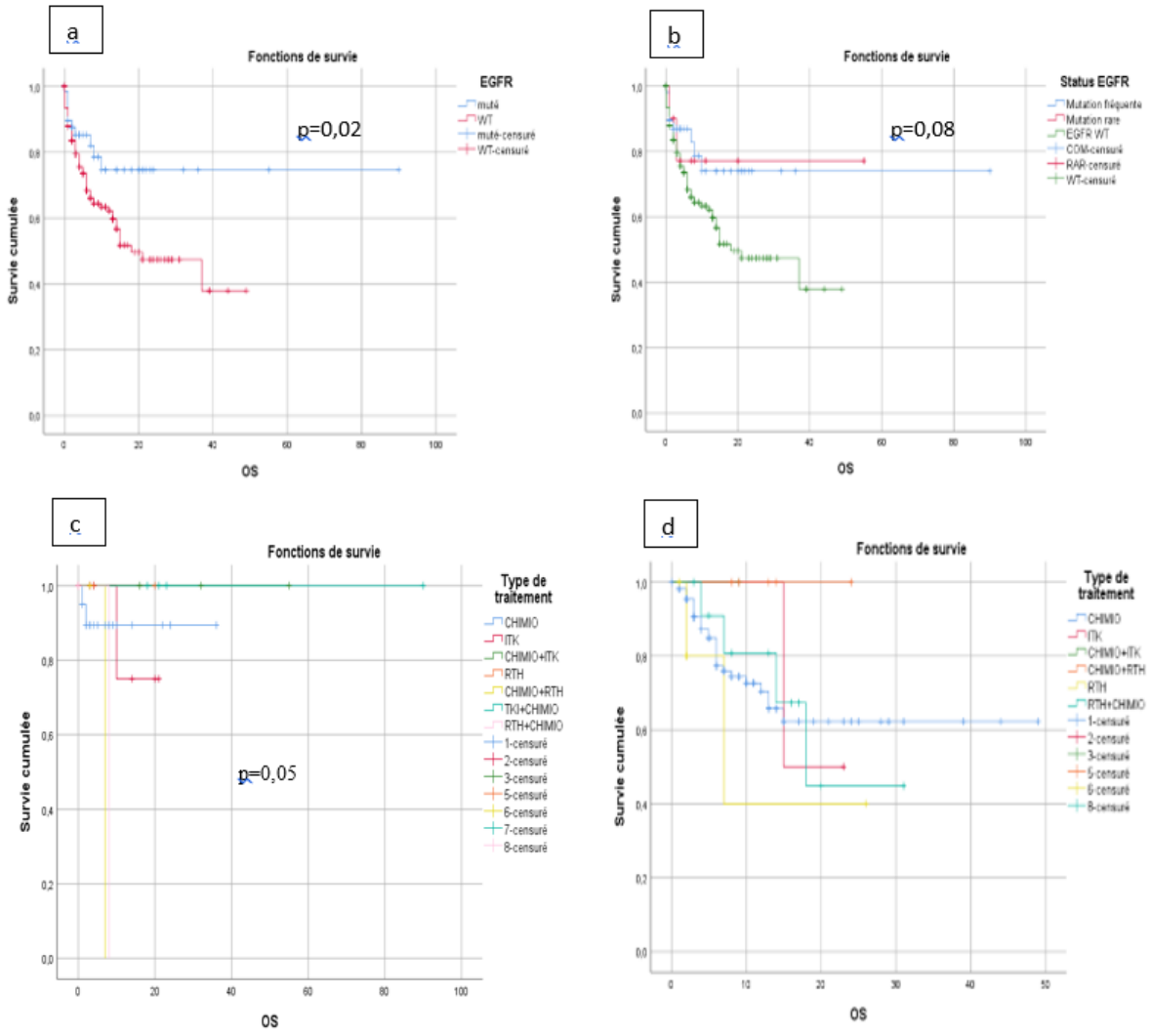


Figure 72 : Survie globale en fonction de la présence de mutation EGFR (a) survie en fonction du statut EGFR (b) survie en fonction du type de mutation (c) survie des patients avec EGFR muté (d) survie des patients avec EGFR WT

La moyenne de survie globale chez le groupe ALK réarrangé était de 15 mois inférieur à celui du groupe ALK WT 21 mois.

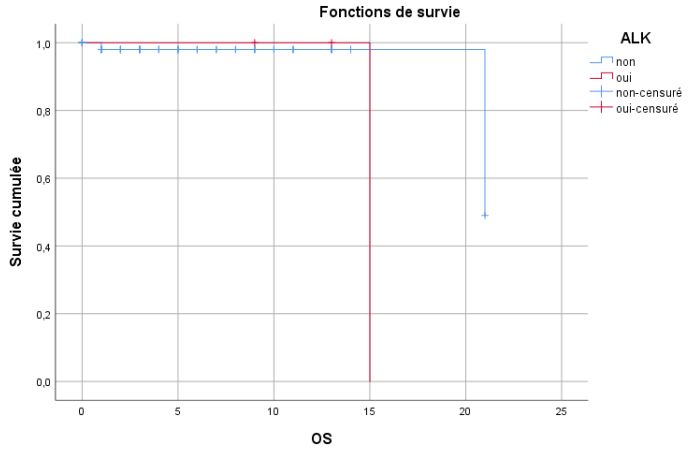


Figure 73 : Survie globale en fonction de la présence d'un réarrangement ALK

Aucune association significative n'a été retrouvée entre la survie globale des patients et les biomarqueurs immunohistochimiques (TTF1, CK7, CK5/6, CK20 et P63).

Tableau 27 : Corrélation entre la survie globale et les biomarqueurs immunohistochimique

Variables	**Moyenne de survie globale par mois (95% CI)**	**La valeur P**
TTF1	27,89 [22,30 – 33,48]	0,8
CK7	29,86 [24,05 – 35,67]	0,4
CK5/6	7,75 [2,34 – 13,15]	0,7
P63	10,42 [6,08 – 14,76]	0,8

DISCUSSION

Le cancer du poumon non à petites cellules est de plus en plus considéré comme une maladie hétérogène, tant dans sa présentation clinique que dans sa biologie. La caractérisation moléculaire du cancer du poumon a considérablement modifié la classification et le traitement de ces tumeurs, elle est devenue un élément essentiel du diagnostic pathologique et des décisions thérapeutiques oncologiques. Grâce à la découverte des nouveaux biomarqueurs, tels que les mutations du récepteur du facteur de croissance épidermique et les translocations du lymphome kinase anaplasique, il est devenu possible d'identifier des sous-groupes des patients qui peuvent bénéficier des thérapies moléculaires ciblées. Le succès des thérapies anticancéreuses ciblées a créé un nouveau paradigme de thérapie personnalisée et a également permis d'accélérer le développement de nouveaux médicaments pour le traitement du cancer du poumon [328].

Cette thèse a pour objectif de définir le profil moléculaire à savoir les mutations au niveau du gène EGFR et les translocations au niveau du gène ALK, du cancer bronchique non à petites cellules non épidermoïde dans la région du Nord-Est du Maroc. Ce qui permettra par la suite de déterminer les caractéristiques épidémiologique, clinique et histologique ainsi que la survie globale des patients présentant ces altérations.

I. Epidémiologie du cancer de poumon :

Le cancer du poumon constitue un enjeu majeur de la santé publique mondiale. En effet, c'est le premier cancer chez l'homme et le deuxième après le cancer du sein chez la femme [329]. De plus, le cancer du poumon demeure aujourd'hui la première cause de décès par cancer au monde, aussi bien dans les pays développés que dans les pays en voie de développement. Selon les statistiques de GLOBOCAN, 2,2 millions nouveau cas atteints du cancer pulmonaire ont été diagnostiqués en 2020, avec une incidence mondiale de (39 per 100,000) et, 1,8 million de décès [330]. Le cancer du poumon reste le type de cancer le plus fréquent chez l'homme, mais au cours de la dernière décennie, une augmentation très nette de l'incidence et de la mortalité par ce type de cancer a été observée chez la femme. Ceci étant en particulier lié à l'augmentation de la consommation de la cigarette dans la population féminine. Au Maroc, 7 353 nouveaux cas de CP ont été enregistrés en 2020, il représente le deuxième type de cancer le plus fréquent après le cancer du sein. Il s'agit également de la première tumeur maligne qui touche la population masculine et, la sixième chez les femmes. Cependant, conformément aux statistiques mondiales, le cancer du poumon est la cause

principale des décès (6 551) liés au cancer au Maroc, le taux de survie à cinq ans est faible, notamment en raison d'un diagnostic souvent tardif [2].

II. Caractéristiques, clinique et histologique du CBNPC :

L'incidence du cancer du poumon dépendrait de l'âge. Cependant, le lien entre la survie et l'âge au moment du diagnostic reste controversé. Jusqu'à présent, peu d'études ont examiné la relation entre l'âge et les caractéristiques clinicopathologiques des patients atteints du cancer de poumon non à petites cellules (CPNPC). En effet, la prévalence du cancer de poumon a suivi l'augmentation de l'espérance de vie, avec un âge médian de 63 ans au moment du diagnostic [331]. Les patients âgés présentent des taux de mortalité plus élevés que les patients plus jeunes atteints de divers cancers solides, quelles que soient les caractéristiques cliniques de la tumeur primitive, y compris les patients atteints du CBNPC avancé ou métastatique. Il apparaît dans ce travail que ce type de cancer apparaisse avec l'âge de façon significative et cela quel que soit le sexe. Il survient en général vers un âge médian de 61 ± 10,80 ans. Un âge relativement jeune par rapport à l'âge médian de 63 ans rapporté par une étude chinoise [332] et à 67 ans décrit dans une étude asiatique [333]. D'autres études américaine et européenne ont notifiés un âge médian au moment du diagnostic chez les patients atteints d'un CBNPC, supérieur à le nôtre (70 ans) [334] [335]. Cependant, un âge médian de 53, inférieur à le nôtre a été rapporté dans une étude africaine [336]. La fréquence des patients âgés de plus de 60 ans était (54,6%) ne différait pas significativement de celui observé chez les patients âgés de moins de 60ans (45,4%). Image semblable rapportée dans une étude marocaine réalisée au centre régional d'oncologie-Hassan II de Oujda [337] et complétement différente à celle observée dans une étude suédine ou l'âge médian au moment du diagnostic était de 69 ans et seulement 10 % des patients ont moins de 60 ans [338].

Le CBNPC est le cancer le plus fréquent chez l'homme, son incidence est assez stable depuis 1980, mais aussi l'un des plus fréquents chez la femme et dont l'incidence semble y augmenter relativement plus vite que chez l'homme. Plusieurs études ont révélé une différence d'incidence du cancer de poumon en fonction du sexe. En 2015, une étude européenne a signalé une diminution significative de 12 % de l'incidence du cancer du poumon chez les hommes européens entre 2009 et 2015, tandis qu'une augmentation de 9 % a été constatée chez les femmes au cours de la même période, concluant que les taux d'incidence du cancer du poumon pourraient dépasser ceux du cancer du sein dans certains

pays de l'union européenne UE à la fin des années 2010 [339]. Il a été également démontré que, dans les pays occidentaux, les hommes ont atteint le pic d'incidence et de mortalité pour le cancer du poumon, avec un taux d'incidence en baisse, alors que les femmes s'approchent du plateau [340]. Il est généralement établi que ces valeurs sont influencées par le mode de vie, l'environnement et surtout le tabagisme, plutôt que par les différences biologiques associées au sexe. Dans notre étude il apparaît une nette prédominance (72,8%) du sexe masculin avec un sex-ratio de 2,68. Ce résultat concorde avec la littérature. Les différences dans l'épidémiologie du cancer du poumon en fonction du sexe font l'objet de recherches assez approfondies, montrant des valeurs similaires dans les pays développés, l'incidence étant principalement influencée par la prévalence du tabagisme [341]. De nombreux pays développés ont atteint le pic de leur charge de morbidité liée au tabac en cas de cancer du poumon, et les taux d'incidence et de mortalité ont commencé à diminuer avec une différence majeure selon le sexe. Historiquement, le tabagisme a toujours été plus fréquent chez le sexe masculin, ce qui a entraîné des taux d'incidence et de mortalité du cancer de poumon plus élevés dans le monde entier [342]. Les femmes ont commencé à fumer après la seconde guerre mondiale, et leur taux d'arrêt a été inférieur à celui des hommes, ce qui a entraîné un pic d'incidence du cancer du poumon beaucoup plus tardif [340].

Un seul agent étiologique (la fumée de cigarette) est de loin la cause principale du cancer pulmonaire étant responsable de 90 % des cas [343]. Le risque de développer un cancer de poumon chez les fumeurs est 15 à 30 fois supérieur, à celui des non-fumeurs [344]. Ce risque, augmente avec la durée de consommation du tabac, ainsi que le nombre de cigarettes fumées par jour. L'International Agency for Research on Cancer (IARC) a estimé que dans les populations avec une consommation tabagique prolongée, la proportion du cancer de poumon dû au tabagisme était de plus de 90 % [345]. La fumée de cigarette est un mélange de près de 4000 éléments dont une soixantaine ont été reconnus cancérigènes pour l'homme [346]. Le tabagisme augmente le risque de cancers du poumon, que ce soit les CBNPC ou les CBPC. Par ailleurs, le sevrage tabagique est bénéfique à tout âge. Il diminue le risque de cancer et augmente l'espérance de vie en comparaison avec les fumeurs [347]. On outre, plus la durée de sevrage est longue plus le risque du cancer de poumon diminue. Dans la population totale, on notait une proportion de $\approx$60% de fumeurs actifs et $\approx$40% de non-fumeurs. Une association significative a été révélée entre le sexe masculin et la consommation tabagique, le pourcentage des fumeurs chez les hommes était de 81,2% contre 5,1% chez les femmes. L'incidence du cancer de poumon chez les non-fumeurs est plus élevée chez les patients

asiatiques , il a été montré par une étude asiatique portée sur une cohorte de 96 565 patients, une augmentation du pourcentage des non-fumeurs de 49,9 % en 2011 à 60,2 % en 2018 [348]. Ces résultats ont été inférieur à ceux rapportés par une étude réalisée sur 1166 patients atteint d'un CBNPC, ou la proportion des fumeurs actifs était de 92,2% contre 7,8% des non-fumeurs le plus souvent des femmes [344]. Presque le même résultats a été observé dans une grande étude américaine sur 129 309 patients, ou la fréquence des non-fumeurs était de 12,5% et était généralement plus élevée chez les femmes que chez les hommes [349].

La nature asymptomatique du cancer de poumon, surtout dans ses premières phases, pourrait être l'un des principaux facteurs responsables d'un diagnostic tardif. Au début, le CP est presque toujours une maladie silencieuse, et elle lui faut plusieurs années pour se développer et présenter des signes ou des symptômes susceptibles d'alerter le patient [350]. En effet, plusieurs études ont montré que la majorité des patients atteints d'un cancer du poumon avancé présentaient certains symptômes, notamment des symptômes locaux comme la toux, la dyspnée et la douleur thoracique, et des symptômes systémiques comme la perte d'appétit et la fatigue [351][352][353][354]. Dans une étude anglaise, les symptômes les plus fréquents étaient la toux 56,2%, la fatigue 45,1%, la dyspnée 41,2%, la douleur thoracique 35,3% et l'hémoptysie 21,6%, alors que les symptômes systémiques ou généraux était faible [355]. En accord avec ces résultats, dans notre série, la toux, la dyspnée et la douleur thoracique représentaient la majorité des symptômes. La toux représente le signe clinique le plus fréquent avec un pourcentage de 51,9% suivie de la dyspnée 49,6% et la douleur thoracique 44,6%. Image semblable à celle rapportée dans une études récente portée sur 7184 cas de CP ou la symptomatologie la plus fréquente était la toux avec un pourcentage de 65% [356]. Un résultat différent a été retrouvée dans une série européenne ou la symptomatologie la plus fréquente était la douleur thoracique 34% suivie de l'hémoptysie 23,6% et la toux 19,8% [357].

Plusieurs études ont rapporté une différence de la mortalité par CP en fonction du siège de la tumeur primitive. Le pronostic du cancer du poumon droit par rapport à celui du poumon gauche pourrait être différent en raison de plusieurs facteurs. Tout d'abord, le poumon gauche est constitué de deux lobes et de huit segments, alors que le poumon droit comprend trois lobes et dix segments ; on pense donc que le poumon droit contribue davantage à la fonction pulmonaire globale que le poumon gauche. Deuxièmement, il a été signalé que les cancers du poumon situés dans différents côtés suivent des voies différentes et sautent les métastases vers les ganglions lymphatiques médiastinaux. Par exemple, une tumeur située dans le lobe

supérieur gauche se métastase d'abord au niveau du segment 5, alors qu'une tumeur située dans le lobe supérieur droit se métastase d'abord au segment 4. Troisièmement, le cancer du poumon du côté gauche et du côté droit peut présenter des caractéristiques biologiques et des mutations génétiques différentes. Les tumeurs présentant la mutation L858R du gène EGFR sont le plus souvent situées sur le côté droit, tandis que les tumeurs avec EGFR WT se trouvent sur le côté gauche. Quatrièmement, l'apport vasculaire entre le côté droit et le côté gauche peut varier [358]. Dans cette étude, 52,30% des tumeurs ont été localisées sur le poumon droit alors que 40,6% sur le poumon gauche. Presque même image a été observée dans une grande série asiatique réalisée sur 90 407 patients [358], et une étude européenne portée sur 1026 cas [359].

Du fait d'une évolution lentement asymptomatique, la majorité des patients (95,20%) présentaient un cancer localement avancé ou stade IV au moment du diagnostic. Plus d'un site métastatique a été objectivé lors du bilan d'extension pour 52,6% des cas. Plusieurs études antérieures ont montré que les sites métastatiques les plus courants dans le cancer du poumon sont les localisations osseuses, pulmonaire, cérébral, hépatique et surrénalienne. Dans cette étude une métastase locale ou pulmonaire représente le site métastasique le plus fréquent suivi par les métastases osseuse, ganglionnaire, cérébrale, hépatiques, surrénaliennes et pleurale. Presque même image a été rapporté dans l'une des plus grandes études sur les localisations métastatiques ou les métastases pulmonaires présentaient le site métastatique le plus fréquent au moment du diagnostic suivie des métastases osseuses, des métastases cérébrales, des métastases hépatiques et des métastases surrénalienne [360]. Ces résultats discordent avec ceux rapportés dans une étude européenne ou les métastases osseuses représentent le site métastatique le plus fréquent suivi par les métastases pulmonaire, hépatique, cérébral et surrénalienne [361]. De même, suite à une grande cohorte asiatique de 60,580 patients atteints d'un cancer pulmonaire, les métastases les plus fréquents étaient les localisations osseuses, cérébrales, hépatiques et ganglionnaires [362]. Une autre série européenne composée de 17,431 cas diagnostiqué d'un cancer pulmonaire, a montré que les métastases cérébrales étaient le site métastatique le plus fréquent suivi des métastases osseuses, hépatique, pulmonaire et surrénalienne [363].

Vu l'amélioration de la compréhension du cancer de poumon et la disponibilité de plus en plus des différents traitements, une sous-classification histologique plus précise est devenue indispensable pour guider les décisions thérapeutiques. L'adénocarcinome pulmonaire est le type histologique le plus fréquent, il représente différents aspects histologiques et

moléculaires et se caractérise par un large spectre d'hétérogénéité radiologique, clinique, pathologique et moléculaire [364]. En 2011, l'Association internationale pour l'étude du cancer du poumon (IASLC), l'American Thoracic Society (ATS) et l'European Respiratory Society (ERS) ont publié la nouvelle classification histologique de l'adénocarcinome pulmonaire [22]. Parallèlement, en 2015 l'Organisation mondiale de la santé OMS a adopté cette classification dans la classification des tumeurs pulmonaires [365]. Selon la nouvelle classification, l'adénocarcinome invasif comprend cinq architectures : lépidique, acinaire, papillaire, micropapillaire et solide. Plusieurs études ont montré que l'adénocarcinome d'architecture acinaire représente le sous type histologique le plus fréquents [366][38][367]. En accord avec ces résultats, dans cette étude le sous type acinaire était le type histologique le plus fréquent avec un pourcentage de 56,10% suivi par l'adénocarcinome d'architecture solide 43,90% et papillaire 25,50% alors que le sous type lépidique n'a était présent que chez 3,10% des cas. Image semblable à celle rapportés dans une cohorte asiatique où l'adénocarcinome d'architecture acinaire était le sous type histologique le plus fréquent avec un pourcentage de 41,48%, par contre l'adénocarcinome lépidique était le deuxième sous type fréquent avec un pourcentage de 28,90% suivie par les sous types solide 10,34% puis papillaire 7,09% [366]. Une différence des pourcentage a été retrouvée dans une autre cohorte portée sur 3254 cas, ou l'adénocarcinome acinaire était le plus fréquent avec un pourcentage de 42,0% suivi du papillaire 12,70%, lépidique 9,30% puis solide 7,5% [38]. Une autre étude américaine a montré un pourcentage de 45,42% pour le sous type acinaire suivi par les sous types papillaire 19,36%, solide 14,8% et lépidique 7,04% [367]. Une discordance a été révélée dans une série européenne ou le sous type solide était le plus fréquent 32,2% suivi par les sous types acinaire 30,5%, papillaire 16,3% et lépidique 15,5%. La distribution des sous-types histologiques prédominants dans la littérature est très hétérogène, elle est probablement liée aux différences épidémiologiques des populations analysées.

Bien que la prise de décision clinique dépende d'une classification histologique correcte, cette dernière n'est pas toujours techniquement réalisable du fait que ce type de cancer est souvent diagnostiqué sur des échantillons de tissus limités (prélèvements biopsique ou cytologique de petites tailles). Des algorithmes et des lignes directrices ont été mises en place pour la manipulation et l'interprétation des échantillons de petites tailles afin de faciliter et préciser le diagnostic. L'immunomarquage du facteur de transcription thyroïdien 1 et de la p63 sont recommandés comme première étape pour différencier l'adénocarcinome du carcinome épidermoide. Bien que d'autres anticorps, tels que la cytokératine 7 pour l'adénocarcinome et

les cytokératines 5/6 pour le carcinome épidermoide, puissent également être utilisées, un panel immunohistochimique conservateur est préconisé. La mise en œuvre de ces procédures standardisées permet de préserver les prélèvements pour les tests moléculaires qui sont essentiels pour guider le choix thérapeutique idéal. Conformément à ce qui a été rapporté dans la littérature, la majorité des tumeurs adénocarcinomateuses expriment la CK7 et le TTF1 et n'exprime pas la CK20, CK5/6, P63 et P40.

III. Caractéristiques moléculaires du CBNPC :

Au cours de la dernière décennie, le traitement du cancer de poumon, en particulier du sous-type adénocarcinome, a considérablement évolué. Une meilleure compréhension de la biologie tumorale a permis de définir des sous-groupes des patients distincts en fonction de leurs profils moléculaires. Cette classification génomique évolutive a permis d'orienter les stratégies thérapeutiques. La découverte des facteurs oncogènes a conduit à la conception des thérapies ciblant les tumeurs présentant des altérations génétiques spécifiques qui provoquent une signalisation et une prolifération aberrantes.

III.1 Testing EGFR :

L'identification des cibles moléculaires spécifiques des cellules tumorales est un prérequis pour le traitement personnalisé des cancers. Ces diagnostics moléculaires sont réalisés au sein des plateformes de pathologie moléculaire par des différents méthodes, qui permettent de mettre en évidence toutes cibles moléculaires. Le séquençage direct et la PCR en temps réel sont les techniques les plus fréquemment utilisées en pratique clinique pour le dépistage des mutations du gène EGFR [368].

Le séquençage direct des produits obtenus de la réaction de la PCR est le gold standard la détection des mutations génomiques et restera probablement la technique de référence utilisée pour couvrir toutes les nouvelles mutations. Toutefois, cette méthode présente plusieurs inconvénients, tels que sa faible sensibilité (20-50 %), la nécessité d'enrichissement tumoral des échantillons, la complexité et la durée du protocole, le risque important de contamination, le coût élevé et les difficultés d'interprétation. La méthode de la PCR en temps réel ou la qPCR en utilisant le kit PCR therascreen EGFR RGQ combine le système d'amplification des mutations réfractaires (ARMS) et les systèmes d'amorces/sondes fluorescentes (Scorpions). Ce test offre une sensibilité et une spécificité élevées pour le dépistage de 29 mutations courantes du gène EGFR, c'est une procédure simple et rapide, ne nécessite aucune

interprétation des résultats et présente une capacité de test à grande échelle dans les laboratoires cliniques [368]. La technique de pyroéquençage est une méthode quantitative en temps réel, il s'agit d'un séquençage par synthèse qui permet la détection de l'activité de l'ADN polymérase en temps réel. Cette méthode partage presque les mêmes avantages que la PCR en temps réel, sauf que les résultats du pyroséquençage nécessite une analyse via le logiciel PyroMark Q24. Dans la pratique clinique, les méthodes de détection des mutations EGFR sont principalement basées sur le contenu tumoral de l'échantillon à examiner, le matériel et l'équipement disponible, l'expérience du laboratoire et le fait que la détection des mutations EGFR soit considérée comme suffisante uniquement pour les mutations connues. Dans le cadre du CBNPC, étant donné le nombre croissant des cibles moléculaires (EGFR, ALK, ROS1, PDL1 etc.) et le faible matériel tumoral disponible, principalement obtenu à partir des échantillons biopsiques, la recherche des mutations EGFR par séquençage Sanger peut conduire à des résultats "faux négatifs". Dans la présente étude, nous décrivons notre expérience du testing EGFR chez les patients atteints de CBNPC en utilisant trois tests basés sur la PCR (séquençage direct, PCR en temps réel et pyroséquençage) en fonction des conditions et du calendrier du laboratoire. Les kits therascreen EGFR RGQ et therascreen EGFR PYRO étaient des tests très sensibles qui permettaient la détection des mutations EGFR dans des échantillons avec des pourcentages de cellules tumorales faibles (jusqu'à 5%). Les patients marocains atteints de cancer de poumon sont le plus souvent diagnostiqués à un stade avancé, l'examen histopathologique (HES et IHC) est fréquemment réalisé sur des prélèvements biopsiques de petites tailles. Dans notre série, le contenu tumoral des prélèvements tissulaire du CBNPC varie entre 5 et 90%. Après les examens histopathologiques, nous avons accès à des échantillons limités et insuffisants pour tous les biomarqueurs prédictifs. Dans ce contexte, l'utilisation d'une seule section de tissu tumoral fixé au formol et inclus en paraffine pour chaque biomarqueur pourrait favoriser une approche simultanée plutôt que séquentielle [369].

Dans cette étude 22 cas n'ont pas pu être analysé par séquençage directe (exclus) en raison du faible pourcentage de cellules tumorales inférieur à 20% qui représente le seuil de détection du séquençage Sanger. Une faible concentration d'ADN (dans certains cas, moins de 0,4 ng/µL dans notre expérience) est souvent obtenue après l'extraction d'ADN à partir de 5 rubans des coupes de 3 à 7µm des tissus fixés au formol et inclus en paraffine. Le test therascreen EGFR RGQ nécessite un apport total de 300ng d'ADN génomique pour détecter 29 mutations connues dans les quatre exons (18-21), et un maximum de 7 résultats par test peuvent être communiqués en 72H. Pour le test therascreen EGFR PYRO, un apport total de

120ng est nécessaire pour la détermination des mutations au niveau des codons 719 au niveau de l'exon 18, codon 768 et codon 790 au niveau de l'exon 20, codon 858 et codon 861 au niveau de l'exon 21 et les délétions et les mutations complexes au niveau de l'exon 19. L'analyse de 4 patients peut être réalisée par un seul Run pendant une durée de 72H. Pour la méthode Sanger, le séquençage peut prendre 4 à 5 jours et nécessite un apport de 100ng d'ADN amplifiable pour détecter toutes les mutations présentent au niveau des exons 18, 19, 20 et 21.

En comparant les trois tests, le faible taux d'échec, la haute sensibilité ainsi que la rapidité des tests therascreen EGFR RGQ et therascreen EGFR PYRO ont permis de fournir des résultats positifs et fiables pour la majorité des patients. Bien que le séquençage direct permette la détection de toutes les mutations présentent au niveau du gène EGFR et nécessite qu'un faible apport d'ADN, sa faible sensibilité, sa complexité et sa longue durée rendent nécessaire l'utilisation de techniques plus sensibles et plus rapides.

III.1.1 Prévalence des mutations EGFR :

Les mutations du récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR) représentent les facteurs oncogènes les plus fréquents dans le cancer bronchique non à petites cellules [370]. Grace aux avancées d'oncologie moléculaire, la différence de la biologie tumorale entre le sous-type mutant et sauvage a été mise en évidence. Les patients atteints d'un CBNPC métastatique avec EGFR muté disposent d'une variété d'agents ciblant le gène EGFR qui ont fait preuve pour traiter cette maladie [371].

Il a été largement signalé que la fréquence des mutations EGFR varie en fonction de l'ethnicité et des régions géographiques [372][373]. La plupart des données concernant la prévalence des mutations EGFR dans la population africaine sont controversées en raison de la taille des échantillons, de plus la majorité des études ont été réalisées principalement aux États-Unis [374]. A notre connaissance, notre série est la première réalisée en pratique clinique pour évaluer la fréquence des mutations EGFR et déterminer d'une manière détaillée les corrélations entre les types mutationnels et les différents aspects clinicopathologiques et histologiques des patients atteints d'un cancer bronchique non à petites cellules dans la population marocaine. Dans une revue systématique et une méta-analyse qui regroupe 456 articles dont la majorité des études incluses étaient des séries et/ou des études de cohorte, 30 466 sur 115 815 patients soit une fréquence de 26,30% présentaient une mutation au niveau du gène EGFR [375]. Ce pourcentage était proche à celui observé dans notre étude, 71 mutations ont été révélées dans une série de 302 cas soit une prévalence de 23,50%. Cette

fréquence était presque similaire à celle récemment publiée par une étude marocaine réalisée sur 334 patients, ou la présence d'une mutation EGFR a été détectée chez 21,9% des cas [376].

La fréquence des mutations EGFR la plus élevée a été observée chez les patients asiatiques atteints d'un CBNPC/ADK, elle varie entre 40 et 64% [377], ces données sont supérieurs à nos résultats et à ceux rapporter dans les études européennes et américaines. Cependant, plusieurs études en Amérique du nord ont montré un taux de mutation EGFR proche ou similaire à le nôtre [378][379][380]. Une fréquence de mutation de 26 à 30% a été observée dans des études indienne et de l'Amérique de sud [381][382]. L'incidence de la présence de mutation EGFR la plus basse a été observée dans les populations européenne (12,8%) [121]. Presque le même résultat rapporté dans notre étude a été retrouvée dans une méta-analyse réalisée sur 1215 patients du Moyen Orient et d'Afrique, ou la fréquence des mutation EGFR était 21,2%, un taux supérieure à celui observée dans la population européenne mais, toujours inférieurs à la fréquence rapportée dans les population asiatiques [383].

III.1.2 Sous-type mutationnel fréquent :

Le gène EGFR est composé de 28 exons, son domaine fonctionnel tyrosine kinase est codé par les exons 18-24. Les mutations EGFR au niveau des exons 18-21 chez les patients atteints d'un cancer de poumon sont associées à une sensibilité aux inhibiteurs de la tyrosine kinase de l'EGFR. Cette corrélation est probablement due à des modifications de la structure de la zone de liaison d'ATP du gène EGFR, améliorant la capacité de combinaison des ITK de l'EGFR. À ce jour, >30 mutations du gène EGFR ont été signalées, notamment les délétions au niveau de l'exon 19 (~45% de toutes les mutations de l'EGFR), les substitutions L858R au niveau de l'exon 21 (~40-45%), G719X au niveau de l'exon 18 (~5%), et les insertions au niveau de l'exon 20 (~1%) [384]. Dans une étude asiatique Pioneer, sur 372 patients avec EGFR mutés, 346 patients (46,7%) présentaient des mutations activatrices, 16 patients (2,2%) portaient des mutations de résistance et 10 patients (1,3%) avaient à la fois des mutations activatrices et de résistances du gène EGFR, les mutations les plus fréquentes chez la population asiatique étaient les délétions de l'exon 19 et la mutation ponctuelle L858R, observées chez (24,6%) et (22,8%) des patients, respectivement [385]. La distribution des mutations selon les exons dans notre série était similaire à celle généralement rapportée dans la littérature du Moyen-Orient et de l'Afrique [383]. Il a été bien rapporté que les délétions au niveau de l'exon 19 et la substitution L858R au niveau de l'exon 21 sont les fréquentes et représentent (85 %) de toutes les mutations du gène EGFR dans le CBNPC [386][387]. Les

délétions au niveau de l'exon 19 représentaient les mutations les plus fréquemment détectées dans cette étude (71,83%), les mutations de l'exon 21 qui regroupent les substitutions L858R et L861Q n'ont été observées que dans (18,30%) des cas, ce qui est conforme à ce qui a été rapporté dans une grande étude multicentrique réalisée sur une population asiatique qui comporte 1020 adénocarcinomes pulmonaires, la prévalence des délétions de l'exon 19 était (51,0%) supérieure à celle retrouvée pour l'exon 21 (42,0%) [123]. De même, Gaur et al ont signalé une fréquence des délétions de l'exon 19 (79,13%) plus élevée que celle observée pour l'exon 21 (20,83%) [388]. Dans une étude menée sur une large série caucasienne, la fréquence des mutations EGFR était de (9,8%), représentée essentiellement par les délétions de l'exon 19 (61,9%) et les mutations ponctuelles de l'exon 21 (33,1%) [389]. Une discordance a été observé par Zhou et al [384], dans une étude incluant 219 adénocarcinomes qui a montré une fréquence de mutation de (54,9%) pour la substitution L858R de l'exon 21 et (36%) pour les délétion au niveau de l'exon 19. Une fréquence des mutations de l'exon 21 supérieure aux délétions de l'exon 19 a été également observée dans une étude Coréenne réalisée sur 153 patients atteints d'un adénocarcinome pulmonaire [390].

III.1.3 Mutation rare :

Autre que les mutations fréquentes, il existe d'autres mutations dites peu communes ou rares du gène EGFR dont les caractéristiques clinicopathologiques et la réponse aux ITKs ne sont pas claires. En raison du nombre limité des patients présentant les mutations peu communes, l'incidence des mutations rares du gène EGFR varie d'une étude à l'autre. À notre connaissance, cette étude fait référence à la première étude menée sur une population marocaine sur les mutations rares d'EGFR. Dans cette étude, 13 mutations rares ont été détectées dans une série de 302 échantillons du CBNPC, représentant (4,30%) de toutes les tumeurs testées et/ou (18, 31%) de toutes les tumeurs EGFR mutées. Dans une étude récente réalisée en France, l'incidence des mutations rares chez 6 747 patients était de (11,6 %) de toutes les mutations détectées [391]. Une prévalence plus élevée de mutation non classique d'EGFR a été signalée par Arrieta et al, qui ont trouvé une fréquence de (20,5 %) de mutations rares [134]. Dans une étude asiatique, Zhang et al, ont rapporté une très faible prévalence (2,66%) de mutations rares [392]. Cependant, dans une autre base de données asiatique, une incidence plus élevée de mutations rares (14,14%) a été rapportée [393]. La prévalence clinique et la signification des mutations concomitantes du gène EGFR n'ont pas encore été entièrement déterminées. Dans une grande cohorte taïwanaise, près de (7 %) des tumeurs de CBNPC EGFR mutées présentaient des mutations complexes (la G719X de l'exon

18, les délétions de l'exon 19 et les L858R et L861Q de l'exon 21 en co-mutation avec une autre mutation du gène EGFR) [394]. D'autres auteurs ont montré une incidence de (14 %) de mutations composées chez 79 patients atteints d'un CBNPC présentant des mutations EGFR [395]. Cependant, la prévalence la plus élevée de mutations composées du récepteur à l'EGF est de (24,6 %), a été rapportée par Kim et al, dans une étude portés sur 61 tumeurs présentant une mutation EGFR [396]. Il convient de noter que deux patients présentant des mutations composées au niveau du gène EGFR ont été identifiés dans notre étude. Ces cas constituent 0,66% (2 sur 302) de l'ensemble de la série, et 2,89% (2 sur 69) du groupe de tumeurs avec EGFR muté. La sensibilité des tests moléculaires utilisés dans le diagnostic de routine peut influencer l'incidence des mutations rares du gène EGFR rapportée dans différentes études. Par conséquent, afin d'explorer cette entité rare, les méthodes de dépistage devraient être améliorées dans l'avenir.

Dans cette étude, la substitution S768I au niveau de l'exon 20 était la plus fréquente des mutations rares du gène EGFR, représentant (0,99 %) de toutes les tumeurs testées, dont deux étaient des mutations uniques et une couplée à la mutation ponctuelle L858R. Leventakos et al ont examiné la mutation S768I chez 1527 patients atteints de CBNPC, cette dernière a été révélée chez neuf cas (0,59 %), dont six étaient des mutations concomitantes et trois représentaient une mutation S768I unique [397]. Les insertions de l'exon 20 sont décrites comme le type de mutation du gène EGFR le plus fréquent après les mutations classiques, avec une prévalence comprise entre 4 et 10 % de toutes les mutations EGFR [122][398][399]. Dans cette étude, la fréquence des insertions de l'exon 20 était de (3,27 %), cette prévalence était légèrement inférieure à celle rapporté dans la littérature. La mutation ponctuelle L861Q de l'exon 21 a représenté (3,27 %) de toutes les mutations détectées, ce qui est conforme aux études précédentes [400][401]. Les insertions de l'exon 19 ont été identifiées chez deux patients (3,27 %). Ce type de mutation est rarement décrit dans la littérature et représente environ 2 % des altérations de l'exon 19 et 1 % de toutes les tumeurs du CBNPC EGFR mutées [402].

III.1.4 Corrélation entre les caractéristiques clinicopathologiques, survie et les mutations EGFR :

Plusieurs études cliniques antérieures ont rapporté une fréquence des mutations EGFR plus élevée chez les patients asiatiques, femmes, non-fumeurs et dont les tumeurs portent l'histologie d'adénocarcinome [384][403][404][405]. L'association entre les mutations EGFR et les caractéristiques clinicopathologiques et histologiques des patients marocains atteints

d'un CBNPC a été étudiée dans la présente étude. Nos résultats confirment ce qui a été déjà rapporté dans la littérature [384][403][404][405][406]. Chez les Asiatiques, l'incidence des mutations EGFR est plus élevée chez les femmes que chez les hommes (61,1 % versus 44%), et chez les personnes n'ayant jamais fumé que chez les fumeurs (60,7 % et 31,4 % respectivement) [406]. De plus, au Japon, 30 % des patients atteints d'un CBNPC dont les tumeurs présentaient une mutation au niveau du gène EGFR étaient de sexe masculin ou des fumeurs [407]. En revanche, un pourcentage plus faible de femmes a été démontré au Moyen-Orient [383]. Dans notre série, comme prévu les mutations du gène EGFR tendent à être plus fréquentes chez les femmes que chez les hommes (36,58 % contre 17,72%, p=0,001) et chez les non-fumeurs que chez les fumeurs (67,18% contre 32,22%, p<0,0001), la majorité des non-fumeurs étaient susceptibles d'être plutôt de sexe féminin. Ces profils et prévalences sont conformes aux résultats d'études antérieures menées en Asie en Europe et en Amérique [384][403][404][405]. La fréquence des mutations EGFR chez les patients atteints d'un CBNPC était plus élevée chez les femmes que chez les hommes : Europe, 22 % vs 9 % ; Asie-Pacifique, 60 % vs 37 % ; sous-continent indien, 31 % vs 23 % ; Afrique, 48 % vs 8 % ; et Amérique du Nord, 28 % vs 19 %, et chez les non-fumeurs par rapport à ceux qui ont déjà fumé : Europe, 35% vs 8% ; Asie-Pacifique, 64% vs 33% ; sous-continent indien, 32% vs 17% ; Afrique, 41% vs 6% ; et Amérique du Nord, 47% vs 14% [377]. Bien qu'une étude tunisienne a montré que les mutations EGFR étaient détectées chez 43,7% des patients de sexe masculin, tous des fumeurs de plus de 40 paquets-année, cette discordance peut être expliquer par le pourcentage élevé de fumeurs en Tunisie (35% de la population) [408]. L'association entre les mutations positives du gène EGFR et l'âge est largement controversée dans la littérature. Différents seuils d'âge (60, 62, 65ans) ont été choisis par différentes études pour diviser les patients atteints d'un CBNPC en groupes d'âge plus ou moins élevés, mais conformément à nos résultats, plusieurs études ont montré qu'il n'existe pas de différence significative entre l'âge et la présence d'une mutation EGFR [409][410][411]. Conformément à ce qui a été rapporté par Wang et al [412], l'âge médian des groupes EGFR muté et sauvage était presque semblable. Bien que la mutation au niveau du gène EGFR soit un événement précoce bien connu dans la carcinogenèse du CBNPC, aucune corrélation significative entre le stade de la maladie et la mutation de l'EGFR n'a été révélée. Cela pourrait s'expliquer par le fait que la majorité des patients ont été diagnostiqués à un stade IV.

La corrélation entre les sous-types histologiques d'adénocarcinome pulmonaire et les mutations du gène EGFR a été largement étudiée [413][414][415][416][417]. Cependant, la

plupart des études ont été réalisées que sur des prélèvements tumoraux issues d'une résection chirurgicale. Pour les patients présentant une maladie avancée, le diagnostic est le plus souvent réalisé sur une biopsie de petite taille, de ce fait, les caractéristiques histologiques de la mutation EGFR pour les adénocarcinomes pulmonaires avancés inopérables ne sont pas encore bien définies. La classification 2015 de l'OMS a proposé une nouvelle sous-classification des adénocarcinomes pulmonaires pour les prélèvements biopsiques (non réséqués), ce qui a fourni un nouvel outil puissant pour la caractérisation de la pathologie tumorale et une gestion appropriée [365].

Certaines études ont décrit que les patients dont les tumeurs présentaient une architecture papillaire, micropapillaire et lépidique étaient plus fréquemment porteurs d'une mutation du gène EGFR que les autres sous-types [417][418][419]. Tsuta et al ont rapporté une corrélation positive entre les mutations EGFR et l'adénocarcinome à prédominance papillaire et une corrélation négative avec l'adénocarcinome à prédominance solide [420]. Dans une cohorte d'adénocarcinomes pulmonaires provenant de patients asiatiques, Li et al, ont montré une fréquence significativement plus élevée de mutation EGFR dans les adénocarcinomes à prédominance micropapillaire (84,6 %) [418]. Warth et al, ont rapporté une prévalence plus élevée dans les adénocarcinomes à prédominance lépidique et micropapillaire dans une cohorte caucasienne non sélectionnée [419].

Selon la nouvelle classification, Campos-Parra et al, ont signalé une corrélation significative entre les mutations EGFR et la présence d'une composante acinaire ou lépidique dans 313 échantillons tissulaires d'ADKs pulmonaires obtenus par biopsie [421]. Dans une série de 186 échantillons, dont 135 étaient des biopsies de petites tailles et 51 étaient des échantillons cytologiques, Maturu et al ont montré une fréquence plus élevée des mutations EGFR dans le sous-type à prédominance lépidique et une corrélation négative avec l'adénocarcinome à prédominance solide [422]. Cependant, Weng et al ont trouvé une prévalence plus élevée dans les adénocarcinomes moyennement différenciés (ADK acinaire ou papillaire) [127].

La corrélation entre les mutations EGFR et les sous-types histologiques d'adénocarcinome primitif pulmonaire confirmé sur des prélèvement issus des sites métastatiques a été rapportée pour la première fois par Clay et al. Cette étude a été réalisée sur 100 échantillons prévenant des tumeurs métastatiques, les mutations EGFR ont été le plus souvent détectées dans les tumeurs d'architecture acinaire et micropapillaire et rarement dans les tumeurs d'architecture solide [423]. Des résultats similaires ont été rapportés dans une série de 59 échantillons de

métastases cérébrales, le gène EGFR sauvage (Wild Type) était significativement plus fréquent dans les cas avec prédominance solide par rapport aux sous-types acinaire et papillaire [424].

En accord avec nos résultats, dans une étude menée sur 356 biopsies et 3 résections, Kim et al, ont rapporté que les patients présentant une architecture papillaire, lépidique et acinaire étaient plus susceptibles de présenter une mutation positive du gène EGFR [425]. Dans notre série, le sous-type histologique d'adénocarcinome pulmonaire basé sur la classification de l'OMS 2015 a été réalisé chez 196 patients. Nos résultats ont montré que les mutations EGFR étaient plus fréquemment retrouvées dans le sous type à prédominance acinaire, suivi du papillaire, lépidique et solide. Les mutations EGFR caractérisaient spécifiquement les sous types papillaire et acinaire que les autres. Une corrélation significative a été observée entre les mutations EGFR et l'architecture acinaire et papillaire et une association négative avec le sous-type solide.

Des résultats similaires ont été rapportés par Wang et al, qui ont montré que la mutation du gène EGFR était significativement corrélée à la présence d'une composante acinaire et/ou papillaire dans une série de 395 échantillons réséqués [426]. Contrairement à ce qui a été rapporté par Campos-Parra et al, Maturu et al, et Kim et al, dans notre étude une faible fréquence des mutations EGFR a été observée dans le sous-type à prédominance lépidique. Cette discordance peut s'expliquer par le fait qu'il n'y avait que deux adénocarcinomes d'architecture lépidique dans notre série, et que l'un des deux présentait une délétion de l'Exon 19 E746-A750del. Les résultats de cette étude suggèrent que le taux des mutations EGFR varie non seulement en fonction de la région géographique, des facteurs démographiques et de l'ethnicité, mais aussi en fonction des sous-types histologiques.

Dans une grande variété de cancers, l'infiltration lymphocytaire tumorale est considérée comme l'un des facteurs les plus importants du pronostic [427]. Dans le CBNPC, la présence de la mutation de l'EGFR est impliquée dans la modification du microenvironnement tumoral [428].

Feng et al ont trouvé une association significative entre l'infiltrat lymphocytaire faible et la présence d'une mutation EGFR [428]. Contrairement à ce qui a été rapporté par Feng et al, dans notre série, le nombre de patients EGFR muté qui présentaient une infiltration lymphocytaire modérée était plus élevé que celui observé dans le groupe WT (50% contre

34,1%). Cette différence peut être expliquer par l'utilisation de différentes méthodes de scoring ou de différents types d'échantillons (biopsie vs résection chirurgicale).

L'association significative entre l'expression de l'anticorps anti-TTF1 et la présence d'une mutation EGFR chez les patients atteints d'un CBNPC a été bien démontrée par la méta-analyse de Su Kim et al ($p < 0,00001$) [429]. Chen et al, ont rapporté que les délétions au niveau de l'exon 19 et/ou les mutations ponctuelle au niveau de l'exon 21 étaient significativement associées à une forte expression positive de l'anticorps anti-TTF1 [430]. Dans notre série presque tous les patients 98% dont les tumeurs étaient EGFR mutés présentaient une expression positive du TTF1 avec une valeur p significative ($p<0,0001$), ce qui est en accord avec ce qui a été rapporté par Nakra et al, Shanzhi et al, Kahr et al, et Sheffield et al, [431][432][389][433].

Puisque les délétions de l'exon 19 et la mutation L858R représentaient les types de mutation les plus fréquentes du gène EGFR, nous avons également examiné dans cette étude les différences clinicopathologiques entre les patients avec une délétion de l'exon 19 et avec la mutation L858R. La différence des caractéristiques clinicopathologiques entre les patients présentant une délétion au niveau de l'exon 19 et ceux avec une mutation L858R du gène EGFR et les patients avec EGFR WT est rarement étudiée. Jackman et al, n'ont rapporté aucune différence significative dans les caractéristiques telles que le sexe, le statut tabagique et l'histologie entre les délétions exon 19 et la mutation L858R [434]. Des résultats similaires ont été signalés par Gregory et al, cependant, l'âge médian des patients du groupe L858R était plus élevé que celui des patients du groupe exon 19 délété [435]. Conformément aux études précédentes [434][435], aucune différence significative n'a été observée entre les deux mutations et le sexe par contre une association significative a été révélée entre le statut non-fumeur et la présence d'une délétion exon 19 et/ou une mutation L858R. De façon intéressante la présente étude a pu également démontrée que la prévalence des patients âgés de plus de 60 ans était significativement plus élevée dans le groupe portant la substitution L858R que dans le groupe avec exon 19 délété. Sur le plan histologique, plusieurs études ont rapporté que la présence d'une mutation au niveau de l'exon 21 est significativement corrélée à la présence d'une architecture lépidique, tandis que les délétions au niveau de l'exon 19 sont plus fréquentes dans les tumeurs présentant le sous-type papillaire [390][436]. Dans notre étude, une association significative a été observée entre les délétions de l'exon 19 et l'adénocarcinome à prédominance papillaire, mais aucune corrélation significative n'a été

détectée entre les mutations au niveau de l'exon 21 et les différents sous-types histologiques d'adénocarcinome pulmonaire.

Le développement des inhibiteurs de tyrosine kinase (ITK) du récepteur du facteur de croissance épidermique, et l'identification systématique des mutations du gène du récepteur du facteur de croissance épidermique ont révolutionnés le traitement et le pronostic du cancer de poumon [384]. La prise en charge du CBNPC non épidermoïde consiste dans sa première étape à la recherche d'une signature moléculaire accessibles à une thérapie ciblée. En l'absence de mutation ou d'impossibilité de rechercher les anomalies moléculaires (EGFR, ALK, ROS1 etc), le traitement de référence reste la chimiothérapie, si l'état général le permet. Des essais cliniques randomisés antérieurs ont montré que les inhibiteurs de la tyrosine kinase d'EGFR ont prouvé leurs efficacités pour augmenter le taux de survie, prolonger la durée de vie et améliorer la qualité de vie par rapport à la chimiothérapie standard chez les patients atteints d'un CBNPC avancé avec une mutation EGFR [437][438].

Cette étude est la première à évaluer l'association entre les mutations du gène EGFR et la survie et le pronostic chez les patients atteints d'un CBNPC dans l'Afrique. D'après nos résultats, on peut conclure que les mutation EGFR ont été significativement liées à une survie globale plus longue et un bon pronostic par rapport au statut EGFR sauvage. L'association entre le statut mutationnel du gène EGFR et la survie est difficile à estimer, en dehors d'un cadre d'essai clinique, notamment en raison des différentes lignes de traitement et le croisement des thérapies [439].

À l'exception d'une étude prospective randomisée qui a démontré un bénéfice net en terme de la survie globale (SG) pour les patients présentant une mutation EGFR traités par les inhibiteurs de tyrosine kinase d'EGFR par rapport à la chimiothérapie (uniquement dans le sous-groupe présentant une délétion au niveau de l'exon-19) [440], tous les autres essais n'ont pas réussi à montrer l'association entre les mutations EGFR et la survie globale dans le cancer du poumon. Deux méta-analyses d'essais incluant ces patients n'ont pas pu montrer de bénéfice en termes de survie globale pour les patients EGFR mutés traité par les ITKs d'EGFR [441][442]. Cependant, plusieurs analyses rétrospectives ont pu montrer une survie plus longue chez les patients porteurs d'une mutation EGFR et traités par des ITKs d'EGFR [435][443]. La plupart des études rétrospectives manquent de données validées sur les régimes de traitement réellement administrés et présentent de divers biais méthodologiques.

Dans notre série les patients EGFR mutés traités par les ITKs avaient une survie globale supérieure à celle observée chez ceux avec EGFR WT traités par la chimiothérapie. Le même résultat a été retrouvé dans une cohorte de 3062 patients atteints d'un cancer de poumon non à petites cellules métastatique, les cas présentant des mutations somatiques au niveau du gène EGFR traités par les ITKs d'EGFR ont rapporté une survie globale cliniquement et statistiquement significatif supérieure par rapport aux cas présentant un EGFR de type sauvage qui ont reçu une chimiothérapie [444]. La médiane de survie globale chez les cas avec EGFR muté était supérieure à celle du groupe WT. Le même résultat a été observé dans une étude réalisée sur une série caucasienne de 285 patients atteints d'un CBNPC, une survie globale plus longue a été significativement révélée chez les patients avec EGFR mutés que chez ceux avec EGFR wild type [445]. De même dans une cohorte asiatique composée de 424 cas, Zheng et al, ont constaté que les patients présentant une mutation EGFR avaient une durée de survie significativement plus longue par rapport à ceux portant un satut EGFR sauvage [446].

III.2 La translocation ALK :

L'ALK est un récepteur transmembranaire à activité tyrosine kinase, qui a été identifié comme un gène de fusion dans le cancer du poumon, le lymphome anaplasique à grandes cellules, le cancer colorectal, etc. la translocation ALK-EML4 représente le réarrangement le plus fréquent dans le cancer de poumon, c'est une mutation déterminante dans le développement du ce type de cancer [447]. Malgré les preuves substantielles liant l'activation du gène ALK à la genèse de la tumeur dans ces cancers rares, il est juste de dire que l'enthousiasme actuel considérable pour le gène ALK en tant que cible pour le traitement du cancer est largement motivé par la découverte relativement récente d'une translocation récurrente du gène ALK dans un sous-groupe distinct de CBNPC. Le réarrangement ALK-EML4 possède une puissante activité oncogène à la fois in vitro et in vivo [447]. Cette activité peut être efficacement bloquée par des petites molécules inhibitrices de la tyrosine kinase qui ciblent le gène ALK. Les ITKs d'ALK ont montré un bénéfice significatif dans la prise en charge du CBNPC ALK-positif par rapport à la chimiothérapie classique [448].

III.2.1 Fréquence du réarrangement ALK :

Des études européennes et américaines antérieures ont rapporté que la fréquence de la fusion ALK chez les patients atteints d'un CBNPC varie entre ~2% jusqu'à 13% [449][213][194][192][450][451]. La présente étude est à notre connaissance parmi les premières de son genre à rapporter la fréquence du réarrangement ALK et de déterminer les

caractéristiques cliniques, pathologiques et moléculaires des patients dont les tumeurs sont ALK positifs dans la population Marocaine. Dans notre série, le réarrangement ALK était présent chez 3 patients sur 69 soit une prévalence de 4,34%, ce qui est comparable aux données d'une série Marocaine (EMPLACEMENT) portée sur 120 patients atteints d'un cancer bronchique non à petites cellules publiée récemment [452].Le même pourcentage a également été observé dans une grande cohorte chinoise composée de 1688 patients [453]. Cette fréquence se situe globalement entre les fréquences rapportés par les études asiatiques [454][455][451]. Cependant, cette prévalence est inférieure à celle trouvée dans deux études tunisiennes antérieures qui ont signalé une fréquence de réarrangement ALK de 5,2 et 9,09 %, respectivement [456][457]. Une incidence de 8,7% a été retrouvée dans une étude épidémiologique rétrospective, transversale et non interventionnelle visant à étudier la prévalence du réarrangement ALK chez les patients atteints du CBNPC dans la région MENA, avec la fréquence la plus élevée observée en Egypte 19,6% et plus faible signalée en Liban 2,2%. Cette étude suggère que la fréquence du réarrangement ALK pourrait être plus élevée dans la région MENA que dans d'autres régions géographiques [458].

III.2.2 Corrélation entre le réarrangement ALK et les caractéristiques clinicopathologiques et la survie des patients :

Des études épidémiologiques antérieures ont montré que les patients atteint d'un CBNPC avec un réarrangement du gène ALK présentaient des caractéristiques cliniques particuliers. Cette translocation tend souvent à se produire chez les patients jeunes, non-fumeurs ou ex-fumeurs légers et dont la tumeur présente une histologie d'adénocarcinome plutôt qu'un carcinome épidermoïde ou à grandes cellules [451][459].

La tranche d'âge des patients ayant subi une translocation ALK est généralement inférieure à celle des patients atteints d'un CBNPC et même plus jeune que celle observée chez la population présentant une mutation EGFR [460]. Dans notre série, les patients marocains avec ALK positif étaient plus jeunes que ceux avec ALK négatif, bien que cette différence n'était pas statistiquement significative, probablement en raison de la petite taille de l'échantillon des patients ALK positifs. Image semblable a été signalée par Wang et al, qui ont montré un âge plus jeune pour le groupe avec une translocation ALK par rapport au groupe ALK négatif [461]. Dans une étude réalisée sur une cohorte de 6576, Xia et al, ont rapporté que les cas présentant une translocation au niveau du gène ALK étaient plus jeunes que ceux avec ALK négatif [462]. De même Fan et al, ont signalé dans une méta-analyse une corrélation statistiquement significative entre la présence d'une translocation ALK et un âge des patients

<60 (jeune) [463]. Par contre, une étude marocaine récente a montré que les patients marocains avec ALK positif étaient plus âgés que ceux avec ALK négatif [452]. Cependant, ces résultats sont basés sur un nombre limité de patients par rapport aux grandes études publiées, ce qui ne permet pas de conclure à une réelle discordance avec la plupart des publications disponibles sur l'âge et le statut ALK.

La corrélation entre le sexe et statut ALK est hétérogène dans les données de la littérature. Xia et al, [462] et Zhou et al [454] ont montré un taux plus élevé d'ALK positif chez les femmes, tandis que Chia et al, [464] et Shaw et al, [465] ont trouvé plus d'ALK positifs chez les hommes que chez les femmes. Aucune corrélation significative n'a été révélée entre le sexe et le statut ALK transloqué chez la population occidentales et la région MENA [463][458], alors que chez une population asiatique la présence d'un réarrangement ALK était significativement lié au sexe féminin [466]. En concordance avec ce qui a été rapporté par Xia et al, et Zhou et al, la présente étude a montré une fréquence des cas ALK transloqué plus élevée chez les femmes que chez les hommes. Image différente à celle retrouvée dans une étude marocaine ou tous les patients ALK positifs étaient des hommes, sans différence significative selon le sexe, ce qui est probablement dû au fait que les hommes étaient plus nombreux que les femmes dans cette population d'étude [452].

Les résultats concernant la relation entre le statut tabagique et la fusion ALK sont contradictoires dans la littérature. Plusieurs études ont montré que les patients atteints d'un CBNPC présentant un réarrangement ALK étaient plus susceptibles d'être des non-fumeurs [463][467]. Zao et al, ont également confirmé dans une grande cohorte asiatique que les réarrangements d'ALK étaient plus fréquents chez les personnes n'ayant jamais fumé que chez ceux ayant déjà fumé [466]. De même une association significative entre le statut ALK positif et le statut non-tabagique a été montré dans une méta-analyse incluant 167 études épidémiologiques [468]. Nos résultats concordent avec ce qui a été déjà rapporté, les patients ALK positifs étaient plus susceptibles d'être des non-fumeurs avec une différence proche de la signification (p=0,08), ce qui est en cohérence avec plusieurs rapports de la littérature [461][460][469]. Cependant, d'autres étude montrent que les personnes n'ayant jamais fumé présentaient un faible taux de réarrangements ALK par rapport aux fumeurs parmi les patients atteints de CBNPC [463][470][471].

Sur le plan histologique, la valeur prédictive des caractéristiques pathologiques et morphologiques dans la détection des tumeurs ALK réarrangé ont été rapporté par plusieurs

études. Bien que les résultats de ces études n'étaient pas cohérents en raison du nombre limité des tumeurs ALK réarrangées, il est connu que l'architecture solide et cribriforme sont associés au statut ALK transloqué [472][473][474][37][475]. Dong et al, ont rapporté une association significative entre le réarrangement ALK et la structure cribriforme (P<0,0001), les cas ALK réarrangés étaient plus fréquents dans le sous-type solide avec production de mucine (P=0,002) et moins fréquents dans le sous-type papillaire (P=0,004). Les tumeurs ALK-positives étaient également caractérisées par la présence de cellules de bague à chaton et d'adénocarcinome avec la production de mucine [476]. Kim et al, ont signalé que les ADCs pulmonaires ALK réarrangés étaient associés de manière significative au sous-type à prédominance solide [460]. Une autre étude a montré que l'existence d'une composante mucineuse mineure était indépendamment associée à une prévalence relativement élevée de réarrangement ALK [416]. Dans notre série, aucune corrélation significative entre la présence d'une translocation ALK et les différents sous-types histologiques d'adénocarcinome pulmonaire n'a été révélée, cela peut être expliquer par la petite taille d'échantillon, cependant l'architecture cribriforme et solide ont été détectées dans 66,7% des cas ALK-positifs. De même, Yoshida et al, ont montré que les sous-types solide et mucineux cribriforme ont été examinés dans 43 et 56% des cas ALK-positifs, respectivement [474].

Le statut de mutation EGFR et le réarrangement ALK sont mutuellement exclusifs [477]. Aucune coexistence d'un réarrangement d'ALK et d'une mutation EGFR n'a été détectée dans notre série, ce qui est similaire au schéma mutationnel mutuellement exclusif largement rapporté [478][477]. Cependant, des grandes études récentes ont rapporté une fréquence plus élevée de la coexistence du réarrangement ALK chez les patients atteints d'un CBNPC, en particulier ceux qui présentent des mutations EGFR [479][480].

Le gène de fusion EML4-ALK possède une puissante activité oncogène, tant in vivo qu'in vitro [5][481], ce qui peut entraîner un mauvais pronostic du CBNPC. Cependant, plusieurs études publiées montrent des résultats contradictoires quant à la valeur pronostique du réarrangement ALK dans le CBNPC [482][483][484][214][470][485]. Tantraworasin et al, [486], Liu et al, [487] et Fukui et al, [470] ont démontré que la présence d'une translocation ALK n'a pas un effet sur le pronostic des patients. À l'inverse, d'autres rapports ont révélé une survie sans rechute plus courte chez les patients atteints d'un CBNPC avec réarrangement ALK [482][488][489]. De même, Blackhall et al. ont signalé une survie globale et une survie sans rechute supérieures chez les patients atteints d'un CBNPC et positifs pour ALK [490]. Takeda et al. ont rapporté une SG médiane de 15,7 mois pour les cas ALK-positifs et 15,2

mois pour les cas ALK-négatifs [491]. Wang et al. ont signalé une médiane de survie globale de 19,27 mois dans 9 cas ALK-positifs et 18,93 mois dans 45 cas ALK-négatifs [461]. Martinez et al. ont rapporté une médiane de survie globale de 4,5 mois pour les cas ALK-négatifs (n=65) contre une médiane de SG non atteinte pour 7 cas ALK-positifs [492]. Dans notre série, le groupe ALK positif a présenté une médiane de survie globale de 15 mois et qui est inférieure à celle du groupe ALK négatif (21 mois). Comme a été montré par nos résultats, aucune différence statistiquement significative n'a été retrouvée pour la médiane de la SG entre les groupes ALK positif et négatif dans toutes ces études [491] [461] [492].

Conclusion et perspectives

Conclusion :

Le cancer du poumon est la première cause de mortalité par cancer dans le monde. Les carcinomes broncho-pulmonaires non à petites cellules (CBPNPC) et en particulier les adénocarcinomes représentent le type histologique le plus fréquent. Grace aux avancées technologiques la prise en charge des adénocarcinomes pulmonaires a profondément changé durant les 10 dernières années, passant de la chimiothérapie conventionnelle au thérapies individuelles basées sur les caractéristiques histologiques et moléculaires de ces tumeurs. Les mutations EGFR représentent l'anomalie moléculaire la plus fréquente et la plus caractérisée dans le CBNPC. La présence d'une mutation EGFR est corrélée à une réponse majeure aux inhibiteurs de tyrosine kinase (ITK) de l'EGFR. Une autre protéine a été révélée corrélé à la réponse aux ITKs est la protéine de fusion impliquant le gène ALK (anaplastic lymphoma kinase) et le gène EML4 (echinoderm microtubule associated protein like 4).

Ce travail a permis de déterminer le profil moléculaire du CBNPC (les mutations EGFR et la translocation ALK), de dégager les caractéristiques des patients porteurs de ces anomalies moléculaires et de suivre leur évolution. Pour se faire les facteurs pris en considération sont les facteurs cliniques, histologiques et immunohistochimiques.

Aujourd'hui, les patients atteints d'un CBNPC métastatique avec EGFR muté disposent d'une variété d'agents ciblant le gène EGFR qui ont fait preuve pour traiter cette maladie. Dans notre étude la présence d'une mutation EGFR a été détectée chez 23,50% des cas et tendent à

être plus fréquentes chez les femmes que chez les hommes et chez les non-fumeurs que chez les fumeurs, la majorité des non-fumeurs étaient susceptibles d'être plutôt de sexe féminin. Sur le plan histologique, une corrélation significative a été observée entre les mutations EGFR et l'architecture acinaire et papillaire et une association négative avec le sous-type solide. Pour les marqueurs immunohistochimiques, presque tous les patients 98% dont les tumeurs étaient EGFR mutés présentaient une expression positive du TTF1. La médiane de survie globale chez les cas avec EGFR muté était supérieure à celle du groupe WT.

Le réarrangement ALK-EML4 possède une puissante activité oncogène à la fois in vitro et in vivo. Cette activité peut être efficacement bloquée par des petites molécules inhibitrices de la tyrosine kinase qui ciblent le gène ALK. Les ITKs d'ALK ont montré un bénéfice significatif dans la prise en charge du CBNPC ALK-positif par rapport à la chimiothérapie classique. Dans notre série, une prévalence de 4,34% a été observée pour la translocation ALK. Aucune corrélation significative entre la présence d'une translocation ALK et les différents paramètres clinicopathologiques, histologiques et immunohistochimiques d'adénocarcinome pulmonaire n'a été retrouvée. Cependant, les patients avec ALK positif étaient plus susceptibles d'être jeunes, de sexe féminin et non-fumeurs. De même, pour la survie globale, aucune différence significative n'a été retrouvée pour la médiane de la SG entre les groupes ALK positif et négatif. Ces résultats non significatifs peuvent être expliquer par la petite taille d'échantillon.

Perspectives :

Le cancer bronchique non à petites cellules est l'un des cancers les plus mortels au monde. Le pronostic demeure redoutable si la maladie dépasse le stade où la chirurgie est une option viable. Au cours de la dernière décennie, plusieurs traitements ciblés ont été approuvés pour le traitement du cancer bronchique non à petites cellules, et d'autres sont en cours de développement.

Par la présente étude, la détection des mutations EGFR et du réarrangement d'ALK ont permis d'identifier les patients susceptibles de bénéficier d'une thérapie ciblée. En outre, aujourd'hui le domaine de recherche en oncologie thoracique est en pleine expansion, les dernières recommandations des sociétés savantes consistent à un dépistage moléculaire des biomarqueurs EGFR, ALK, KRAS, ROS1, BRAF, NTRK1/2/3, MET, RET et PD-L1 pour les patients atteints d'un CBNPC. Comme perspective, il faut inclure tous ces biomarqueurs prédictifs de la réponse aux traitements.

Pour ce faire et vu les contraintes liées aux testing moléculaire du CBNPC (prélèvements biopsiques, contenu tumoral limité, le nombre croissant de cibles moléculaires etc.), il faut utiliser des techniques sensibles, rapides et fiables. L'instauration de nouvelles techniques plus sensibles et spécicifiques comme le séquençage de nouvelle génération peuvent étre une perspective utilisée afin de surmonter les limites et les challenges du diagnostic moléculaire du cancer bronchique non à petites cellules.

La mise en place d'une telle technique nécessite une réunion de concertation pluridisciplinaire moléculaire impliquant des spécialistes de différents domaines tels que les pathologistes moléculaires, les oncologues et les bio-informaticiens. Cette réunion permettra d'établir un protocole standardisé pour l'analyse NGS, ainsi que pour l'interprétation des résultats en cohérence avec les données cliniques et histologiques du patient.

Référence :

[1] "Epidemiology of lung cancer: a century of great success and ignominious failure," *Textb. Lung Cancer*, pp. 26–35, Mar. 2008, doi: 10.3109/9781439802014-7.

[2] Globocan, "Morocco," *Wolrd Heal. Organ. Int. Agency Res. Cancer*, 2020.

[3] M. Ilie *et al.*, "Les méthodes de séquençage de « nouvelle génération » (NGS) et le cancer broncho-pulmonaire: principales technologies, applications et limites actuelles en pathologie," *Rev. Francoph. des Lab.*, vol. 2014, no. 458, pp. 51–58, Jan. 2014, doi: 10.1016/S1773-035X(14)72315-9.

[4] S. Popat *et al.*, "Academia-Pharma Intersect Tyrosine Kinase Inhibitor Activity in Patients with NSCLC Harboring Uncommon EGFR Mutations: A Retrospective International Cohort Study (UpSwinG)," *Oncologist*, vol. 27, pp. 255–265, 2022, doi: 10.1093/oncolo/oyac022.

[5] M. Soda *et al.*, "Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer," *Nature*, vol. 448, no. 7153, pp. 561–566, Aug. 2007, doi: 10.1038/NATURE05945.

[6] K. C. Arbour and G. J. Riely, "Diagnosis and Treatment of ALK Positive NSCLC," *Hematol. Oncol. Clin. North Am.*, vol. 31, no. 1, p. 101, Feb. 2017, doi: 10.1016/J.HOC.2016.08.012.

[7] W. A. Cooper, D. C. L. Lam, S. A. O'Toole, and J. D. Minna, "Molecular biology of lung cancer," *J. Thorac. Dis.*, vol. 5 Suppl 5, no. Suppl 5, 2013, doi: 10.3978/J.ISSN.2072-1439.2013.08.03.

[8] J. Robert, "Signalisation cellulaire et cancer," *Signal. Cell. cancer*, 2010, doi: 10.1007/978-2-8178-0028-8.

[9] B. A. Weir *et al.*, "Characterizing the cancer genome in lung adenocarcinoma," *Nature*, vol. 450, no. 7171, pp. 893–898, Dec. 2007, doi: 10.1038/NATURE06358.

[10] W. Lee *et al.*, "The mutation spectrum revealed by paired genome sequences from a lung cancer patient," *Nature*, vol. 465, no. 7297, pp. 473–477, May 2010, doi: 10.1038/NATURE09004.

[11] W. Pao, A. J. Iafrate, and Z. Su, "Genetically informed lung cancer medicine," *J. Pathol.*, vol. 223, no. 2, pp. 231–241, 2011, doi: 10.1002/PATH.2788.

[12] S. S. Ramalingam, T. K. Owonikoko, and F. R. Khuri, "Lung cancer: New biological insights and recent therapeutic advances," *CA. Cancer J. Clin.*, vol. 61, no. 2, pp. 91–112, Mar. 2011, doi: 10.3322/CAAC.20102.

[13] D. Hanahan and R. A. Weinberg, "The hallmarks of cancer," *Cell*, vol. 100, no. 1, pp. 57–70, Jan. 2000, doi: 10.1016/S0092-8674(00)81683-9.

[14] M. Chevallier, M. Borgeaud, A. Addeo, and A. Friedlaender, "World Journal of Clinical Oncology Oncogenic driver mutations in non-small cell lung cancer: Past, present and future Conflict-of-interest statement," *World J Clin Oncol*, vol. 12, no. 4, pp. 217–237, 2021, doi: 10.5306/wjco.v12.i4.217.

[15] C. Bontoux, V. Hofman, P. Brest, M. Ilié, B. Mograbi, and P. Hofman, "Daily Practice Assessment of KRAS Status in NSCLC Patients: A New Challenge for the Thoracic Pathologist Is Right around the Corner," *Cancers (Basel).*, vol. 14, no. 7, p. 1628, Mar. 2022, doi: 10.3390/CANCERS14071628.

[16] X. Liu *et al.*, "Epidermal growth factor receptor (EGFR): A rising star in the era of precision medicine of lung cancer," *Oncotarget*, vol. 8, no. 30, pp. 50209–50220, Apr. 2017, doi: 10.18632/ONCOTARGET.16854.

[17] R. Rosell, N. Karachaliou, J. Wolf, and S. H. I. Ou, "ALK and ROS1 non-small-cell lung cancer: two molecular subgroups sensitive to targeted therapy," *Lancet Respir. Med.*, vol. 2, no. 12, pp. 966–968, Dec. 2014, doi: 10.1016/S2213-2600(14)70259-0.

[18] M. Duruisseaux and M. Esteller, "Lung cancer epigenetics: From knowledge to applications," *Semin. Cancer Biol.*, vol. 51, pp. 116–128, Aug. 2018, doi: 10.1016/J.SEMCANCER.2017.09.005.

[19] K. A. Houston, S. J. Henley, J. Li, M. C. White, and T. B. Richards, "Patterns in lung cancer incidence rates and trends by histologic type in the United States, 2004-2009," *Lung Cancer*, vol. 86, no. 1, pp. 22–28, Oct. 2014, doi: 10.1016/J.LUNGCAN.2014.08.001.

[20] G. D. Goss *et al.*, "Histologic and Genotypic Characterization of Lung Cancer in the Inuit Population of the Eastern Canadian Arctic," *Curr. Oncol.*, vol. 29, no. 5, pp. 3171–3186, Apr. 2022, doi: 10.3390/CURRONCOL29050258.

[21] S. Lantuéjoul, D. Salameire, and E. Brambilla, "Évolution de la classification histologique des cancers broncho-pulmonaires non à petites cellules Evolution of the histological classification of non-small-cell lung carcinoma," *La Lett. du Cancérologue •*, vol. 376, p. 6, 2011.

[22] W. D. Travis *et al.*, "International association for the study of lung cancer/american thoracic society/european respiratory society international multidisciplinary classification of lung adenocarcinoma," *J. Thorac. Oncol.*, vol. 6, no. 2, pp. 244–285, 2011, doi: 10.1097/JTO.0B013E318206A221.

[23] W. D. Travis *et al.*, "The 2015 World Health Organization Classification of Lung

Tumors: Impact of Genetic, Clinical and Radiologic Advances Since the 2004 Classification," *J. Thorac. Oncol.*, vol. 10, no. 9, pp. 1243–1260, Sep. 2015, doi: 10.1097/JTO.0000000000000630.

[24] M. L. G. Janssen-Heijnen and J. W. W. Coebergh, "The changing epidemiology of lung cancer in Europe," *Lung Cancer*, vol. 41, no. 3, pp. 245–258, Sep. 2003, doi: 10.1016/S0169-5002(03)00230-7.

[25] S. D. Stellman et al, "Risk of squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the lung in relation to lifetime filter cigarette smoking - PubMed," *Cancer*, vol. 80, no. 3, 1997, Accessed: Feb. 26, 2023. [Online]. Available: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9241071/.

[26] N. H. C. of the P. R. of China, "National guidelines for diagnosis and treatment of lung cancer 2022 in China (English version)," *Chinese J. Cancer Res.*, vol. 34, no. 3, p. 176, Jun. 2022, doi: 10.21147/J.ISSN.1000-9604.2022.03.03.

[27] O. Lababede and M. A. Meziane, "The Eighth Edition of TNM Staging of Lung Cancer: Reference Chart and Diagrams," *Oncologist*, vol. 23, no. 7, p. 844, Jul. 2018, doi: 10.1634/THEONCOLOGIST.2017-0659.

[28] W. D. Travis *et al.*, "The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors," *J. Thorac. Oncol.*, vol. 10, pp. 1243–1260, 2015, doi: 10.1097/JTO.0000000000000630.

[29] M. Noguchi and Y. Shimosato, "The development and progression of adenocarcinoma of the lung," *Cancer Treat. Res.*, vol. 72, pp. 131–142, 1995, doi: 10.1007/978-1-4615-2630-8_6.

[30] S. Lantuejoul, I. Rouquette, E. Brambilla, and W. D. Travis, "Nouvelle classification OMS 2015 des adénocarcinomes pulmonaires et prénéoplasies," *Ann. Pathol.*, vol. 36, no. 1, pp. 5–14, Jan. 2016, doi: 10.1016/J.ANNPAT.2015.11.010.

[31] C. Danel, J. Roussel, and A. Fabre, "Le rôle de l'anatomopathologiste en oncologie thoracique : classification, gestion des prélèvements," *Rev. des Mal. Respir. Actual.*, vol. 5, no. 5, pp. 325–330, Sep. 2013, doi: 10.1016/S1877-1203(13)70422-1.

[32] Y. Ding *et al.*, "Comparative study on the mutational profile of adenocarcinoma and squamous cell carcinoma predominant histologic subtypes in Chinese non-small cell lung cancer patients," 2019, doi: 10.1111/1759-7714.13208.

[33] S. Lantuéjoul, D. Salameire, and E. Brambilla, "Classification histologique des cancers broncho-pulmonaires non à petites cellules," *Rev. des Mal. Respir. Actual.*, vol. 3, no. 4, pp. 295–301, Sep. 2011, doi: 10.1016/S1877-1203(11)70112-4.

[34] E. A. Collisson *et al.*, "Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma," *Nature*, vol. 511, no. 7511, pp. 543–550, 2014, doi: 10.1038/NATURE13385.

[35] U. Testa, G. Castelli, and E. Pelosi, "Lung Cancers: Molecular Characterization, Clonal Heterogeneity and Evolution, and Cancer Stem Cells," *Cancers (Basel).*, vol. 10, no. 8, Aug. 2018, doi: 10.3390/CANCERS10080248.

[36] K. Inamura *et al.*, "EML4-ALK lung cancers are characterized by rare other mutations, a TTF-1 cell lineage, an acinar histology, and young onset," *Mod. Pathol.*, vol. 22, no. 4, pp. 508–515, Apr. 2009, doi: 10.1038/MODPATHOL.2009.2.

[37] M. Nishino *et al.*, "Histologic and cytomorphologic features of ALK-rearranged lung adenocarcinomas," *Mod. Pathol. 2012 2511*, vol. 25, no. 11, pp. 1462–1472, Jun. 2012, doi: 10.1038/modpathol.2012.109.

[38] C. Xiang *et al.*, "Distinct mutational features across preinvasive and invasive subtypes identified through comprehensive profiling of surgically resected lung adenocarcinoma," *Mod. Pathol. 2022*, pp. 1–12, May 2022, doi: 10.1038/s41379-022-01076-w.

[39] K. Inamura, "Update on Immunohistochemistry for the Diagnosis of Lung Cancer," *Cancers (Basel).*, vol. 10, no. 3, Mar. 2018, doi: 10.3390/CANCERS10030072.

[40] C. M. Jones, A. Brunelli, M. E. Callister, and K. N. Franks, "Multimodality Treatment of Advanced Non-small Cell Lung Cancer: Where are we with the Evidence?," *Curr. Surg. reports*, vol. 6, no. 2, Feb. 2018, doi: 10.1007/S40137-018-0202-0.

[41] D. Planchard *et al.*, "Updated version published 15 September 2020 by the ESMO Guidelines Committee Metastatic non-small cell lung cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up †," *Ann Oncol*, no. 4, pp. 192–237, 2018.

[42] Q. Gan and S. Roy-Chowdhuri, "Small but powerful: the promising role of small specimens for biomarker testing," *J. Am. Soc. Cytopathol.*, vol. 9, no. 5, pp. 450–460, Sep. 2020, doi: 10.1016/J.JASC.2020.05.001.

[43] U. Malapelle *et al.*, "Liquid Biopsy for Biomarker Testing in Non-Small Cell Lung Cancer: A European Perspective," *J. Mol. Pathol. 2021, Vol. 2, Pages 255-273*, vol. 2, no. 3, pp. 255–273, Aug. 2021, doi: 10.3390/JMP2030022.

[44] F. Penault-Llorca *et al.*, "Expert opinion on NSCLC small specimen biomarker testing — Part 1: Tissue collection and management," *Virchows Arch.*, vol. 1, pp. 1–16, Jul. 2022, doi: 10.1007/S00428-022-03343-2/FIGURES/2.

[45] C. Bosc *et al.*, "Rebiopsy during disease progression in patients treated by TKI for oncogene-addicted NSCLC," *Target. Oncol.*, vol. 10, no. 2, pp. 247–253, Jun. 2015, doi: 10.1007/S11523-014-0332-Y.

[46] O. Trédan *et al.*, "Molecular screening program to select molecular-based recommended therapies for metastatic cancer patients: Analysis from the ProfiLER trial," *Ann. Oncol.*, vol. 30, no. 5, pp. 757–765, May 2019, doi: 10.1093/annonc/mdz080.

[47] J. H. Schiller *et al.*, "Comparison of four chemotherapy regimens for advanced non-small-cell lung cancer," *N. Engl. J. Med.*, vol. 346, no. 2, pp. 92–98, Jan. 2002, doi: 10.1056/NEJMOA011954.

[48] F. Fossella *et al.*, "Randomized, multinational, phase III study of docetaxel plus platinum combinations versus vinorelbine plus cisplatin for advanced non-small-cell lung cancer: the TAX 326 study group," *J. Clin. Oncol.*, vol. 21, no. 16, pp. 3016–3024, Aug. 2003, doi: 10.1200/JCO.2003.12.046.

[49] D. H. Johnson, J. H. Schiller, and P. A. Bunn, "Recent clinical advances in lung cancer management," *J. Clin. Oncol.*, vol. 32, no. 10, pp. 973–982, Apr. 2014, doi: 10.1200/JCO.2013.53.1228.

[50] J. R. Brahmer *et al.*, "The Society for Immunotherapy of Cancer consensus statement

on immunotherapy for the treatment of non-small cell lung cancer (NSCLC)," *J. Immunother. cancer*, vol. 6, no. 1, Jul. 2018, doi: 10.1186/S40425-018-0382-2.

[51] D. S. Ettinger *et al.*, "Non–Small Cell Lung Cancer, Version 3.2022, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology," *J. Natl. Compr. Cancer Netw.*, vol. 20, no. 5, pp. 497–530, May 2022, doi: 10.6004/JNCCN.2022.0025.

[52] R. L. Siegel, K. D. Miller, H. E. Fuchs, and A. Jemal, "Cancer Statistics, 2021," *CA. Cancer J. Clin.*, vol. 71, no. 1, pp. 7–33, Jan. 2021, doi: 10.3322/CAAC.21654.

[53] R. L. Siegel, K. D. Miller, H. E. Fuchs, and A. Jemal, "Cancer statistics, 2022," *CA. Cancer J. Clin.*, vol. 72, no. 1, pp. 7–33, Jan. 2022, doi: 10.3322/CAAC.21708.

[54] M. Reck *et al.*, "Updated Analysis of KEYNOTE-024: Pembrolizumab Versus Platinum-Based Chemotherapy for Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer With PD-L1 Tumor Proportion Score of 50% or Greater," *J. Clin. Oncol.*, vol. 37, no. 7, pp. 537–546, 2019, doi: 10.1200/JCO.18.00149.

[55] T. Mok *et al.*, "Updated overall survival and final progression-free survival data for patients with treatment-naive advanced ALK-positive non-small-cell lung cancer in the ALEX study," *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.*, vol. 31, no. 8, pp. 1056–1064, Aug. 2020, doi: 10.1016/J.ANNONC.2020.04.478.

[56] S. FA *et al.*, "Erlotinib in previously treated non-small-cell lung cancer," *N. Engl. J. Med.*, vol. 353, no. 2, 2005, doi: 10.1056/NEJMOA050753.

[57] C. Lazzari *et al.*, "Historical Evolution of Second-Line Therapy in Non-Small Cell Lung Cancer," *Front. Med.*, vol. 4, no. JAN, p. 1, 2017, doi: 10.3389/FMED.2017.00004.

[58] R. Rosell and N. Karachaliou, "Large-scale screening for somatic mutations in lung cancer," *Lancet (London, England)*, vol. 387, no. 10026, pp. 1354–1356, Apr. 2016, doi: 10.1016/S0140-6736(15)01125-3.

[59] T. J. Lynch *et al.*, "Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib," *N. Engl. J. Med.*, vol. 350, no. 21, pp. 2129–2139, May 2004, doi: 10.1056/NEJMOA040938.

[60] R. R *et al.*, "Screening for epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer," *N. Engl. J. Med.*, vol. 361, no. 10, pp. 617–622, Jun. 2009, doi: 10.1056/NEJMOA0904554.

[61] C. Lazzari *et al.*, "Targeting ALK in patients with advanced non small cell lung cancer: biology, diagnostic and therapeutic options," *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, vol. 89, no. 3, pp. 358–365, Mar. 2014, doi: 10.1016/J.CRITREVONC.2013.09.003.

[62] Y. Cheng, T. Zhang, and Q. Xu, "Therapeutic advances in non-small cell lung cancer: Focus on clinical development of targeted therapy and immunotherapy," *MedComm*, vol. 2, no. 4, pp. 692–729, Dec. 2021, doi: 10.1002/MCO2.105.

[63] A. Addeo, A. Passaro, U. Malapelle, G. Luigi Banna, V. Subbiah, and A. Friedlaender, "Immunotherapy in non-small cell lung cancer harbouring driver mutations," *Cancer Treat. Rev.*, vol. 96, p. 102179, May 2021, doi: 10.1016/J.CTRV.2021.102179.

[64] C. Gauvin *et al.*, "Survival Impact of Aggressive Treatment and PD-L1 Expression in Oligometastatic NSCLC," *Curr. Oncol. 2021, Vol. 28, Pages 593-605*, vol. 28, no. 1,

pp. 593–605, Jan. 2021, doi: 10.3390/CURRONCOL28010059.

[65] C. Aggarwal *et al.*, "Molecular testing in stage I–III non-small cell lung cancer: Approaches and challenges," *Lung Cancer*, vol. 162, pp. 42–53, Dec. 2021, doi: 10.1016/J.LUNGCAN.2021.09.003.

[66] D. Planchard *et al.*, "Metastatic non-small cell lung cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up†," *Ann. Oncol.*, vol. 29, pp. iv192–iv237, Oct. 2018, doi: 10.1093/ANNONC/MDY275.

[67] T. M. Bauer et al, "NSCLC Biomarkers - ClinicalThought - Biomarker Driven NSCLC Care ," *CCO*, 2022. https://clinicaloptions.com/CE-CME/nsclc-biomarkers/100001830-100002523 (accessed Feb. 26, 2023).

[68] J. P. Gregg, T. Li, and K. Y. Yoneda, "Molecular testing strategies in non-small cell lung cancer: optimizing the diagnostic journey," *Transl. lung cancer Res.*, vol. 8, no. 3, pp. 286–301, Jun. 2019, doi: 10.21037/TLCR.2019.04.14.

[69] N. I. Lindeman *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," *Arch. Pathol. Lab. Med.*, vol. 142, no. 3, pp. 321–346, Mar. 2018, doi: 10.5858/ARPA.2017-0388-CP.

[70] Y. L. Wu *et al.*, "Pan-Asian adapted Clinical Practice Guidelines for the management of patients with metastatic non-small-cell lung cancer: a CSCO-ESMO initiative endorsed by JSMO, KSMO, MOS, SSO and TOS," *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.*, vol. 30, no. 2, pp. 171–210, Feb. 2019, doi: 10.1093/ANNONC/MDY554.

[71] J. K. Sabari, F. Santini, I. Bergagnini, W. V. Lai, K. C. Arbour, and A. Drilon, "Changing the Therapeutic Landscape in Non-small Cell Lung Cancers: the Evolution of Comprehensive Molecular Profiling Improves Access to Therapy HHS Public Access," *Curr Oncol Rep*, vol. 19, no. 4, p. 24, 2017, doi: 10.1007/s11912-017-0587-4.

[72] C. Khoo, T. M. Rogers, A. Fellowes, A. Bell, and S. Fox, "Molecular methods for somatic mutation testing in lung adenocarcinoma: EGFR and beyond," *Transl. Lung Cancer Res.*, vol. 4, no. 2, pp. 126–141, 2015, doi: 10.3978/J.ISSN.2218-6751.2015.01.10.

[73] C. He *et al.*, "Comprehensive analysis of NGS and ARMS-PCR for detecting EGFR mutations based on 4467 cases of NSCLC patients," *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, vol. 148, no. 2, p. 321, Feb. 2022, doi: 10.1007/S00432-021-03818-W.

[74] Z. Zheng *et al.*, "Anchored multiplex PCR for targeted next-generation sequencing," *Nat. Med. 2014 2012*, vol. 20, no. 12, pp. 1479–1484, Nov. 2014, doi: 10.1038/nm.3729.

[75] S. W. Lam *et al.*, "Molecular Analysis of Gene Fusions in Bone and Soft Tissue Tumors by Anchored Multiplex PCR-Based Targeted Next-Generation Sequencing," *J. Mol. Diagn.*, vol. 20, no. 5, pp. 653–663, Sep. 2018, doi: 10.1016/J.JMOLDX.2018.05.007.

[76] G. R. Oxnard *et al.*, "Assessment of Resistance Mechanisms and Clinical Implications in Patients With EGFR T790M-Positive Lung Cancer and Acquired Resistance to Osimertinib," *JAMA Oncol.*, vol. 4, no. 11, pp. 1527–1534, Nov. 2018, doi:

10.1001/JAMAONCOL.2018.2969.

[77] A. McLeer-Florin *et al.*, "ALK fusion variants detection by targeted RNA-next generation sequencing and clinical responses to crizotinib in ALK-positive non-small cell lung cancer," *Lung Cancer*, vol. 116, pp. 15–24, Feb. 2018, doi: 10.1016/J.LUNGCAN.2017.12.004.

[78] K. Yoh *et al.*, "Vandetanib in patients with previously treated RET-rearranged advanced non-small-cell lung cancer (LURET): an open-label, multicentre phase 2 trial," *Lancet. Respir. Med.*, vol. 5, no. 1, pp. 42–50, Jan. 2017, doi: 10.1016/S2213-2600(16)30322-8.

[79] A. Drilon *et al.*, "A Phase I/Ib Trial of the VEGFR-Sparing Multikinase RET Inhibitor RXDX-105," *Cancer Discov.*, vol. 9, no. 3, pp. 384–395, Mar. 2019, doi: 10.1158/2159-8290.CD-18-0839.

[80] C. Marchiò *et al.*, "ESMO recommendations on the standard methods to detect NTRK fusions in daily practice and clinical research," *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.*, vol. 30, no. 9, pp. 1417–1427, Sep. 2019, doi: 10.1093/ANNONC/MDZ204.

[81] E. Conde *et al.*, "Molecular diagnosis in non-small-cell lung cancer: expert opinion on ALK and ROS1 testing," *J. Clin. Pathol.*, vol. 75, no. 3, pp. 145–153, Mar. 2022, doi: 10.1136/JCLINPATH-2021-207490.

[82] P. Garrido *et al.*, "Updated guidelines for predictive biomarker testing in advanced non-small-cell lung cancer: a National Consensus of the Spanish Society of Pathology and the Spanish Society of Medical Oncology," *Clin. Transl. Oncol.*, vol. 22, no. 7, pp. 989–1003, Jul. 2020, doi: 10.1007/S12094-019-02218-4.

[83] S. Garinet, P. Laurent-Puig, H. Blons, and J.-B. Oudart, "Clinical Medicine Current and Future Molecular Testing in NSCLC, What Can We Expect from New Sequencing Technologies?," doi: 10.3390/jcm7060144.

[84] B. E. Slatko, A. F. Gardner, and F. M. Ausubel, "Overview of Next Generation Sequencing Technologies," *Curr. Protoc. Mol. Biol.*, vol. 122, no. 1, p. e59, Apr. 2018, doi: 10.1002/CPMB.59.

[85] Ş. Ari and M. Arikan, "Next-generation sequencing: Advantages, disadvantages, and future," *Plant Omi. Trends Appl.*, pp. 109–135, Jan. 2016, doi: 10.1007/978-3-319-31703-8_5.

[86] M. A. Pereira, F. S. V. Malta, M. C. M. Freire, and P. G. P. Couto, "Application of Next-Generation Sequencing in the Era of Precision Medicine," *Appl. RNA-Seq Omi. Strateg. - From Microorg. to Hum. Heal.*, Sep. 2017, doi: 10.5772/INTECHOPEN.69337.

[87] C. Cainap, O. Balacescu, S. S. Cainap, and L. A. Pop, "Next Generation Sequencing Technology in Lung Cancer Diagnosis," *Biology (Basel).*, vol. 10, no. 9, Sep. 2021, doi: 10.3390/BIOLOGY10090864.

[88] L. Bonanno *et al.*, "Liquid biopsy and non-small cell lung cancer: are we looking at the tip of the iceberg?," *Br. J. Cancer 2022 1273*, vol. 127, no. 3, pp. 383–393, Mar. 2022, doi: 10.1038/s41416-022-01777-8.

[89] C. Rolfo *et al.*, "Liquid Biopsy for Advanced Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC): A Statement Paper from the IASLC," *J. Thorac. Oncol.*, vol. 13, no. 9, pp. 1248–1268,

Sep. 2018, doi: 10.1016/J.JTHO.2018.05.030.

[90] G. P. Kalemkerian *et al.*, "Molecular Testing Guideline for the Selection of Patients With Lung Cancer for Treatment With Targeted Tyrosine Kinase Inhibitors: American Society of Clinical Oncology Endorsement of the College of American Pathologists/International Association for the Study of Lung Cancer/Association for Molecular Pathology Clinical Practice Guideline Update," *J. Clin. Oncol.*, vol. 36, no. 9, pp. 911–919, 2018, doi: 10.1200/JCO.2017.76.7293.

[91] A. R. Thierry, S. El Messaoudi, P. B. Gahan, P. Anker, and M. Stroun, "Origins, structures, and functions of circulating DNA in oncology," *Cancer Metastasis Rev.*, vol. 35, no. 3, pp. 347–376, Sep. 2016, doi: 10.1007/S10555-016-9629-X.

[92] S. Salvi *et al.*, "Cell-free DNA as a diagnostic marker for cancer: current insights," *Onco. Targets. Ther.*, vol. 9, pp. 6549–6559, Oct. 2016, doi: 10.2147/OTT.S100901.

[93] E. Heitzer, P. Ulz, and J. B. Geigl, "Circulating tumor DNA as a liquid biopsy for cancer," *Clin. Chem.*, vol. 61, no. 1, pp. 112–123, Jan. 2015, doi: 10.1373/CLINCHEM.2014.222679.

[94] H. R. Underhill *et al.*, "Fragment Length of Circulating Tumor DNA," *PLoS Genet.*, vol. 12, no. 7, Jul. 2016, doi: 10.1371/JOURNAL.PGEN.1006162.

[95] X. Yi, J. Ma, Y. Guan, R. Chen, L. Yang, and X. Xia, "The feasibility of using mutation detection in ctDNA to assess tumor dynamics," *Int. J. Cancer*, vol. 140, no. 12, pp. 2642–2647, Jun. 2017, doi: 10.1002/IJC.30620.

[96] N. O. Tuaeva *et al.*, "Translational Application of Circulating DNA in Oncology: Review of the Last Decades Achievements," *Cells*, vol. 8, no. 10, Oct. 2019, doi: 10.3390/CELLS8101251.

[97] C. Alix-Panabières and K. Pantel, "Clinical Applications of Circulating Tumor Cells and Circulating Tumor DNA as Liquid Biopsy," *Cancer Discov.*, vol. 6, no. 5, pp. 479–491, May 2016, doi: 10.1158/2159-8290.CD-15-1483.

[98] Y. Chang, B. Tolani, X. Nie, X. Zhi, M. Hu, and B. He, "Review of the clinical applications and technological advances of circulating tumor DNA in cancer monitoring," *Ther. Clin. Risk Manag.*, vol. 13, pp. 1363–1374, Oct. 2017, doi: 10.2147/TCRM.S141991.

[99] L. A. Diaz and A. Bardelli, "Liquid biopsies: genotyping circulating tumor DNA," *J. Clin. Oncol.*, vol. 32, no. 6, pp. 579–586, Feb. 2014, doi: 10.1200/JCO.2012.45.2011.

[100] C. Aggarwal, C. D. Rolfo, G. R. Oxnard, J. E. Gray, L. M. Sholl, and D. R. Gandara, "Strategies for the successful implementation of plasma-based NSCLC genotyping in clinical practice," *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, vol. 18, no. 1, pp. 56–62, Jan. 2021, doi: 10.1038/S41571-020-0423-X.

[101] A. C. Tan, "The Role of Liquid Biopsy in the Diagnostic Testing Algorithm for Advanced Lung Cancer," *Onco 2022, Vol. 2, Pages 181-185*, vol. 2, no. 3, pp. 181–185, Jul. 2022, doi: 10.3390/ONCO2030012.

[102] Y. L. Wu *et al.*, "Clinical utility of a blood-based EGFR mutation test in patients receiving first-line erlotinib therapy in the ENSURE, FASTACT-2, and ASPIRATION studies," *Lung Cancer*, vol. 126, pp. 1–8, Dec. 2018, doi: 10.1016/J.LUNGCAN.2018.10.004.

[103] A. B. Schrock *et al.*, "Hybrid Capture-Based Genomic Profiling of Circulating Tumor DNA from Patients with Advanced Non-Small Cell Lung Cancer," *J. Thorac. Oncol.*, vol. 14, no. 2, pp. 255–264, Feb. 2019, doi: 10.1016/J.JTHO.2018.10.008.

[104] J. Remon *et al.*, "Real-World Utility of an Amplicon-Based Next-Generation Sequencing Liquid Biopsy for Broad Molecular Profiling in Patients With Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer," *JCO Precis. Oncol.*, vol. 3, no. 3, pp. 1–14, Dec. 2019, doi: 10.1200/PO.18.00211.

[105] N. B. Leighl *et al.*, "Clinical Utility of Comprehensive Cell-free DNA Analysis to Identify Genomic Biomarkers in Patients with Newly Diagnosed Metastatic Non-small Cell Lung Cancer," *Clin. Cancer Res.*, vol. 25, no. 15, pp. 4691–4700, Aug. 2019, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-19-0624.

[106] R. Dziadziuszko *et al.*, "Blood First Assay Screening Trial (BFAST) in Treatment-Naive Advanced or Metastatic NSCLC: Initial Results of the Phase 2 ALK-Positive Cohort," *J. Thorac. Oncol.*, vol. 16, no. 12, pp. 2040–2050, Dec. 2021, doi: 10.1016/J.JTHO.2021.07.008.

[107] J. C. Thompson *et al.*, "Plasma Genotyping at the Time of Diagnostic Tissue Biopsy Decreases Time-to-Treatment in Patients With Advanced NSCLC-Results From a Prospective Pilot Study," *JTO Clin. Res. reports*, vol. 3, no. 4, Apr. 2022, doi: 10.1016/J.JTOCRR.2022.100301.

[108] S. V. Sharma, D. W. Bell, J. Settleman, and D. A. Haber, "Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 7, no. 3, pp. 169–181, Mar. 2007, doi: 10.1038/NRC2088.

[109] J. Chen *et al.*, "Expression and Function of the Epidermal Growth Factor Receptor in Physiology and Disease," *Physiol Rev*, vol. 96, pp. 1025–1069, 2016, doi: 10.1152/physrev.00030.2015.-The.

[110] P. Wee and Z. Wang, "Epidermal Growth Factor Receptor Cell Proliferation Signaling Pathways," *Cancers 2017, Vol. 9, Page 52*, vol. 9, no. 5, p. 52, May 2017, doi: 10.3390/CANCERS9050052.

[111] T. Amelia, R. E. Kartasasmita, T. Ohwada, and D. H. Tjahjono, "Structural Insight and Development of EGFR Tyrosine Kinase Inhibitors," *Molecules*, vol. 27, no. 3, Feb. 2022, doi: 10.3390/MOLECULES27030819.

[112] S. Morandell, T. Stasyk, S. Skvortsov, S. Ascher, and L. A. Huber, "Quantitative proteomics and phosphoproteomics reveal novel insights into complexity and dynamics of the EGFR signaling network," *Proteomics*, vol. 8, no. 21, pp. 4383–4401, Nov. 2008, doi: 10.1002/PMIC.200800204.

[113] K. J. Wilson, J. L. Gilmore, J. Foley, M. A. Lemmon, and D. J. Riese, "Functional selectivity of EGF family peptide growth factors: implications for cancer," *Pharmacol. Ther.*, vol. 122, no. 1, pp. 1–8, Apr. 2009, doi: 10.1016/J.PHARMTHERA.2008.11.008.

[114] A. Bearz, M. Berretta, A. Lleshi, and U. Tirelli, "Target Therapies in Lung Cancer," *J. Biomed. Biotechnol.*, vol. 2011, 2011, doi: 10.1155/2011/921231.

[115] C. N. Prabhakar, "Epidermal growth factor receptor in non-small cell lung cancer," *Transl. Lung Cancer Res.*, vol. 4, no. 2, p. 110, 2015, doi: 10.3978/J.ISSN.2218-

6751.2015.01.01.

[116] A. Al Olayan *et al.*, "The roles of epidermal growth factor receptor (EGFR) inhibitors in the management of lung cancer," *J. Infect. Public Health*, vol. 5 Suppl 1, no. 5 SUPPL.1, Dec. 2012, doi: 10.1016/J.JIPH.2012.09.004.

[117] W. Kolch and A. Pitt, "Functional proteomics to dissect tyrosine kinase signalling pathways in cancer," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 10, no. 9, pp. 618–629, Sep. 2010, doi: 10.1038/NRC2900.

[118] H. V. Reddi, "Mutations in the EGFR Pathway ," *AACR*, 2013. https://www.aacc.org/cln/articles/2013/october/egfr-mutations (accessed Feb. 26, 2023).

[119] R. S. Herbst, J. V. Heymach, and S. M. Lippman, "Molecular origins of cancer: Lung cancer," *N. Engl. J. Med.*, vol. 359, no. 13, pp. 1367–1380, Sep. 2008, doi: 10.1056/NEJMRA0802714.

[120] M. Ladanyi and W. Pao, "Lung adenocarcinoma: guiding EGFR-targeted therapy and beyond," *Mod. Pathol.*, vol. 21 Suppl 2, pp. S16–S22, 2008, doi: 10.1038/MODPATHOL.3801018.

[121] B. Melosky *et al.*, "Worldwide Prevalence of Epidermal Growth Factor Receptor Mutations in Non-Small Cell Lung Cancer: A Meta-Analysis," *Mol. Diagnosis Ther.*, vol. 26, no. 1, pp. 7–18, Jan. 2022, doi: 10.1007/S40291-021-00563-1/FIGURES/4.

[122] H. Yasuda *et al.*, "Structural , Biochemical , and Clinical Characterization of Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Exon 20 Insertion Mutations in Lung Cancer," vol. 177, 2013, doi: 10.1126/scitranslmed.3007205.

[123] H. Y. Yoon *et al.*, "Clinical significance of EGFR mutation types in lung adenocarcinoma: A multi-centre Korean study," *PLoS One*, vol. 15, no. 2, Feb. 2020, doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0228925.

[124] S. Popat *et al.*, "Tyrosine Kinase Inhibitor Activity in Patients with NSCLC Harboring Uncommon EGFR Mutations: A Retrospective International Cohort Study (UpSwinG)," *Oncologist*, vol. 27, no. 4, pp. 255–265, Apr. 2022, doi: 10.1093/ONCOLO/OYAC022.

[125] L. E. Coate, T. John, M. S. Tsao, and F. A. Shepherd, "Molecular predictive and prognostic markers in non-small-cell lung cancer," *Lancet. Oncol.*, vol. 10, no. 10, pp. 1001–1010, Oct. 2009, doi: 10.1016/S1470-2045(09)70155-X.

[126] K. Tsuta *et al.*, "The utility of the proposed IASLC/ATS/ERS lung adenocarcinoma subtypes for disease prognosis and correlation of driver gene alterations," *Lung Cancer*, vol. 81, no. 3, pp. 371–376, Sep. 2013, doi: 10.1016/J.LUNGCAN.2013.06.012.

[127] C. F. Weng *et al.*, "New International Association for the Study of Lung Cancer (IASLC) Pathology Committee Grading System for the Prognostic Outcome of Advanced Lung Adenocarcinoma," *Cancers (Basel).*, vol. 12, no. 11, pp. 1–14, Nov. 2020, doi: 10.3390/CANCERS12113426.

[128] T. Wang, Y. Zhang, B. Liu, M. Hu, N. Zhou, and X. Zhi, "Associations between epidermal growth factor receptor mutations and histological subtypes of lung adenocarcinoma according to the IASLC/ATS/ERS classification in Chinese patients,"

Thorac. cancer, vol. 8, no. 6, pp. 600–605, Nov. 2017, doi: 10.1111/1759-7714.12489.

[129] N. Tochigi, S. Dacic, M. Nikiforova, K. M. Cieply, and S. A. Yousem, "Adenosquamous carcinoma of the lung: a microdissection study of KRAS and EGFR mutational and amplification status in a western patient population," *Am. J. Clin. Pathol.*, vol. 135, no. 5, pp. 783–789, May 2011, doi: 10.1309/AJCP08IQZAOGYLFL.

[130] L. Horn, E. Koehler, J. Gilbert, and D. H. Johnson, "Factors associated with the career choices of hematology and medical oncology fellows trained at academic institutions in the United States," *J. Clin. Oncol.*, vol. 29, no. 29, pp. 3932–3938, Oct. 2011, doi: 10.1200/JCO.2011.35.8663.

[131] A. F. H. Ortiz *et al.*, "Clinical and CT patterns to predict EGFR mutation in patients with non-small cell lung cancer: A systematic literature review and meta-analysis," *Eur. J. Radiol. open*, vol. 9, Jan. 2022, doi: 10.1016/J.EJRO.2022.100400.

[132] M. Sonobe, T. Manabe, H. Wada, and F. Tanaka, "Mutations in the epidermal growth factor receptor gene are linked to smoking-independent, lung adenocarcinoma," *Br. J. Cancer 2005 933*, vol. 93, no. 3, pp. 355–363, Jul. 2005, doi: 10.1038/sj.bjc.6602707.

[133] M. Li *et al.*, "The in cis compound EGFR mutations in Chinese advanced non-small cell lung cancer patients," *Cancer Biol. Ther.*, vol. 20, no. 8, pp. 1097–1104, Aug. 2019, doi: 10.1080/15384047.2019.1595280/SUPPL_FILE/KCBT_A_1595280_SM0961.PPTX.

[134] O. Arrieta *et al.*, "The impact of common and rare EGFR mutations in response to EGFR tyrosine kinase inhibitors and platinum-based chemotherapy in patients with non-small cell lung cancer," *Lung Cancer*, vol. 87, no. 2, pp. 169–175, Feb. 2015, doi: 10.1016/J.LUNGCAN.2014.12.009.

[135] H. Y. Tu *et al.*, "A comprehensive review of uncommon EGFR mutations in patients with non-small cell lung cancer," *Lung Cancer*, vol. 114, pp. 96–102, Dec. 2017, doi: 10.1016/J.LUNGCAN.2017.11.005.

[136] B. Keam *et al.*, "Rare and complex mutations of epidermal growth factor receptor, and efficacy of tyrosine kinase inhibitor in patients with non-small cell lung cancer," *Int. J. Clin. Oncol. 2013 194*, vol. 19, no. 4, pp. 594–600, Aug. 2013, doi: 10.1007/S10147-013-0602-1.

[137] M. R. Brewer, C.-H. Yun, D. Lai, M. A. Lemmon, M. J. Eck, and W. Pao, "Mechanism for activation of mutated epidermal growth factor receptors in lung cancer," doi: 10.1073/pnas.1220050110.

[138] N. F. Endres, T. Barros, A. J. Cantor, and J. Kuriyan, "Emerging concepts in the regulation of the EGF receptor and other receptor tyrosine kinases," *Trends Biochem. Sci.*, vol. 39, no. 10, pp. 437–446, Oct. 2014, doi: 10.1016/J.TIBS.2014.08.001.

[139] L. Sutto and F. L. Gervasio, "Effects of oncogenic mutations on the conformational free-energy landscape of EGFR kinase," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 110, no. 26, pp. 10616–10621, Jun. 2013, doi: 10.1073/PNAS.1221953110/-/DCSUPPLEMENTAL.

[140] I. Galdadas, L. Carlino, R. A. Ward, S. J. Hughes, S. Haider, and F. L. Gervasio, "Structural basis of the effect of activating mutations on the EGF receptor," *Elife*, vol. 10, Jul. 2021, doi: 10.7554/ELIFE.65824.

[141] C. H. Yun *et al.*, "Structures of lung cancer-derived EGFR mutants and inhibitor complexes: mechanism of activation and insights into differential inhibitor sensitivity," *Cancer Cell*, vol. 11, no. 3, pp. 217–227, Mar. 2007, doi: 10.1016/J.CCR.2006.12.017.

[142] K. D. Carey *et al.*, "Kinetic analysis of epidermal growth factor receptor somatic mutant proteins shows increased sensitivity to the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, erlotinib," *Cancer Res.*, vol. 66, no. 16, pp. 8163–8171, Aug. 2006, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-0453.

[143] M. Z. Tamirat, M. Koivu, K. Elenius, and M. S. Johnson, "Structural characterization of EGFR exon 19 deletion mutation using molecular dynamics simulation," *PLoS One*, vol. 14, no. 9, p. e0222814, Sep. 2019, doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0222814.

[144] K. Suda, R. Onozato, Y. Yatabe, and T. Mitsudomi, "EGFR T790M mutation: A double role in lung cancer cell survival?," *J. Thorac. Oncol.*, vol. 4, no. 1, pp. 1–4, 2009, doi: 10.1097/JTO.0B013E3181913C9F.

[145] A. F. Gazdar, H. Shigematsu, J. Herz, and J. D. Minna, "Mutations and addiction to EGFR: the Achilles 'heal' of lung cancers?," *Trends Mol. Med.*, vol. 10, no. 10, pp. 481–486, 2004, doi: 10.1016/J.MOLMED.2004.08.008.

[146] T. Yoshida, G. Zhang, and E. B. Haura, "Targeting epidermal growth factor receptor: Central signaling kinase in lung cancer," *Biochem. Pharmacol.*, vol. 80, no. 5, pp. 613–623, Sep. 2010, doi: 10.1016/J.BCP.2010.05.014.

[147] Y. R. Choi *et al.*, "Early On-Treatment Prediction of the Mechanisms of Acquired Resistance to EGFR Tyrosine Kinase Inhibitors," *Cancers (Basel).*, vol. 14, no. 6, Mar. 2022, doi: 10.3390/CANCERS14061512.

[148] E. Santoni-Rugiu *et al.*, "Intrinsic resistance to EGFR-Tyrosine Kinase Inhibitors in EGFR-Mutant Non-Small Cell Lung Cancer: Differences and Similarities with Acquired Resistance," *Cancers (Basel).*, vol. 11, no. 7, Jul. 2019, doi: 10.3390/CANCERS11070923.

[149] I. Dagogo-Jack and A. T. Shaw, "Tumour heterogeneity and resistance to cancer therapies," *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, vol. 15, no. 2, pp. 81–94, Feb. 2018, doi: 10.1038/NRCLINONC.2017.166.

[150] A. Koulouris, C. Tsagkaris, A. C. Corriero, G. Metro, and G. Mountzios, "Resistance to TKIs in EGFR-Mutated Non-Small Cell Lung Cancer: From Mechanisms to New Therapeutic Strategies," *Cancers (Basel).*, vol. 14, no. 14, Jul. 2022, doi: 10.3390/CANCERS14143337.

[151] X. Gao *et al.*, "Poor Prognosis With Coexistence Of EGFR T790M Mutation And Common EGFR-Activating Mutation In Non- Small Cell Lung Cancer," *Cancer Manag. Res.*, vol. 11, p. 9621, 2019, doi: 10.2147/CMAR.S216721.

[152] M. Provencio *et al.*, "Osimertinib in advanced EGFR-T790M mutation-positive non-small cell lung cancer patients treated within the Special Use Medication Program in Spain: OSIREX-Spanish Lung Cancer Group," *BMC Cancer*, vol. 21, no. 1, pp. 1–12, Dec. 2021, doi: 10.1186/S12885-021-07922-5/TABLES/4.

[153] J. Hou *et al.*, "EGFR exon 20 insertion mutations in advanced non-small-cell lung cancer: current status and perspectives," *Biomark. Res.*, vol. 10, no. 1, pp. 1–12, Dec. 2022, doi: 10.1186/S40364-022-00372-6/FIGURES/2.

[154] J. W. Riess *et al.*, "Diverse EGFR Exon 20 Insertions and Co-Occurring Molecular Alterations Identified by Comprehensive Genomic Profiling of NSCLC," *J. Thorac. Oncol.*, vol. 13, no. 10, pp. 1560–1568, Oct. 2018, doi: 10.1016/J.JTHO.2018.06.019.

[155] H. Yasuda, S. Kobayashi, and D. B. Costa, "EGFR exon 20 insertion mutations in non-small-cell lung cancer: preclinical data and clinical implications," *Lancet. Oncol.*, vol. 13, no. 1, Jan. 2012, doi: 10.1016/S1470-2045(11)70129-2.

[156] C. Morita *et al.*, "Clinical characteristics of advanced non-small cell lung cancer patients with EGFR exon 20 insertions," *Sci. Rep.*, vol. 11, no. 1, Dec. 2021, doi: 10.1038/S41598-021-98275-3.

[157] B. C. Cho *et al.*, "MARIPOSA: phase 3 study of first-line amivantamab + lazertinib versus osimertinib in EGFR-mutant non-small-cell lung cancer," *Future Oncol.*, vol. 18, no. 6, pp. 639–647, Feb. 2022, doi: 10.2217/FON-2021-0923.

[158] T. Agrawal *et al.*, "P76.74 PAPILLON: Randomized Phase 3 Study of Amivantamab Plus Chemotherapy vs Chemotherapy Alone in EGFR Exon20ins NSCLC," *J. Thorac. Oncol.*, vol. 16, no. 3, p. S621, Mar. 2021, doi: 10.1016/j.jtho.2021.01.1131.

[159] Z. Yang *et al.*, "Investigating Novel Resistance Mechanisms to Third-Generation EGFR Tyrosine Kinase Inhibitor Osimertinib in Non-Small Cell Lung Cancer Patients," *Clin. Cancer Res.*, vol. 24, no. 13, pp. 3097–3107, Jul. 2018, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-17-2310.

[160] Y. Liu *et al.*, "LS-106, a novel EGFR inhibitor targeting C797S, exhibits antitumor activities both in vitro and in vivo," *Cancer Sci.*, vol. 113, no. 2, pp. 709–720, Feb. 2022, doi: 10.1111/CAS.15229.

[161] S. S. Schalm *et al.*, "384P BLU-945, a highly potent and selective 4th generation EGFR TKI for the treatment of EGFR T790M/C797S resistant NSCLC," *Ann. Oncol.*, vol. 31, p. S1391, Nov. 2020, doi: 10.1016/j.annonc.2020.10.378.

[162] M. Nishino *et al.*, "Effects of secondary EGFR mutations on resistance against upfront osimertinib in cells with EGFR-activating mutations in vitro," *Lung Cancer*, vol. 126, pp. 149–155, Dec. 2018, doi: 10.1016/J.LUNGCAN.2018.10.026.

[163] S. H. I. Ou *et al.*, "Emergence of novel and dominant acquired EGFR solvent-front mutations at Gly796 (G796S/R) together with C797S/R and L792F/H mutations in one EGFR (L858R/T790M) NSCLC patient who progressed on osimertinib," *Lung Cancer*, vol. 108, pp. 228–231, Jun. 2017, doi: 10.1016/J.LUNGCAN.2017.04.003.

[164] H. S. Li, G. J. Yang, and Y. Wang, "Case Report: Dacomitinib May Not Benefit Patients Who Develop Rare Compound Mutations After Later-Line Osimertinib Treatment," *Front. Oncol.*, vol. 11, Apr. 2021, doi: 10.3389/FONC.2021.649843.

[165] D. Zheng *et al.*, "EGFR G796D mutation mediates resistance to osimertinib," *Oncotarget*, vol. 8, no. 30, pp. 49671–49679, 2017, doi: 10.18632/ONCOTARGET.17913.

[166] Q. Zhang *et al.*, "EGFR L792H and G796R: Two Novel Mutations Mediating Resistance to the Third-Generation EGFR Tyrosine Kinase Inhibitor Osimertinib," *J. Thorac. Oncol.*, vol. 13, no. 9, pp. 1415–1421, Sep. 2018, doi: 10.1016/J.JTHO.2018.05.024.

[167] T. Iwahara *et al.*, "Molecular characterization of ALK, a receptor tyrosine kinase

expressed specifically in the nervous system," *Oncogene*, vol. 14, no. 4, pp. 439–449, 1997, doi: 10.1038/SJ.ONC.1200849.

[168] R. H. Palmer, E. Vernersson, C. Grabbe, and B. Hallberg, "Anaplastic lymphoma kinase: signalling in development and disease," *Biochem. J.*, vol. 420, no. 3, pp. 345–361, Jun. 2009, doi: 10.1042/BJ20090387.

[169] B. Hallberg and R. H. Palmer, "Mechanistic insight into ALK receptor tyrosine kinase in human cancer biology," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 13, no. 10, pp. 685–700, 2013, doi: 10.1038/NRC3580.

[170] C. E. Lorén, C. Englund, C. Grabbe, B. Hallberg, T. Hunter, and R. H. Palmer, "A crucial role for the Anaplastic lymphoma kinase receptor tyrosine kinase in gut development in Drosophila melanogaster," *EMBO Rep.*, vol. 4, no. 8, pp. 781–786, Aug. 2003, doi: 10.1038/SJ.EMBOR.EMBOR897.

[171] S. W. Morris *et al.*, "ALK, the chromosome 2 gene locus altered by the t(2;5) in non-Hodgkin's lymphoma, encodes a novel neural receptor tyrosine kinase that is highly related to leukocyte tyrosine kinase (LTK)," *Oncogene*, vol. 14, no. 18, pp. 2175–2188, 1997, doi: 10.1038/SJ.ONC.1201062.

[172] A. Fadeev *et al.*, "ALKALs are in vivo ligands for ALK family receptor tyrosine kinases in the neural crest and derived cells," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 115, no. 4, pp. E630–E638, Jan. 2018, doi: 10.1073/PNAS.1719137115.

[173] A. Aubry *et al.*, "Peptides derived from the dependence receptor ALK are proapoptotic for ALK-positive tumors," *Cell Death Dis.*, vol. 6, no. 5, May 2015, doi: 10.1038/CDDIS.2015.102.

[174] M. A. Lemmon and J. Schlessinger, "Cell signaling by receptor-tyrosine kinases," *Cell*, vol. 141, no. 7, p. 1117, Jun. 2010, doi: 10.1016/J.CELL.2010.06.011.

[175] R. T. Bossi *et al.*, "Crystal structures of anaplastic lymphoma kinase in complex with ATP competitive inhibitors," *Biochemistry*, vol. 49, no. 32, pp. 6813–6825, Aug. 2010, doi: 10.1021/BI1005514.

[176] C. C. Lee *et al.*, "Crystal structure of the ALK (anaplastic lymphoma kinase) catalytic domain," *Biochem. J.*, vol. 430, no. 3, pp. 425–437, Sep. 2010, doi: 10.1042/BJ20100609.

[177] C. J. Tartari *et al.*, "Characterization of some molecular mechanisms governing autoactivation of the catalytic domain of the anaplastic lymphoma kinase," *J. Biol. Chem.*, vol. 283, no. 7, pp. 3743–3750, Feb. 2008, doi: 10.1074/JBC.M706067200.

[178] A. T. Shaw, P. P. Hsu, M. M. Awad, and J. A. Engelman, "Tyrosine kinase gene rearrangements in epithelial malignancies," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 13, no. 11, pp. 772–787, 2013, doi: 10.1038/NRC3612.

[179] F. Toffalini and J. B. Demoulin, "New insights into the mechanisms of hematopoietic cell transformation by activated receptor tyrosine kinases," *Blood*, vol. 116, no. 14, pp. 2429–2437, Oct. 2010, doi: 10.1182/BLOOD-2010-04-279752.

[180] M. Ladanyi and G. Cavalchire, "Molecular variant of the NPM-ALK rearrangement of Ki-1 lymphoma involving a cryptic ALK splice site.," *Genes. Chromosomes Cancer*, 1996, doi: 10.1002/(SICI)1098-2264(199603)15:3.

[181] S. W. Morris *et al.*, "Fusion of a kinase gene, ALK, to a nucleolar protein gene, NPM, in non-Hodgkin's lymphoma," *Science*, vol. 263, no. 5151, pp. 1281–1284, Mar. 1994, doi: 10.1126/SCIENCE.8122112.

[182] R. Lai and R. J. Ingham, "The pathobiology of the oncogenic tyrosine kinase NPM-ALK: a brief update," *Ther. Adv. Hematol.*, vol. 4, no. 2, p. 119, 2013, doi: 10.1177/2040620712471553.

[183] L. Lamant *et al.*, "Expression of the ALK tyrosine kinase gene in neuroblastoma," *Am. J. Pathol.*, vol. 156, no. 5, pp. 1711–1721, 2000, doi: 10.1016/S0002-9440(10)65042-0.

[184] G. G. Sharma, I. Mota, L. Mologni, E. Patrucco, C. Gambacorti-Passerini, and R. Chiarle, "Tumor Resistance against ALK Targeted Therapy-Where It Comes From and Where It Goes," *Cancers (Basel).*, vol. 10, no. 3, Mar. 2018, doi: 10.3390/CANCERS10030062.

[185] S. Devarakonda, D. Morgensztern, and R. Govindan, "Genomic alterations in lung adenocarcinoma," *Lancet Oncol.*, vol. 16, no. 7, pp. e342–e351, Jul. 2015, doi: 10.1016/S1470-2045(15)00077-7.

[186] A. T. Shaw *et al.*, "Crizotinib versus chemotherapy in advanced ALK-positive lung cancer," *N. Engl. J. Med.*, vol. 368, no. 25, pp. 2385–2394, Jun. 2013, doi: 10.1056/NEJMOA1214886.

[187] G. Toyokawa and T. Seto, "ALK inhibitors: what is the best way to treat patients with ALK+ non-small-cell lung cancer?," *Clin. Lung Cancer*, vol. 15, no. 5, pp. 313–319, Sep. 2014, doi: 10.1016/J.CLLC.2014.05.001.

[188] N. A. et B. B. K. Kalai, "ALK : un nouveau biomarqueur prédictif dans le cancer bronchique non à petites cellules," *Corresp. en Onco-Théranostic*, vol. I, no. 3, 2012.

[189] S. Lantuejoul, L. Mescam-Mancini, and A. Mcleer-Florin, "Réarrangements du gène ALK dans les cancers du poumon non à petites cellules ALK gene rearrangement in non-small-cell lung carcinoma," *Corresp. en Onco-Théranostic*, vol. 3.

[190] L. Horn and W. Pao, "EML4-ALK: honing in on a new target in non-small-cell lung cancer," *J. Clin. Oncol.*, vol. 27, no. 26, pp. 4232–4236, Sep. 2009, doi: 10.1200/JCO.2009.23.6661.

[191] Y. Sun *et al.*, "Lung adenocarcinoma from East Asian never-smokers is a disease largely defined by targetable oncogenic mutant kinases," *J. Clin. Oncol.*, vol. 28, no. 30, pp. 4616–4620, Oct. 2010, doi: 10.1200/JCO.2010.29.6038.

[192] A. T. Shaw *et al.*, "Clinical features and outcome of patients with non-small-cell lung cancer who harbor EML4-ALK," *J. Clin. Oncol.*, vol. 27, no. 26, pp. 4247–4253, Sep. 2009, doi: 10.1200/JCO.2009.22.6993.

[193] K. Inamura *et al.*, "EML4-ALK fusion is linked to histological characteristics in a subset of lung cancers," *J. Thorac. Oncol.*, vol. 3, no. 1, pp. 13–17, 2008, doi: 10.1097/JTO.0B013E31815E8B60.

[194] P. Hofman, "ALK in Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC) Pathobiology, Epidemiology, Detection from Tumor Tissue and Algorithm Diagnosis in a Daily Practice," *Cancers (Basel).*, vol. 9, no. 8, Aug. 2017, doi: 10.3390/CANCERS9080107.

[195] M. K. H. Maus, C. Stephens, G. Zeger, P. P. Grimminger, and E. Huang,

"Identification of Novel Variant of EML4-ALK Fusion Gene in NSCLC: Potential Benefits of the RT-PCR Method," *Int. J. Biomed. Sci.*, vol. 8, no. 1, 2012, Accessed: Jun. 03, 2022. [Online]. Available: www.ijbs.org.

[196] S. R. Sabir, S. Yeoh, G. Jackson, and R. Bayliss, "EML4-ALK Variants: Biological and Molecular Properties, and the Implications for Patients," *Cancers (Basel).*, vol. 9, no. 9, Sep. 2017, doi: 10.3390/CANCERS9090118.

[197] R. Bayliss, J. Choi, D. A. Fennell, A. M. Fry, and M. W. Richards, "Molecular mechanisms that underpin EML4-ALK driven cancers and their response to targeted drugs," *Cell. Mol. Life Sci. 2016 736*, vol. 73, no. 6, pp. 1209–1224, Jan. 2016, doi: 10.1007/S00018-015-2117-6.

[198] H. Mano, "ALKoma: a cancer subtype with a shared target," *Cancer Discov.*, vol. 2, no. 6, pp. 495–502, Jun. 2012, doi: 10.1158/2159-8290.CD-12-0009.

[199] A. G. Iyevleva *et al.*, "Novel ALK fusion partners in lung cancer," *Cancer Lett.*, vol. 362, no. 1, pp. 116–121, 2015, doi: 10.1016/J.CANLET.2015.03.028.

[200] K. Rikova *et al.*, "Global survey of phosphotyrosine signaling identifies oncogenic kinases in lung cancer," *Cell*, vol. 131, no. 6, pp. 1190–1203, Dec. 2007, doi: 10.1016/J.CELL.2007.11.025.

[201] K. Takeuchi *et al.*, "KIF5B-ALK, a novel fusion oncokinase identified by an immunohistochemistry-based diagnostic system for ALK-positive lung cancer," *Clin. Cancer Res.*, vol. 15, no. 9, pp. 3143–3149, May 2009, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-08-3248.

[202] Y. Togashi *et al.*, "KLC1-ALK: a novel fusion in lung cancer identified using a formalin-fixed paraffin-embedded tissue only," *PLoS One*, vol. 7, no. 2, Feb. 2012, doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0031323.

[203] W. Li, J. Zhang, L. Guo, S. Chuai, L. Shan, and J. Ying, "Combinational Analysis of FISH and Immunohistochemistry Reveals Rare Genomic Events in ALK Fusion Patterns in NSCLC that Responds to Crizotinib Treatment," *J. Thorac. Oncol.*, vol. 12, no. 1, pp. 94–101, Jan. 2017, doi: 10.1016/J.JTHO.2016.08.145.

[204] Q. Tian, W. J. Deng, and Z. W. Li, "Identification of a novel crizotinib-sensitive BCL11A-ALK gene fusion in a nonsmall cell lung cancer patient," *Eur. Respir. J.*, vol. 49, no. 4, Apr. 2017, doi: 10.1183/13993003.02149-2016.

[205] S. M. Ali *et al.*, "Comprehensive Genomic Profiling Identifies a Subset of Crizotinib-Responsive ALK-Rearranged Non-Small Cell Lung Cancer Not Detected by Fluorescence In Situ Hybridization," *Oncologist*, vol. 21, no. 6, pp. 762–770, Jun. 2016, doi: 10.1634/THEONCOLOGIST.2015-0497.

[206] Y. Jung *et al.*, "Discovery of ALK-PTPN3 gene fusion from human non-small cell lung carcinoma cell line using next generation RNA sequencing," *Genes. Chromosomes Cancer*, vol. 51, no. 6, pp. 590–597, Jun. 2012, doi: 10.1002/GCC.21945.

[207] A. Drilon *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.*, vol. 21, no. 16, pp. 3631–3639, Aug. 2015, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-14-2683.

[208] K. W. Noh *et al.*, "Molecular breakdown: a comprehensive view of anaplastic

lymphoma kinase (ALK)-rearranged non-small cell lung cancer," *J. Pathol.*, vol. 243, no. 3, pp. 307–319, Nov. 2017, doi: 10.1002/PATH.4950.

[209] L. Shan *et al.*, "BIRC6-ALK, a Novel Fusion Gene in ALK Break-Apart FISH-Negative Lung Adenocarcinoma, Responds to Crizotinib," *J. Thorac. Oncol.*, vol. 10, no. 6, pp. e37–e39, Jun. 2015, doi: 10.1097/JTO.0000000000000467.

[210] Y. La Choi *et al.*, "A novel fusion of TPR and ALK in lung adenocarcinoma," *J. Thorac. Oncol.*, vol. 9, no. 4, pp. 563–566, Apr. 2014, doi: 10.1097/JTO.0000000000000093.

[211] D. D. Fang *et al.*, "HIP1-ALK, a novel ALK fusion variant that responds to crizotinib," *J. Thorac. Oncol.*, vol. 9, no. 3, pp. 285–294, 2014, doi: 10.1097/JTO.0000000000000087.

[212] Y. Li, X. Ye, J. Liu, J. Zha, and L. Pei, "Evaluation of EML4-ALK Fusion Proteins in Non-Small Cell Lung Cancer Using Small Molecule Inhibitors," *Neoplasia*, vol. 13, no. 1, p. 1, 2011, doi: 10.1593/NEO.101120.

[213] E. L. Kwak *et al.*, "Anaplastic lymphoma kinase inhibition in non-small-cell lung cancer," *N. Engl. J. Med.*, vol. 363, no. 18, pp. 1693–1703, Oct. 2010, doi: 10.1056/NEJMOA1006448.

[214] P. Yang *et al.*, "Worse disease-free survival in never-smokers with ALK+ lung adenocarcinoma," *J. Thorac. Oncol.*, vol. 7, no. 1, p. 90, 2012, doi: 10.1097/JTO.0B013E31823C5C32.

[215] H. Y. Zou *et al.*, "An orally available small-molecule inhibitor of c-Met, PF-2341066, exhibits cytoreductive antitumor efficacy through antiproliferative and antiangiogenic mechanisms," *Cancer Res.*, vol. 67, no. 9, pp. 4408–4417, May 2007, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-4443.

[216] R. Katayama, C. M. Lovly, and A. T. Shaw, "Therapeutic targeting of anaplastic lymphoma kinase in lung cancer: a paradigm for precision cancer medicine," *Clin. Cancer Res.*, vol. 21, no. 10, pp. 2227–2235, May 2015, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-14-2791.

[217] A. T. Shaw and B. Solomon, "Targeting anaplastic lymphoma kinase in lung cancer," *Clin. Cancer Res.*, vol. 17, no. 8, pp. 2081–2086, Apr. 2011, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-10-1591.

[218] B. J. Solomon *et al.*, " First-Line Crizotinib versus Chemotherapy in ALK -Positive Lung Cancer ," *N. Engl. J. Med.*, vol. 371, no. 23, pp. 2167–2177, Dec. 2014, doi: 10.1056/NEJMOA1408440/SUPPL_FILE/NEJMOA1408440_DISCLOSURES.PDF.

[219] A. Singh and H. Chen, "Optimal care for patients with anaplastic lymphoma kinase (Alk)–positive non–small cell lung cancer: A review on the role and utility of alk inhibitors," *Cancer Manag. Res.*, vol. 12, pp. 6615–6628, 2020, doi: 10.2147/CMAR.S260274.

[220] A. T. Shaw *et al.*, " First-Line Lorlatinib or Crizotinib in Advanced ALK -Positive Lung Cancer ," *N. Engl. J. Med.*, vol. 383, no. 21, pp. 2018–2029, Nov. 2020, doi: 10.1056/NEJMOA2027187/SUPPL_FILE/NEJMOA2027187_DATA-SHARING.PDF.

[221] Y. Pan, C. Deng, Z. Qiu, C. Cao, and F. Wu, "The Resistance Mechanisms and

Treatment Strategies for ALK-Rearranged Non-Small Cell Lung Cancer," *Front. Oncol.*, vol. 0, p. 3945, 2021, doi: 10.3389/FONC.2021.713530.

[222] S. Kim *et al.*, "Heterogeneity of genetic changes associated with acquired crizotinib resistance in ALK-rearranged lung cancer," *J. Thorac. Oncol.*, vol. 8, no. 4, pp. 415–422, Apr. 2013, doi: 10.1097/JTO.0b013e318283dcc0.

[223] X. Ai, X. Niu, L. Chang, R. Chen, S. H. I. Ou, and S. Lu, "Next generation sequencing reveals a novel ALK G1128A mutation resistant to crizotinib in an ALK-Rearranged NSCLC patient," *Lung Cancer*, vol. 123, pp. 83–86, Sep. 2018, doi: 10.1016/j.lungcan.2018.07.004.

[224] N. Yanagitani *et al.*, "Drug resistance mechanisms in Japanese anaplastic lymphoma kinase-positive non–small cell lung cancer and the clinical responses based on the resistant mechanisms," *Cancer Sci.*, vol. 111, no. 3, pp. 932–939, Mar. 2020, doi: 10.1111/CAS.14314.

[225] F. Dehghanian, M. Kay, and S. Vallian, "F1174V mutation alters the ALK active conformation in response to Crizotinib in NSCLC: Insight from molecular simulations," *J. Mol. Graph. Model.*, vol. 75, pp. 287–293, Aug. 2017, doi: 10.1016/J.JMGM.2017.06.010.

[226] S. Novello *et al.*, "Alectinib versus chemotherapy in crizotinibpretreated anaplastic lymphoma kinase (ALK)-positive non-small-cell lung cancer: Results from the phase III ALUR study," *Ann. Oncol.*, vol. 29, no. 6, pp. 1409–1416, Jun. 2018, doi: 10.1093/annonc/mdy121.

[227] A. T. Shaw *et al.*, "Ceritinib versus chemotherapy in patients with ALK-rearranged non-small-cell lung cancer previously given chemotherapy and crizotinib (ASCEND-5): a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial," *Lancet Oncol.*, vol. 18, no. 7, pp. 874–886, Jul. 2017, doi: 10.1016/S1470-2045(17)30339-X.

[228] Y. Yang *et al.*, "Efficacy, safety, and biomarker analysis of ensartinib in crizotinib-resistant, ALK-positive non-small-cell lung cancer: a multicentre, phase 2 trial," *Lancet Respir. Med.*, vol. 8, no. 1, pp. 45–53, Jan. 2020, doi: 10.1016/S2213-2600(19)30252-8.

[229] D. Ross Camidge *et al.*, "Exploratory analysis of brigatinib activity in patients with anaplastic lymphoma kinase-positive non–small-cell lung cancer and brain metastases in two clinical trials," *J. Clin. Oncol.*, vol. 36, no. 26, pp. 2693–2701, Sep. 2018, doi: 10.1200/JCO.2017.77.5841.

[230] R. Roskoski, "ROS1 protein-tyrosine kinase inhibitors in the treatment of ROS1 fusion protein-driven non-small cell lung cancers," *Pharmacol. Res.*, vol. 121, pp. 202–212, Jul. 2017, doi: 10.1016/J.PHRS.2017.04.022.

[231] V. M. Rimkunas *et al.*, "Analysis of receptor tyrosine kinase ROS1-positive tumors in non-small cell lung cancer: identification of a FIG-ROS1 fusion," *Clin. Cancer Res.*, vol. 18, no. 16, pp. 4449–4457, Aug. 2012, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-11-3351.

[232] I. Dagogo-Jack *et al.*, "Molecular Analysis of Plasma From Patients With ROS1-Positive NSCLC," *J. Thorac. Oncol.*, vol. 14, no. 5, pp. 816–824, May 2019, doi: 10.1016/J.JTHO.2019.01.009.

[233] Q. Zhang *et al.*, "Prevalence of ROS1 fusion in Chinese patients with non-small cell

lung cancer," *Thorac. cancer*, vol. 10, no. 1, pp. 47–53, Jan. 2019, doi: 10.1111/1759-7714.12899.

[234] K. D. Davies and R. C. Doebele, "Molecular pathways: ROS1 fusion proteins in cancer," *Clin. Cancer Res.*, vol. 19, no. 15, pp. 4040–4045, Aug. 2013, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-2851.

[235] L. Moliner and E. Arriola, "ROS1 non-small cell lung cancer patients treatment approach," *Precis. Cancer Med.*, vol. 4, no. 0, Sep. 2021, doi: 10.21037/PCM-20-38.

[236] K. Bergethon *et al.*, "ROS1 Rearrangements Define a Unique Molecular Class of Lung Cancers," *J. Clin. Oncol.*, vol. 30, no. 8, p. 863, Mar. 2012, doi: 10.1200/JCO.2011.35.6345.

[237] Q. Zhu, P. Zhan, X. Zhang, T. Lv, and Y. Song, "Clinicopathologic characteristics of patients with ROS1 fusion gene in non-small cell lung cancer: a meta-analysis," *Transl. lung cancer Res.*, vol. 4, no. 3, pp. 300–309, 2015, doi: 10.3978/J.ISSN.2218-6751.2015.05.01.

[238] A. Warth *et al.*, "ROS1 expression and translocations in non-small-cell lung cancer: clinicopathological analysis of 1478 cases," *Histopathology*, vol. 65, no. 2, pp. 187–194, 2014, doi: 10.1111/HIS.12379.

[239] S. Park *et al.*, "Characteristics and Outcome of ROS1-Positive Non-Small Cell Lung Cancer Patients in Routine Clinical Practice," *J. Thorac. Oncol.*, vol. 13, no. 9, pp. 1373–1382, Sep. 2018, doi: 10.1016/J.JTHO.2018.05.026.

[240] E. Park, Y. La Choi, M. J. Ahn, and J. Han, "Histopathologic characteristics of advanced-stage ROS1-rearranged non-small cell lung cancers," *Pathol. Res. Pract.*, vol. 215, no. 7, Jul. 2019, doi: 10.1016/J.PRP.2019.152441.

[241] A. Yoshida *et al.*, "ROS1-rearranged lung cancer: a clinicopathologic and molecular study of 15 surgical cases," *Am. J. Surg. Pathol.*, vol. 37, no. 4, pp. 554–562, Apr. 2013, doi: 10.1097/PAS.0B013E3182758FE6.

[242] A. T. Shaw *et al.*, "Crizotinib in ROS1-rearranged non-small-cell lung cancer," *N. Engl. J. Med.*, vol. 371, no. 21, pp. 1963–1971, Nov. 2014, doi: 10.1056/NEJMOA1406766.

[243] T. Patil *et al.*, "The Incidence of Brain Metastases in Stage IV ROS1-Rearranged Non-Small Cell Lung Cancer and Rate of Central Nervous System Progression on Crizotinib," *J. Thorac. Oncol.*, vol. 13, no. 11, pp. 1717–1726, Nov. 2018, doi: 10.1016/J.JTHO.2018.07.001.

[244] S. Gendarme, O. Bylicki, C. Chouaid, and F. Guisier, "ROS-1 Fusions in Non-Small-Cell Lung Cancer: Evidence to Date," *Curr. Oncol.*, vol. 29, no. 2, pp. 641–658, Feb. 2022, doi: 10.3390/CURRONCOL29020057.

[245] H. Mithoowani and M. Febbraro, "Non-Small-Cell Lung Cancer in 2022: A Review for General Practitioners in Oncology," *Curr. Oncol.*, vol. 29, no. 3, p. 1828, Mar. 2022, doi: 10.3390/CURRONCOL29030150.

[246] N. Yan, S. Guo, H. Zhang, Z. Zhang, S. Shen, and X. Li, "BRAF-Mutated Non-Small Cell Lung Cancer: Current Treatment Status and Future Perspective," *Front. Oncol.*, vol. 12, Mar. 2022, doi: 10.3389/FONC.2022.863043.

[247] J. S. Ross *et al.*, "The distribution of BRAF gene fusions in solid tumors and response to targeted therapy," *Int. J. cancer*, vol. 138, no. 4, pp. 881–890, Feb. 2016, doi: 10.1002/IJC.29825.

[248] T. Amaral *et al.*, "The mitogen-activated protein kinase pathway in melanoma part I - Activation and primary resistance mechanisms to BRAF inhibition," *Eur. J. Cancer*, vol. 73, pp. 85–92, Mar. 2017, doi: 10.1016/J.EJCA.2016.12.010.

[249] A. Marchetti *et al.*, "Clinical features and outcome of patients with non-small-cell lung cancer harboring BRAF mutations," *J. Clin. Oncol.*, vol. 29, no. 26, pp. 3574–3579, Sep. 2011, doi: 10.1200/JCO.2011.35.9638.

[250] B. Alvarez, J. G. Otterson, J. G. Bustamante Alvarez, and G. A. Otterson, "A continuous publication, open access, peer-reviewed journal Agents to treat BRAF-mutant lung cancer ACCESS ONLINE," doi: 10.7573/dic.212566.

[251] F. Liu, Y. Wei, H. Zhang, J. Jiang, P. Zhang, and Q. Chu, "NTRK Fusion in Non-Small Cell Lung Cancer: Diagnosis, Therapy, and TRK Inhibitor Resistance," *Front. Oncol.*, vol. 12, Mar. 2022, doi: 10.3389/FONC.2022.864666.

[252] G. Roviello *et al.*, "TRK fusion positive cancers: From first clinical data of a TRK inhibitor to future directions," *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, vol. 152, p. 103011, Aug. 2020, doi: 10.1016/J.CRITREVONC.2020.103011.

[253] A. Vaishnavi *et al.*, "Oncogenic and drug-sensitive NTRK1 rearrangements in lung cancer," *Nat. Med. 2013 1911*, vol. 19, no. 11, pp. 1469–1472, Oct. 2013, doi: 10.1038/nm.3352.

[254] C. Rolfo and L. Raez, "New targets bring hope in squamous cell lung cancer: neurotrophic tyrosine kinase gene fusions," *Lab. Investig. 2017 9711*, vol. 97, no. 11, pp. 1268–1270, Oct. 2017, doi: 10.1038/labinvest.2017.91.

[255] L. Marcus *et al.*, "FDA Approval Summary: Entrectinib for the Treatment of NTRK gene Fusion Solid Tumors," *Clin. Cancer Res.*, vol. 27, no. 4, pp. 928–933, Feb. 2021, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-20-2771.

[256] M. Takahashi, "RET receptor signaling: Function in development, metabolic disease, and cancer," *Proc. Jpn. Acad. Ser. B. Phys. Biol. Sci.*, vol. 98, no. 3, p. 112, Mar. 2022, doi: 10.2183/PJAB.98.008.

[257] C. Wang *et al.*, "RET fusions as primary oncogenic drivers and secondary acquired resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors in patients with non-small-cell lung cancer," *J. Transl. Med.*, vol. 20, no. 1, p. 390, Dec. 2022, doi: 10.1186/S12967-022-03593-3/FIGURES/4.

[258] E. Andrini *et al.*, "Non-small-cell lung cancer: how to manage RET-positive disease," *Drugs Context*, vol. 11, pp. 1–12, Jul. 2022, doi: 10.7573/DIC.2022-1-5.

[259] O. Gautschi *et al.*, "Targeting RET in Patients With RET-Rearranged Lung Cancers: Results From the Global, Multicenter RET Registry," *J. Clin. Oncol.*, vol. 35, no. 13, pp. 1403–1410, May 2017, doi: 10.1200/JCO.2016.70.9352.

[260] A. C. Tan *et al.*, "Molecular Characterization and Clinical Outcomes in RET-Rearranged NSCLC," *J. Thorac. Oncol.*, vol. 15, no. 12, pp. 1928–1934, Dec. 2020, doi: 10.1016/J.JTHO.2020.08.011.

[261] A. Drilon *et al.*, "Response to Cabozantinib in Patients with RET Fusion-Positive Lung Adenocarcinomas," *Cancer Discov.*, vol. 3, no. 6, p. 630, 2013, doi: 10.1158/2159-8290.CD-13-0035.

[262] S. J. Klempner *et al.*, "Emergence of RET rearrangement co-existing with activated EGFR mutation in EGFR-mutated NSCLC patients who had progressed on first- or second-generation EGFR TKI," *Lung Cancer*, vol. 89, no. 3, pp. 357–359, Sep. 2015, doi: 10.1016/J.LUNGCAN.2015.06.021.

[263] Z. Piotrowska *et al.*, "Landscape of Acquired Resistance to Osimertinib in EGFR-Mutant NSCLC and Clinical Validation of Combined EGFR and RET Inhibition with Osimertinib and BLU-667 for Acquired RET Fusion," *Cancer Discov.*, vol. 8, no. 12, pp. 1529–1539, Dec. 2018, doi: 10.1158/2159-8290.CD-18-1022.

[264] V. Subbiah *et al.*, "Selective RET kinase inhibition for patients with RET-altered cancers," *Ann. Oncol.*, vol. 29, no. 8, p. 1869, Aug. 2018, doi: 10.1093/ANNONC/MDY137.

[265] V. Subbiah *et al.*, "Structural basis of acquired resistance to selpercatinib and pralsetinib mediated by non-gatekeeper RET mutations," *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.*, vol. 32, no. 2, pp. 261–268, Feb. 2021, doi: 10.1016/J.ANNONC.2020.10.599.

[266] S. Giordano, C. Ponzetto, M. F. Di Renzo, C. S. Cooper, and P. M. Comoglio, "Tyrosine kinase receptor indistinguishable from the c-met protein," *Nature*, vol. 339, no. 6220, pp. 155–156, 1989, doi: 10.1038/339155A0.

[267] C. Birchmeier, W. Birchmeier, E. Gherardi, and G. F. Vande Woude, "Met, metastasis, motility and more," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 4, no. 12, pp. 915–925, Dec. 2003, doi: 10.1038/NRM1261.

[268] G. Skead and D. Govender, "Gene of the month: MET," *J. Clin. Pathol.*, vol. 68, no. 6, pp. 405–409, Jun. 2015, doi: 10.1136/JCLINPATH-2015-203050.

[269] S. L. Organ and M. S. Tsao, "An overview of the c-MET signaling pathway," *Ther. Adv. Med. Oncol.*, vol. 3, no. 1 Suppl, p. S7, 2011, doi: 10.1177/1758834011422556.

[270] G. Finocchiaro, L. Toschi, L. Gianoncelli, M. Baretti, and A. Santoro, "Prognostic and predictive value of MET deregulation in non-small cell lung cancer," *Ann. Transl. Med.*, vol. 3, no. 6, p. 83, Apr. 2015, doi: 10.3978/J.ISSN.2305-5839.2015.03.43.

[271] P. K. Paik *et al.*, "Response to MET inhibitors in patients with stage IV lung adenocarcinomas harboring MET mutations causing exon 14 skipping," *Cancer Discov.*, vol. 5, no. 8, pp. 842–850, Aug. 2015, doi: 10.1158/2159-8290.CD-14-1467.

[272] B. Guo, H. Cen, X. Tan, W. Liu, and Q. Ke, "Prognostic value of MET gene copy number and protein expression in patients with surgically resected non-small cell lung cancer: a meta-analysis of published literatures," *PLoS One*, vol. 9, no. 6, Jun. 2014, doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0099399.

[273] Z. Song, X. Wang, Y. Zheng, H. Su, and Y. Zhang, "MET Gene Amplification and Overexpression in Chinese Non-Small-Cell Lung Cancer Patients Without EGFR Mutations," *Clin. Lung Cancer*, vol. 18, no. 2, pp. 213-219.e2, Mar. 2017, doi: 10.1016/J.CLLC.2016.09.011.

[274] Y. L. Wu *et al.*, "Dacomitinib versus gefitinib as first-line treatment for patients with

EGFR-mutation-positive non-small-cell lung cancer (ARCHER 1050): a randomised, open-label, phase 3 trial," *Lancet. Oncol.*, vol. 18, no. 11, pp. 1454–1466, Nov. 2017, doi: 10.1016/S1470-2045(17)30608-3.

[275] F. Cappuzzo *et al.*, "Increased MET gene copy number negatively affects survival of surgically resected non-small-cell lung cancer patients," *J. Clin. Oncol.*, vol. 27, no. 10, pp. 1667–1674, Apr. 2009, doi: 10.1200/JCO.2008.19.1635.

[276] G. M. Frampton *et al.*, "Activation of MET via diverse exon 14 splicing alterations occurs in multiple tumor types and confers clinical sensitivity to MET inhibitors," *Cancer Discov.*, vol. 5, no. 8, pp. 850–860, Aug. 2015, doi: 10.1158/2159-8290.CD-15-0285.

[277] K. Okuda, H. Sasaki, H. Yukiue, M. Yano, and Y. Fujii, "Met gene copy number predicts the prognosis for completely resected non-small cell lung cancer," *Cancer Sci.*, vol. 99, no. 11, pp. 2280–2285, Nov. 2008, doi: 10.1111/J.1349-7006.2008.00916.X.

[278] K. Park *et al.*, "Afatinib versus gefitinib as first-line treatment of patients with EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (LUX-Lung 7): a phase 2B, open-label, randomised controlled trial," *Lancet. Oncol.*, vol. 17, no. 5, pp. 577–589, May 2016, doi: 10.1016/S1470-2045(16)30033-X.

[279] J. A. Engelman *et al.*, "MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling," *Science*, vol. 316, no. 5827, pp. 1039–1043, May 2007, doi: 10.1126/SCIENCE.1141478.

[280] C. R. Chong and P. A. Jänne, "The quest to overcome resistance to EGFR-targeted therapies in cancer," *Nat. Med. 2013 1911*, vol. 19, no. 11, pp. 1389–1400, Nov. 2013, doi: 10.1038/nm.3388.

[281] L. V. Sequist *et al.*, "Genotypic and Histological Evolution of Lung Cancers Acquiring Resistance to EGFR Inhibitors," *Sci. Transl. Med.*, vol. 3, no. 75, p. 75ra26, Mar. 2011, doi: 10.1126/SCITRANSLMED.3002003.

[282] H. A. Yu *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.*, vol. 19, no. 8, pp. 2240–2247, Apr. 2013, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-2246.

[283] A. Leonetti, S. Sharma, R. Minari, P. Perego, E. Giovannetti, and M. Tiseo, "Resistance mechanisms to osimertinib in EGFR-mutated non-small cell lung cancer," *Br. J. Cancer*, vol. 121, no. 9, pp. 725–737, Oct. 2019, doi: 10.1038/S41416-019-0573-8.

[284] X. Le *et al.*, "Landscape of EGFR-dependent and -independent resistance mechanisms to osimertinib and continuation therapy beyond progression in EGFR-mutant NSCLC," *Clin. Cancer Res.*, vol. 24, no. 24, pp. 6195–6203, Dec. 2018, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-18-1542/74089/AM/LANDSCAPE-OF-EGFR-DEPENDENT-AND-INDEPENDENT.

[285] A. Michelotti, M. de Scordilli, E. Bertoli, E. De Carlo, A. Del Conte, and A. Bearz, "NSCLC as the Paradigm of Precision Medicine at Its Finest: The Rise of New Druggable Molecular Targets for Advanced Disease," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 23, no. 12, Jun. 2022, doi: 10.3390/IJMS23126748.

[286] P. C. Ma *et al.*, "Functional expression and mutations of c-Met and its therapeutic

inhibition with SU11274 and small interfering RNA in non-small cell lung cancer," *Cancer Res.*, vol. 65, no. 4, pp. 1479–1488, Feb. 2005, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-2650.

[287] J. H. Kim, H. S. Kim, and B. J. Kim, "Prognostic value of MET copy number gain in non-small-cell lung cancer: An updated meta-analysis," *J. Cancer*, vol. 9, no. 10, pp. 1836–1845, 2018, doi: 10.7150/JCA.24980.

[288] J. H. Tong *et al.*, "MET amplification and exon 14 splice site mutation define unique molecular subgroups of non-small cell lung carcinoma with poor prognosis," *Clin. Cancer Res.*, vol. 22, no. 12, pp. 3048–3056, Jun. 2016, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-15-2061/128624/AM/MET-AMPLIFICATION-AND-EXON-14-SPLICE-SITE-MUTATION.

[289] C. H. Gow, M. S. Hsieh, S. G. Wu, and J. Y. Shih, "A comprehensive analysis of clinical outcomes in lung cancer patients harboring a MET exon 14 skipping mutation compared to other driver mutations in an East Asian population," *Lung Cancer*, vol. 103, pp. 82–89, Jan. 2017, doi: 10.1016/J.LUNGCAN.2016.12.001.

[290] R. Onozato, T. Kosaka, H. Kuwano, Y. Sekido, Y. Yatabe, and T. Mitsudomi, "Activation of MET by gene amplification or by splice mutations deleting the juxtamembrane domain in primary resected lung cancers," *J. Thorac. Oncol.*, vol. 4, no. 1, pp. 5–11, 2009, doi: 10.1097/JTO.0B013E3181913E0E.

[291] M. M. Awad *et al.*, "MET exon 14 mutations in Non-small-cell lung cancer are associated with advanced age and stage-dependent MET genomic amplification and c-Met overexpression," *J. Clin. Oncol.*, vol. 34, no. 7, pp. 721–730, Mar. 2016, doi: 10.1200/JCO.2015.63.4600.

[292] K. Suzawa *et al.*, "Acquired MET Exon 14 Alteration Drives Secondary Resistance to Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitor in EGFR-Mutated Lung Cancer," *JCO Precis. Oncol.*, vol. 3, no. 3, pp. 1–8, Dec. 2019, doi: 10.1200/PO.19.00011.

[293] F. Pinquie *et al.*, "A Case Report of Successful Treatment With Crizotinib to Overcome Resistance to Osimertinib in an EGFR Mutated Non-Small-Cell Lung Cancer Patient Harboring an Acquired MET Exon 14 Mutation," *Clin. Lung Cancer*, vol. 23, no. 2, pp. e131–e134, Mar. 2022, doi: 10.1016/J.CLLC.2021.06.002.

[294] O. Bylicki, N. Paleiron, J. B. Assié, and C. Chouaïd, "Targeting the MET-Signaling Pathway in Non-Small-Cell Lung Cancer: Evidence to Date," *Onco. Targets. Ther.*, vol. 13, pp. 5691–5706, 2020, doi: 10.2147/OTT.S219959.

[295] M. Hajdúch, S. Jančík, J. Drábek, and D. Radzioch, "Clinical relevance of KRAS in human cancers," *J. Biomed. Biotechnol.*, vol. 2010, 2010, doi: 10.1155/2010/150960.

[296] R. C. O'Hagan and J. Heyer, "KRAS Mouse Models: Modeling Cancer Harboring KRAS Mutations," *Genes Cancer*, vol. 2, no. 3, pp. 334–343, Mar. 2011, doi: 10.1177/1947601911408080.

[297] S. Schubbert, K. Shannon, and G. Bollag, "Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 7, no. 4, pp. 295–308, Apr. 2007, doi: 10.1038/NRC2109.

[298] K. Suda, K. Tomizawa, and T. Mitsudomi, "Biological and clinical significance of

KRAS mutations in lung cancer: an oncogenic driver that contrasts with EGFR mutation," *Cancer Metastasis Rev.*, vol. 29, no. 1, pp. 49–60, Mar. 2010, doi: 10.1007/S10555-010-9209-4.

[299] R. Rosell *et al.*, "Predictive biomarkers in the management of EGFR mutant lung cancer," *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 1210, no. 1, pp. 45–52, 2010, doi: 10.1111/J.1749-6632.2010.05775.X.

[300] N. Tsuchida, T. Ryder, and E. Ohtsubo, "Nucleotide sequence of the oncogene encoding the p21 transforming protein of Kirsten murine sarcoma virus," *Science*, vol. 217, no. 4563, pp. 937–939, 1982, doi: 10.1126/SCIENCE.6287573.

[301] H. Chen and J. Zhao, "KRAS oncogene may be another target conquered in non-small cell lung cancer (NSCLC)," *Thorac. cancer*, vol. 11, no. 12, pp. 3425–3435, Dec. 2020, doi: 10.1111/1759-7714.13538.

[302] V. Merz *et al.*, "Targeting KRAS: The Elephant in the Room of Epithelial Cancers," *Front. Oncol.*, vol. 11, Mar. 2021, doi: 10.3389/FONC.2021.638360.

[303] W. Gao *et al.*, "KRAS and TP53 mutations in bronchoscopy samples from former lung cancer patients," *Mol. Carcinog.*, vol. 56, no. 2, pp. 381–388, Feb. 2017, doi: 10.1002/MC.22501.

[304] I. Ferrer, J. Zugazagoitia, S. Herbertz, W. John, L. Paz-Ares, and G. Schmid-Bindert, "KRAS-Mutant non-small cell lung cancer: From biology to therapy," *Lung Cancer*, vol. 124, pp. 53–64, Oct. 2018, doi: 10.1016/J.LUNGCAN.2018.07.013.

[305] C. C. Pritchard, L. Akagi, P. L. Reddy, L. Joseph, and J. F. Tait, "COLD-PCR enhanced melting curve analysis improves diagnostic accuracy for KRAS mutations in colorectal carcinoma," *BMC Clin. Pathol.*, vol. 10, p. 6, 2010, doi: 10.1186/1472-6890-10-6.

[306] W. A. Franklin, J. Haney, M. Sugita, L. Bemis, A. Jimeno, and W. A. Messersmith, "KRAS Mutation: Comparison of Testing Methods and Tissue Sampling Techniques in Colon Cancer," *J. Mol. Diagn.*, vol. 12, no. 1, p. 43, 2010, doi: 10.2353/JMOLDX.2010.080131.

[307] P. Tomasini, P. Walia, C. Labbe, K. Jao, and N. B. Leighl, "Targeting the KRAS Pathway in Non-Small Cell Lung Cancer," *Oncologist*, vol. 21, no. 12, pp. 1450–1460, Dec. 2016, doi: 10.1634/THEONCOLOGIST.2015-0084.

[308] B. Gyorffy and R. Schafer, "Biomarkers downstream of RAS: a search for robust transcriptional targets," *Curr. Cancer Drug Targets*, vol. 10, no. 8, pp. 858–868, Nov. 2010, doi: 10.2174/156800910793357916.

[309] J. A. McCubrey *et al.*, "Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1773, no. 8, pp. 1263–1284, Aug. 2007, doi: 10.1016/J.BBAMCR.2006.10.001.

[310] G. De Maglio *et al.*, "The storm of NGS in NSCLC diagnostic-therapeutic pathway: How to sun the real clinical practice," *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, vol. 169, Jan. 2022, doi: 10.1016/J.CRITREVONC.2021.103561.

[311] E. Borràs *et al.*, "Clinical pharmacogenomic testing of KRAS, BRAF and EGFR mutations by high resolution melting analysis and ultra-deep pyrosequencing," *BMC Cancer*, vol. 11, no. 1, pp. 1–10, Sep. 2011, doi: 10.1186/1471-2407-11-

406/FIGURES/4.

[312] A. Spagnuolo, P. Maione, and C. Gridelli, "The treatment of advanced non-small cell lung cancer harboring KRAS mutation: a new class of drugs for an old target—a narrative review," *Transl. Lung Cancer Res.*, vol. 11, no. 6, pp. 1199–1216, Jun. 2022, doi: 10.21037/TLCR-21-948/COIF.

[313] R. Chen *et al.*, "MA 07.13 NGS Sequencing Based Liquid / Tissue Biopsy Identified Coexistence of HER2 Amplification and Mutation in Advanced NSCLC Patients," *J. Thorac. Oncol.*, vol. 12, no. 11, p. S1830, Nov. 2017, doi: 10.1016/J.JTHO.2017.09.513.

[314] B. T. Li *et al.*, "HER2 Amplification and HER2 Mutation Are Distinct Molecular Targets in Lung Cancers," *J. Thorac. Oncol.*, vol. 11, no. 3, pp. 414–419, Mar. 2016, doi: 10.1016/J.JTHO.2015.10.025.

[315] J. Mazières *et al.*, "Lung cancer that harbors an HER2 mutation: epidemiologic characteristics and therapeutic perspectives," *J. Clin. Oncol.*, vol. 31, no. 16, pp. 1997–2003, Jun. 2013, doi: 10.1200/JCO.2012.45.6095.

[316] D. Y. Oh and Y. J. Bang, "HER2-targeted therapies - a role beyond breast cancer," *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, vol. 17, no. 1, pp. 33–48, Jan. 2020, doi: 10.1038/S41571-019-0268-3.

[317] S. Kuyama *et al.*, "Impact of HER2 gene and protein status on the treatment outcome of cisplatin-based chemoradiotherapy for locally advanced non-small cell lung cancer," *J. Thorac. Oncol.*, vol. 3, no. 5, pp. 477–482, 2008, doi: 10.1097/JTO.0B013E31816E2EA3.

[318] A. Yoshizawa *et al.*, "HER2 status in lung adenocarcinoma: a comparison of immunohistochemistry, fluorescence in situ hybridization (FISH), dual-ISH, and gene mutations," *Lung Cancer*, vol. 85, no. 3, pp. 373–378, 2014, doi: 10.1016/J.LUNGCAN.2014.06.007.

[319] R. N. Pillai *et al.*, "HER2 Mutations in Lung Adenocarcinomas: A Report from the Lung Cancer Mutation Consortium," *Cancer*, vol. 123, no. 21, p. 4099, Nov. 2017, doi: 10.1002/CNCR.30869.

[320] X. W. Wei *et al.*, "Mutational landscape and characteristics of ERBB2 in non-small cell lung cancer," *Thorac. cancer*, vol. 11, no. 6, pp. 1512–1521, Jun. 2020, doi: 10.1111/1759-7714.13419.

[321] K. Ninomiya *et al.*, "A Prospective Cohort Study to Define the Clinical Features and Outcome of Lung Cancers Harboring HER2 Aberration in Japan (HER2-CS STUDY)," *Chest*, vol. 156, no. 2, pp. 357–366, Aug. 2019, doi: 10.1016/J.CHEST.2019.01.011.

[322] M. Offin *et al.*, "Frequency and Outcomes of Brain Metastases in Patients With HER2-Mutant Lung Cancers," *Cancer*, vol. 125, no. 24, p. 4380, Dec. 2019, doi: 10.1002/CNCR.32461.

[323] X. Huang *et al.*, "The efficacy of ado-trastuzumab emtansine in patients with ERBB2-aberrant non-small cell lung cancer: a systematic review," *Transl. Cancer Res.*, vol. 9, no. 8, pp. 4507–4516, Aug. 2020, doi: 10.21037/TCR-19-2759.

[324] A. Friedlaender *et al.*, "EGFR and HER2 exon 20 insertions in solid tumours: from biology to treatment," *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, vol. 19, no. 1, pp. 51–69, Jan. 2022, doi:

10.1038/S41571-021-00558-1.

[325] L. Liu *et al.*, "The role of human epidermal growth factor receptor 2 as a prognostic factor in lung cancer: a meta-analysis of published data," *J. Thorac. Oncol.*, vol. 5, no. 12, pp. 1922–1932, 2010, doi: 10.1097/JTO.0B013E3181F26266.

[326] S. Ren *et al.*, "Consensus for HER2 alterations testing in non-small-cell lung cancer," *ESMO Open*, vol. 7, no. 1, Feb. 2022, doi: 10.1016/J.ESMOOP.2022.100395.

[327] X. Yu, X. Ji, and C. Su, "HER2-Altered Non-Small Cell Lung Cancer: Biology, Clinicopathologic Features, and Emerging Therapies," *Front. Oncol.*, vol. 12, Mar. 2022, doi: 10.3389/FONC.2022.860313.

[328] P. Villalobos and I. I. Wistuba, "Lung Cancer Biomarkers," *Hematol. Oncol. Clin. North Am.*, vol. 31, no. 1, p. 13, Feb. 2017, doi: 10.1016/J.HOC.2016.08.006.

[329] F. Bray, J. Ferlay, I. Soerjomataram, R. L. Siegel, L. A. Torre, and A. Jemal, "Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries," *CA. Cancer J. Clin.*, vol. 68, no. 6, pp. 394–424, Nov. 2018, doi: 10.3322/CAAC.21492.

[330] H. Sung *et al.*, "Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries," *CA. Cancer J. Clin.*, vol. 71, no. 3, pp. 209–249, May 2021, doi: 10.3322/CAAC.21660.

[331] T. Chen *et al.*, "Age at diagnosis is a heterogeneous factor for non-small cell lung cancer patients," *J. Thorac. Dis.*, vol. 11, no. 6, pp. 2251–2266, Jun. 2019, doi: 10.21037/JTD.2019.06.24.

[332] Q. Yu *et al.*, "Predictive Risk Factors for Early Recurrence of Stage pIIIA-N2 Non-Small Cell Lung Cancer," *Cancer Manag. Res.*, vol. 13, p. 8651, 2021, doi: 10.2147/CMAR.S337830.

[333] A. Basi, F. Khaledi, M. H. K. Niya, H. Rezvani, and N. Rakhshani, "Epidermal Growth Factor Receptor Mutations in Lung Adenocarcinomas: A Single Center Study from Iran," *Asian Pac. J. Cancer Prev.*, vol. 19, no. 1, p. 111, Jan. 2018, doi: 10.22034/APJCP.2018.19.1.111.

[334] A. Thomas, Y. Chen, T. Yu, M. Jakopovic, and G. Giaccone, "Trends and Characteristics of Young Non-Small Cell Lung Cancer Patients in the United States," *Front. Oncol.*, vol. 5, no. MAY, 2015, doi: 10.3389/FONC.2015.00113.

[335] S. Ekman *et al.*, "Epidemiology and Survival Outcomes for Patients With NSCLC in Scandinavia in the Preimmunotherapy Era: A SCAN-LEAF Retrospective Analysis From the I-O Optimise Initiative," *JTO Clin. Res. Reports*, vol. 2, no. 5, p. 100165, May 2021, doi: 10.1016/J.JTOCRR.2021.100165.

[336] T. H. Gebremariam *et al.*, "Clinical Characteristics and Molecular Profiles of Lung Cancer in Ethiopia," *JTO Clin. Res. Reports*, vol. 2, no. 7, Jul. 2021, doi: 10.1016/J.JTOCRR.2021.100196.

[337] K. Y. Belmokhtar *et al.*, "Lung cancer in eastern morocco: Where do we stand?," *Pan Afr. Med. J.*, vol. 34, 2019, doi: 10.11604/PAMJ.2019.34.177.19934.

[338] L. Willén *et al.*, "Are older patients with non-small cell lung cancer receiving optimal care? A population-based study," *Acta Oncol.*, vol. 61, no. 3, pp. 309–317, 2022, doi:

10.1080/0284186X.2021.2000637.

[339] M. Malvezzi *et al.*, "European cancer mortality predictions for the year 2015: does lung cancer have the highest death rate in EU women?," *Ann. Oncol.*, vol. 26, no. 4, pp. 779–786, Apr. 2015, doi: 10.1093/ANNONC/MDV001.

[340] L. Tamási *et al.*, "Age and Gender Specific Lung Cancer Incidence and Mortality in Hungary: Trends from 2011 Through 2016," *Pathol. Oncol. Res.*, vol. 27, Apr. 2021, doi: 10.3389/PORE.2021.598862/FULL.

[341] S. McGuire, "World Cancer Report 2014. Geneva, Switzerland: World Health Organization, International Agency for Research on Cancer, WHO Press, 2015," *Adv. Nutr.*, vol. 7, no. 2, pp. 418–419, 2016, doi: 10.3945/AN.116.012211.

[342] R. L. Siegel, K. D. Miller, and A. Jemal, "Cancer statistics, 2018," *CA. Cancer J. Clin.*, vol. 68, no. 1, pp. 7–30, Jan. 2018, doi: 10.3322/CAAC.21442.

[343] P. Zhang *et al.*, "Association of smoking and polygenic risk with the incidence of lung cancer: a prospective cohort study," *Br. J. Cancer 2022 12611*, vol. 126, no. 11, pp. 1637–1646, Feb. 2022, doi: 10.1038/s41416-022-01736-3.

[344] S. Popat *et al.*, "Association Between Smoking History and Overall Survival in Patients Receiving Pembrolizumab for First-Line Treatment of Advanced Non–Small Cell Lung Cancer," *JAMA Netw. Open*, vol. 5, no. 5, pp. e2214046–e2214046, May 2022, doi: 10.1001/JAMANETWORKOPEN.2022.14046.

[345] J. Ferlay *et al.*, "Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012," *Int. J. Cancer*, vol. 136, no. 5, pp. E359–E386, Mar. 2015, doi: 10.1002/IJC.29210.

[346] P. Richter, T. Pechacek, M. Swahn, and V. Wagman, "Reducing Levels of Toxic Chemicals in Cigarette Smoke: A New Healthy People 2010 Objective," *Public Health Rep.*, vol. 123, no. 1, p. 30, 2008, doi: 10.1177/003335490812300105.

[347] P. Jha *et al.*, "21st-Century Hazards of Smoking and Benefits of Cessation in the United States," *N. Engl. J. Med.*, vol. 368, no. 4, pp. 341–350, Jan. 2013, doi: 10.1056/NEJMSA1211128/SUPPL_FILE/NEJMSA1211128_DISCLOSURES.PDF.

[348] J. Sen Tseng *et al.*, "Association of Smoking With Patient Characteristics and Outcomes in Small Cell Lung Carcinoma, 2011-2018," *JAMA Netw. Open*, vol. 5, no. 3, Mar. 2022, doi: 10.1001/JAMANETWORKOPEN.2022.4830.

[349] D. A. Siegel, S. A. Fedewa, S. J. Henley, L. A. Pollack, and A. Jemal, "Proportion of Never Smokers Among Men and Women With Lung Cancer in 7 US States," *JAMA Oncol.*, vol. 7, no. 2, pp. 302–304, Feb. 2021, doi: 10.1001/JAMAONCOL.2020.6362.

[350] S. S. Birring and M. D. Peake, "Symptoms and the early diagnosis of lung cancer," *Thorax*, vol. 60, no. 4, pp. 268–269, Apr. 2005, doi: 10.1136/THX.2004.032698.

[351] J. Corner, J. Hopkinson, D. Fitzsimmons, S. Barclay, and M. Muers, "Is late diagnosis of lung cancer inevitable? Interview study of patients' recollections of symptoms before diagnosis," *Thorax*, vol. 60, no. 4, pp. 314–319, Apr. 2005, doi: 10.1136/THX.2004.029264.

[352] W. Hamilton, T. J. Peters, A. Round, and D. Sharp, "What are the clinical features of lung cancer before the diagnosis is made? A population based case-control study,"

Thorax, vol. 60, no. 12, pp. 1059–1065, Dec. 2005, doi: 10.1136/THX.2005.045880.

[353] A. Rittmeyer *et al.*, "Health-related quality of life in patients with advanced nonsquamous non-small-cell lung cancer receiving bevacizumab or bevacizumab-plus-pemetrexed maintenance therapy in AVAPERL (MO22089)," *J. Thorac. Oncol.*, vol. 8, no. 11, pp. 1409–1416, 2013, doi: 10.1097/JTO.0B013E3182A46BCF.

[354] G. Sandeman and M. Wells, "The meaning and significance of routine follow-up in lung cancer - a qualitative study of patients' experiences and interpretations," *Eur. J. Oncol. Nurs.*, vol. 15, no. 4, pp. 339–346, Sep. 2011, doi: 10.1016/J.EJON.2010.09.003.

[355] F. M. Walter *et al.*, "Symptoms and other factors associated with time to diagnosis and stage of lung cancer: a prospective cohort study," *Br. J. Cancer*, vol. 112 Suppl 1, no. Suppl 1, pp. S6–S13, 2015, doi: 10.1038/BJC.2015.30.

[356] P. Y. Xing *et al.*, "What are the clinical symptoms and physical signs for non-small cell lung cancer before diagnosis is made? A nation-wide multicenter 10-year retrospective study in China," *Cancer Med.*, vol. 8, no. 8, pp. 4055–4069, Jul. 2019, doi: 10.1002/CAM4.2256.

[357] G. Cadelis, S. Kaddah, B. Bhakkan, M. Quellery, and J. Deloumeaux, "Épidémiologie et incidence du cancer bronchique primitif dans une région a faible consommation tabagique: la Guadeloupe. Données 2008-2009 du registre des cancers," *Rev. Mal. Respir.*, vol. 30, no. 7, pp. 537–548, 2013, doi: 10.1016/j.rmr.2013.01.010.

[358] B. Jia *et al.*, "Survival comparison of right and left side non-small cell lung cancer in stage I–IIIA patients: A Surveillance Epidemiology and End Results (SEER) analysis," *Thorac. Cancer*, vol. 10, no. 3, p. 459, Mar. 2019, doi: 10.1111/1759-7714.12959.

[359] A. McWilliam, E. Vasquez Osorio, C. Faivre-Finn, and M. van Herk, "Influence of tumour laterality on patient survival in non-small cell lung cancer after radiotherapy," *Radiother. Oncol.*, vol. 137, pp. 71–76, Aug. 2019, doi: 10.1016/J.RADONC.2019.04.022.

[360] A. Oikawa, H. Takahashi, H. Ishikawa, K. Kurishima, K. Kagohashi, and H. Satoh, "Application of conditional probability analysis to distant metastases from lung cancer," *Oncol. Lett.*, vol. 3, no. 3, pp. 629–634, Mar. 2012, doi: 10.3892/OL.2011.535/HTML.

[361] P. Acar, M. Unsal, and N. Altintas, "Evaluation of lung cancer patients with distant organ metastasis," *Eur. Respir. J.*, vol. 44, no. Suppl 58, 2014.

[362] X. Wang *et al.*, "Patterns of Extrathoracic Metastases in Different Histological Types of Lung Cancer," *Front. Oncol.*, vol. 10, p. 715, May 2020, doi: 10.3389/FONC.2020.00715/BIBTEX.

[363] M. Riihimäki *et al.*, "Metastatic sites and survival in lung cancer," *Lung Cancer*, vol. 86, no. 1, pp. 78–84, Oct. 2014, doi: 10.1016/J.LUNGCAN.2014.07.020.

[364] W. D. Travis *et al.*, "Evolving concepts in the pathology and computed tomography imaging of lung adenocarcinoma and bronchioloalveolar carcinoma," *J. Clin. Oncol.*, vol. 23, no. 14, pp. 3279–3287, 2005, doi: 10.1200/JCO.2005.15.776.

[365] W. D. Travis, E. Brambilla, A. P. Burke, A. Marx, and A. G. Nicholson, "Introduction to The 2015 World Health Organization Classification of Tumors of the Lung, Pleura,

Thymus, and Heart," *J. Thorac. Oncol.*, vol. 10, no. 9, pp. 1240–1242, Sep. 2015, doi: 10.1097/JTO.0000000000000663.

[366] H. Zhang *et al.*, "The Prognostic Value of Non-Predominant Micropapillary Pattern in a Large Cohort of Resected Invasive Lung Adenocarcinoma Measuring ≤3 cm," *Front. Oncol.*, vol. 11, p. 1402, May 2021, doi: 10.3389/FONC.2021.657506/BIBTEX.

[367] A. L. Moreira *et al.*, "A Grading System for Invasive Pulmonary Adenocarcinoma: A Proposal From the International Association for the Study of Lung Cancer Pathology Committee," *J. Thorac. Oncol.*, vol. 15, no. 10, pp. 1599–1610, Oct. 2020, doi: 10.1016/J.JTHO.2020.06.001.

[368] B. Angulo *et al.*, "A comparison of EGFR mutation testing methods in lung carcinoma: direct sequencing, real-time PCR and immunohistochemistry," *PLoS One*, vol. 7, no. 8, Aug. 2012, doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0043842.

[369] F. Lopez-Rios *et al.*, "Comparison of molecular testing methods for the detection of EGFR mutations in formalin-fixed paraffin-embedded tissue specimens of non-small cell lung cancer," *J. Clin. Pathol.*, vol. 66, no. 5, pp. 381–385, May 2013, doi: 10.1136/JCLINPATH-2012-201240.

[370] C. O'Leary *et al.*, "Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR)-Mutated Non-Small-Cell Lung Cancer (NSCLC)," *Pharmaceuticals*, vol. 13, no. 10, pp. 1–16, Oct. 2020, doi: 10.3390/PH13100273.

[371] A. Gower, Y. Wang, and G. Giaccone, "Oncogenic drivers, targeted therapies, and acquired resistance in non-small-cell lung cancer," *J. Mol. Med. (Berl).*, vol. 92, no. 7, p. 697, 2014, doi: 10.1007/S00109-014-1165-Y.

[372] C. E. Steuer *et al.*, "Role of race in oncogenic driver prevalence and outcomes in lung adenocarcinoma: Results from the Lung Cancer Mutation Consortium," *Cancer*, vol. 122, no. 5, pp. 766–772, Mar. 2016, doi: 10.1002/CNCR.29812.

[373] O. Arrieta *et al.*, "Updated frequency of EGFR and KRAS mutations in NonSmall-cell lung cancer in Latin America: The Latin-American consortium for the investigation of lung cancer (CLICaP)," *J. Thorac. Oncol.*, vol. 10, no. 5, pp. 838–843, May 2015, doi: 10.1097/JTO.0000000000000481/ATTACHMENT/9821D514-DD42-4AC1-8E4B-DBED657EA0B1/MMC2.DOCX.

[374] N. Berois, D. Touya, L. Ubillos, B. Bertoni, E. Osinaga, and M. Varangot, "Prevalence of EGFR Mutations in Lung Cancer in Uruguayan Population," *J. Cancer Epidemiol.*, vol. 2017, 2017, doi: 10.1155/2017/6170290.

[375] Y. L. Zhang *et al.*, "The prevalence of EGFR mutation in patients with non-small cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis," *Oncotarget*, vol. 7, no. 48, p. 78985, Nov. 2016, doi: 10.18632/ONCOTARGET.12587.

[376] M. Lemine Sow *et al.*, "Frequency and types of EGFR mutations in Moroccan patients with non-small cell lung cancer," *Tumori*, vol. 107, no. 4, pp. 335–340, Aug. 2021, doi: 10.1177/0300891620964571.

[377] A. Midha, S. Dearden, and R. McCormack, "EGFR mutation incidence in non-small-cell lung cancer of adenocarcinoma histology: a systematic review and global map by ethnicity (mutMapII)," *Am. J. Cancer Res.*, vol. 5, no. 9, p. 2892, 2015, Accessed: Jun. 28, 2022. [Online]. Available: /pmc/articles/PMC4633915/.

[378] L. Ding *et al.*, "Somatic mutations affect key pathways in lung adenocarcinoma," *Nat. 2008 4557216*, vol. 455, no. 7216, pp. 1069–1075, Oct. 2008, doi: 10.1038/nature07423.

[379] H. Shigematsu *et al.*, "Clinical and biological features associated with epidermal growth factor receptor gene mutations in lung cancers," *J. Natl. Cancer Inst.*, vol. 97, no. 5, pp. 339–346, 2005, doi: 10.1093/jnci/dji055.

[380] J. M. Brannan *et al.*, "Expression of the receptor tyrosine kinase EphA2 is increased in smokers and predicts poor survival in non-small cell lung cancer," *Clin. Cancer Res.*, vol. 15, no. 13, pp. 4423–4430, Jul. 2009, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-09-0473.

[381] D. Doval *et al.*, "Epidermal growth factor receptor mutation in lung adenocarcinoma in India: A single center study," *J. Carcinog.*, vol. 12, Jan. 2013, doi: 10.4103/1477-3163.114970.

[382] C. E. Bacchi, H. Ciol, E. M. Queiroga, L. C. Benine, L. H. Silva, and E. B. Ojopi, "Epidermal growth factor receptor and KRAS mutations in Brazilian lung cancer patients," *Clinics*, vol. 67, no. 5, p. 419, 2012, doi: 10.6061/CLINICS/2012(05)03.

[383] Z. Benbrahim, T. Antonia, and N. Mellas, "EGFR mutation frequency in Middle East and African non-small cell lung cancer patients: A systematic review and meta-analysis," *BMC Cancer*, vol. 18, no. 1, pp. 1–6, Sep. 2018, doi: 10.1186/S12885-018-4774-Y/TABLES/6.

[384] X. Zhou *et al.*, "Analyzing EGFR mutations and their association with clinicopathological characteristics and prognosis of patients with lung adenocarcinoma," *Oncol. Lett.*, vol. 16, no. 1, pp. 362–370, Jul. 2018, doi: 10.3892/OL.2018.8681/HTML.

[385] Y. Shi *et al.*, "Molecular Epidemiology of EGFR Mutations in Asian Patients with Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer of Adenocarcinoma Histology – Mainland China Subset Analysis of the PIONEER study," *PLoS One*, vol. 10, no. 11, p. 143515, Nov. 2015, doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0143515.

[386] W. Hong, Q. Wu, J. Zhang, and Y. Zhou, "Prognostic value of EGFR 19-del and 21-L858R mutations in patients with non-small cell lung cancer," *Oncol. Lett.*, vol. 18, no. 4, p. 3887, 2019, doi: 10.3892/OL.2019.10715.

[387] S. Wang and Z. Wang, "EGFR mutations in patients with non-small cell lung cancer from mainland China and their relationships with clinicopathological features: a meta-analysis," *Int. J. Clin. Exp. Med.*, vol. 7, no. 8, p. 1967, Aug. 2014, Accessed: Mar. 23, 2022. [Online]. Available: /pmc/articles/PMC4161537/.

[388] P. Gaur, S. Bhattacharya, S. Kant, R. A. S. Kushwaha, G. Singh, and S. Pandey, "EGFR Mutation Detection and Its Association With Clinicopathological Characters of Lung Cancer Patients," *World J. Oncol.*, vol. 9, no. 5–6, pp. 151–155, 2018, doi: 10.14740/WJON1167.

[389] S. Gahr *et al.*, "EGFR mutational status in a large series of Caucasian European NSCLC patients: data from daily practice," *Br. J. Cancer*, vol. 109, no. 7, p. 1821, Oct. 2013, doi: 10.1038/BJC.2013.511.

[390] H. J. Lee *et al.*, "Epidermal growth factor receptor mutation in lung adenocarcinomas: relationship with CT characteristics and histologic subtypes," *Radiology*, vol. 268, no.

1, pp. 254–264, Jul. 2013, doi: 10.1148/RADIOL.13112553.

[391] A. Brindel *et al.*, "Uncommon EGFR mutations in lung adenocarcinoma: features and response to tyrosine kinase inhibitors," *J. Thorac. Dis.*, vol. 12, no. 9, p. 4643, Sep. 2020, doi: 10.21037/JTD-19-3790.

[392] Q. Zhang, Y. Cui, J. Zhang, J. Kenjiabieke, and P. Aerxiding, "Comparison of the characteristics of uncommon epidermal growth factor receptor (EGFR) mutations and EGFR-tyrosine kinase inhibitor treatment in patients with non-small cell lung cancer from different ethnic groups," *Exp. Ther. Med.*, vol. 19, no. 6, Mar. 2020, doi: 10.3892/ETM.2020.8612.

[393] J. C. H. Yang *et al.*, "Afatinib for the Treatment of NSCLC Harboring Uncommon EGFR Mutations: A Database of 693 Cases," *J. Thorac. Oncol.*, vol. 15, no. 5, pp. 803–815, May 2020, doi: 10.1016/J.JTHO.2019.12.126/ATTACHMENT/D8D91430-94E3-44B2-95A2-8E8DDFDE1326/MMC1.DOCX.

[394] J. Y. Wu, C. J. Yu, Y. C. Chang, C. H. Yang, J. Y. Shih, and P. C. Yang, "Effectiveness of tyrosine kinase inhibitors on 'uncommon' epidermal growth factor receptor mutations of unknown clinical significance in non-small cell lung cancer," *Clin. Cancer Res.*, vol. 17, no. 11, pp. 3812–3821, Jun. 2011, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-10-3408/84306/AM/EFFECTIVENESS-OF-TYROSINE-KINASE-INHIBITORS-ON.

[395] S. Kobayashi *et al.*, "Compound EGFR mutations and response to EGFR tyrosine kinase inhibitors," *J. Thorac. Oncol.*, vol. 8, no. 1, pp. 118–122, 2013, doi: 10.1097/JTO.0B013E3182781E35.

[396] E. Young Kim *et al.*, "Compound EGFR mutation is frequently detected with co-mutations of actionable genes and associated with poor clinical outcome in lung adenocarcinoma," *Cancer Biol. Ther.*, vol. 17, 2016, doi: 10.1080/15384047.2016.1139235.

[397] K. Leventakos, B. R. Kipp, K. M. Rumilla, J. L. Winters, E. S. Yi, and A. S. Mansfield, "Brief Report: S768I mutation in EGFR in patients with lungcancer," *J. Thorac. Oncol.*, vol. 11, no. 10, p. 1798, 2016, doi: 10.1016/J.JTHO.2016.05.007.

[398] G. R. Oxnard *et al.*, "Natural History and Molecular Characteristics of Lung Cancers Harboring EGFR Exon 20 Insertions," *J. Thorac. Oncol.*, vol. 8, no. 2, pp. 179–184, Feb. 2013, doi: 10.1097/JTO.0B013E3182779D18.

[399] M. E. Arcila *et al.*, "EGFR Exon 20 Insertion Mutations in Lung Adenocarcinomas: Prevalence, Molecular Heterogeneity, and Clinicopathologic Characteristics," *Mol Cancer Ther*, vol. 12, no. 2, pp. 220–229, 2013, doi: 10.1158/1535-7163.MCT-12-0620.

[400] E. Banno *et al.*, "Sensitivities to various epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitors of uncommon epidermal growth factor receptor mutations L861Q and S768I: What is the optimal epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitor?," *Cancer Sci.*, vol. 107, no. 8, p. 1134, Aug. 2016, doi: 10.1111/CAS.12980.

[401] P. T. Harrison, S. Vyse, and P. H. Huang, "Rare epidermal growth factor receptor (EGFR) mutations in non-small cell lung cancer," *Semin. Cancer Biol.*, vol. 61, pp. 167–179, Apr. 2020, doi: 10.1016/J.SEMCANCER.2019.09.015.

[402] M. He *et al.*, "EGFR exon 19 insertions: A new family of sensitizing EGFR mutations in lung adenocarcinoma," *Clin. Cancer Res.*, vol. 18, no. 6, pp. 1790–1797, Mar. 2012, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-11-2361.

[403] R. Gejman *et al.*, "Prevalence of EGFR Mutations and Clinico-Pathological Characteristics of Chilean Lung Cancer Patients," *Asian Pac. J. Cancer Prev.*, vol. 20, no. 1, pp. 1–4, Jan. 2019, doi: 10.31557/APJCP.2019.20.1.1.

[404] O. O. Castillo-Fernandez *et al.*, "P1.08: Updated Analysis of Global Epidemiology of EGFR Mutation in Advanced Non-Small Cell Lung Cancer: Track: Prevention, Early Detection, Epidemiology and Tobacco Control," *J. Thorac. Oncol.*, vol. 11, no. 10, pp. S184–S185, Oct. 2016, doi: 10.1016/J.JTHO.2016.08.030.

[405] J. Xia *et al.*, "Clinicopathologic characteristics and EGFR mutations in lung cancer patients aged below 45 years," *Curr. Probl. Cancer*, vol. 43, no. 4, pp. 363–370, Aug. 2019, doi: 10.1016/J.CURRPROBLCANCER.2018.11.003.

[406] Y. Shi *et al.*, "A Prospective, Molecular Epidemiology Study of EGFR Mutations in Asian Patients with Advanced Non–Small-Cell Lung Cancer of Adenocarcinoma Histology (PIONEER)," *J. Thorac. Oncol.*, vol. 9, no. 2, pp. 154–162, Feb. 2014, doi: 10.1097/JTO.0000000000000033.

[407] S. Toyooka *et al.*, "Epidermal growth factor receptor mutation, but not sex and smoking, is independently associated with favorable prognosis of gefitinib-treated patients with lung adenocarcinoma," *Cancer Sci.*, vol. 99, no. 2, pp. 303–308, Feb. 2008, doi: 10.1111/J.1349-7006.2007.00688.X.

[408] Z. Mraihi, J. Ben Amar, H. Bouacha, S. Rammeh, and L. Hila, "EGFR mutation status in Tunisian non-small-cell lung cancer patients evaluated by mutation-specific immunohistochemistry," *BMC Pulm. Med.*, vol. 18, no. 1, Aug. 2018, doi: 10.1186/S12890-018-0706-5.

[409] Z. M. Yang, X. P. Ding, L. Pen, L. Mei, and T. Liu, "Analysis of CEA Expression and EGFR Mutation Status in Non-small Cell Lung Cancers," *Asian Pacific J. Cancer Prev.*, vol. 15, no. 8, pp. 3451–3455, 2014, doi: 10.7314/APJCP.2014.15.8.3451.

[410] X. C. Gao *et al.*, "18 F-FDG PET/CT SUV max and serum CEA levels as predictors for EGFR mutation state in Chinese patients with non-small cell lung cancer," *Oncol. Lett.*, vol. 20, no. 4, Oct. 2020, doi: 10.3892/OL.2020.11922.

[411] D. Li *et al.*, "Status of 10 targeted genes of non-small cell lung cancer in eastern China: A study of 884 patients based on NGS in a single institution," *Thorac. cancer*, vol. 11, no. 9, pp. 2580–2589, Sep. 2020, doi: 10.1111/1759-7714.13577.

[412] S. Wang *et al.*, "Value of serum tumor markers for predicting EGFR mutations and positive ALK expression in 1089 Chinese non-small-cell lung cancer patients: A retrospective analysis," *Eur. J. Cancer*, vol. 124, pp. 1–14, Jan. 2020, doi: 10.1016/J.EJCA.2019.10.005/ATTACHMENT/4754F3E6-5B71-491F-8135-DC9424C2A3E6/MMC1.DOCX.

[413] A. Yoshizawa *et al.*, "Validation of the IASLC/ATS/ERS lung adenocarcinoma classification for prognosis and association with EGFR and KRAS gene mutations: analysis of 440 Japanese patients," *J. Thorac. Oncol.*, vol. 8, no. 1, pp. 52–61, Jan. 2013, doi: 10.1097/JTO.0B013E3182769AA8.

[414] A. Mansuet-Lupo *et al.*, "The new histologic classification of lung primary adenocarcinoma subtypes is a reliable prognostic marker and identifies tumors with different mutation status: The experience of a French cohort," *Chest*, vol. 146, no. 3, pp. 633–643, 2014, doi: 10.1378/chest.13-2499.

[415] J. J. Hung *et al.*, "Prognostic value of the new international association for the study of lung cancer/American thoracic society/European respiratory society lung adenocarcinoma classification on death and recurrence in completely resected stage i lung adenocarcinoma," *Ann. Surg.*, vol. 258, no. 6, pp. 1079–1086, 2013, doi: 10.1097/SLA.0b013e31828920c0.

[416] H. Hu *et al.*, "Oncogenic mutations are associated with histological subtypes but do not have an independent prognostic value in lung adenocarcinoma," *Onco. Targets. Ther.*, vol. 7, pp. 1423–1437, 2014, doi: 10.2147/OTT.S58900.

[417] K. Tsuta *et al.*, "The utility of the proposed IASLC/ATS/ERS lung adenocarcinoma subtypes for disease prognosis and correlation of driver gene alterations," *Lung Cancer*, vol. 81, no. 3, pp. 371–376, 2013, doi: 10.1016/j.lungcan.2013.06.012.

[418] H. Li *et al.*, "Frequency of well-identified oncogenic driver mutations in lung adenocarcinoma of smokers varies with histological subtypes and graduated smoking dose," *Lung Cancer*, vol. 79, no. 1, pp. 8–13, 2013, doi: 10.1016/j.lungcan.2012.09.018.

[419] A. Warth *et al.*, "EGFR, KRAS, BRAF and ALK gene alterations in lung adenocarcinomas: Patient outcome, interplay with morphology and immunophenotype," *Eur. Respir. J.*, vol. 43, no. 3, pp. 872–883, 2014, doi: 10.1183/09031936.00018013.

[420] K. Tsuta *et al.*, "The utility of the proposed IASLC/ATS/ERS lung adenocarcinoma subtypes for disease prognosis and correlation of driver gene alterations," *Lung Cancer*, vol. 81, no. 3, pp. 371–376, Sep. 2013, doi: 10.1016/J.LUNGCAN.2013.06.012.

[421] A. D. Campos-Parra *et al.*, "Relevance of the novel IASLC/ATS/ERS classification of lung adenocarcinoma in advanced disease," *Eur. Respir. J.*, vol. 43, no. 5, pp. 1439–1447, May 2014, doi: 10.1183/09031936.00138813.

[422] V. Maturu, N. Singh, A. Bal, N. Gupta, A. Das, and D. Behera, "Relationship of epidermal growth factor receptor activating mutations with histologic subtyping according to International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society 2011 adenocarcinoma classification and their impact on overall survival," *Lung India*, vol. 33, no. 3, pp. 257–266, May 2016, doi: 10.4103/0970-2113.180801.

[423] T. D. Clay *et al.*, "The clinical relevance of pathologic subtypes in metastatic lung adenocarcinoma," *J. Thorac. Oncol.*, vol. 9, no. 5, pp. 654–663, 2014, doi: 10.1097/JTO.0000000000000150.

[424] H. Kobayashi *et al.*, "Clinicopathological and genetic characteristics associated with brain metastases from lung adenocarcinoma and utility as prognostic factors," *Oncol. Lett.*, vol. 16, no. 4, pp. 4243–4252, Oct. 2018, doi: 10.3892/OL.2018.9225.

[425] H. J. Kim et al, "Relationship between EGFR mutations and clinicopathological features of lung adenocarcinomas diagnosed via small biopsies - PubMed," *Anticancer*

Res, vol. 34, no. 6, pp. 3189–3195, 2014, Accessed: Feb. 26, 2023. [Online]. Available: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24922693/.

[426] T. Wang, Y. Zhang, B. Liu, M. Hu, N. Zhou, and X. Zhi, "Associations between epidermal growth factor receptor mutations and histological subtypes of lung adenocarcinoma according to the IASLC/ATS/ERS classification in Chinese patients," *Thorac. cancer*, vol. 8, no. 6, pp. 600–605, Nov. 2017, doi: 10.1111/1759-7714.12489.

[427] M. J. M. Gooden, G. H. De Bock, N. Leffers, T. Daemen, and H. W. Nijman, "The prognostic influence of tumour-infiltrating lymphocytes in cancer: a systematic review with meta-analysis," *Br. J. Cancer*, vol. 105, no. 1, p. 93, Jun. 2011, doi: 10.1038/BJC.2011.189.

[428] W. Feng, X. Fu, X. Cai, Q. Zhang, Y. Li, and L. Shen, "Association of Tumor In fi ltrating Lymphocytes Quanti fi cation with EGFR Mutations in Completely Resected Stage IIIA (N2) Lung Adenocarcinoma Mutational Features Associated with Immunoreactivity in Non-Small Cell Lung Cancer Regulation of Glycodelin E," *J. Thorac. Oncol.*, vol. 12, no. 1, pp. S820–S821, doi: 10.1016/j.jtho.2016.11.1109.

[429] H. S. Kim, J. H. Kim, B. Han, and D. R. Choi, "Correlation of Thyroid Transcription Factor-1 Expression with EGFR Mutations in Non-Small-Cell Lung Cancer: A Meta-Analysis," *Medicina (Kaunas).*, vol. 55, no. 2, 2019, doi: 10.3390/MEDICINA55020041.

[430] C. Chen, D. Shen, J. Li, Y. Sun, and J. Wang, "TTF-1 and EGFR expression are related to EGFR mutation in lung adenocarcinoma," *Int. J. Clin. Exp. Pathol.*, vol. 11, no. 9, p. 4650, 2018, Accessed: Jul. 06, 2022. [Online]. Available: /pmc/articles/PMC6962979/.

[431] T. Nakra, V. Singh, A. Nambirajan, P. S. Malik, A. Mohan, and D. Jain, "Correlation of TTF-1 immunoexpression and EGFR mutation spectrum in non–small cell lung carcinoma," *J. Pathol. Transl. Med.*, vol. 55, no. 4, p. 279, Jun. 2021, doi: 10.4132/JPTM.2021.05.10.

[432] W. Shanzhi, H. Yiping, H. Ling, Z. Jianming, and L. Qiang, "The Relationship between TTF-1 Expression and EGFR Mutations in Lung Adenocarcinomas," *PLoS One*, vol. 9, no. 4, p. e95479, Apr. 2014, doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0095479.

[433] B. S. Sheffield *et al.*, "Relationship of thyroid transcription factor 1 to EGFR status in non-small-cell lung cancer," *Curr. Oncol.*, vol. 21, no. 6, p. 305, 2014, doi: 10.3747/CO.21.2148.

[434] D. M. Jackman *et al.*, "Exon 19 deletion mutations of epidermal growth factor receptor are associated with prolonged survival in non-small cell lung cancer patients treated with gefitinib or erlotinib," *Clin. Cancer Res.*, vol. 12, no. 13, pp. 3908–3914, Jul. 2006, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-06-0462.

[435] G. J. Riely *et al.*, "Clinical course of patients with non-small cell lung cancer and epidermal growth factor receptor exon 19 and exon 21 mutations treated with gefitinib or erlotinib," *Clin. Cancer Res.*, vol. 12, no. 3 Pt 1, pp. 839–844, Feb. 2006, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-05-1846.

[436] Y. Jin, M. Chen, and X. Yu, "Differences among lesions with exon 19, exon 21 EGFR mutations and wild types in surgically resected non-small cell lung cancer," *Nat. Publ. Gr.*, 2016, doi: 10.1038/srep31636.

[437] M. Fukuoka *et al.*, "Biomarker analyses and final overall survival results from a phase III, randomized, open-label, first-line study of gefitinib versus carboplatin/paclitaxel in clinically selected patients with advanced non - small-cell lung cancer in Asia (IPASS)," *J. Clin. Oncol.*, vol. 29, no. 21, pp. 2866–2874, Jul. 2011, doi: 10.1200/JCO.2010.33.4235.

[438] T. Mitsudomi *et al.*, "Gefitinib versus cisplatin plus docetaxel in patients with non-small-cell lung cancer harbouring mutations of the epidermal growth factor receptor (WJTOG3405): an open label, randomised phase 3 trial," *Lancet Oncol.*, vol. 11, no. 2, pp. 121–128, Feb. 2010, doi: 10.1016/S1470-2045(09)70364-X.

[439] L. V. Sequist *et al.*, "Phase III study of afatinib or cisplatin plus pemetrexed in patients with metastatic lung adenocarcinoma with EGFR mutations," *J. Clin. Oncol.*, vol. 31, no. 27, pp. 3327–3334, Sep. 2013, doi: 10.1200/JCO.2012.44.2806.

[440] J. C. H. Yang *et al.*, "Afatinib versus cisplatin-based chemotherapy for EGFR mutation-positive lung adenocarcinoma (LUX-Lung 3 and LUX-Lung 6): analysis of overall survival data from two randomised, phase 3 trials," *Lancet. Oncol.*, vol. 16, no. 2, pp. 141–151, Feb. 2015, doi: 10.1016/S1470-2045(14)71173-8.

[441] C. K. Lee *et al.*, "Impact of EGFR inhibitor in non-small cell lung cancer on progression-free and overall survival: a meta-analysis," *J. Natl. Cancer Inst.*, vol. 105, no. 9, pp. 595–605, May 2013, doi: 10.1093/JNCI/DJT072.

[442] F. Petrelli, K. Borgonovo, M. Cabiddu, and S. Barni, "Efficacy of EGFR tyrosine kinase inhibitors in patients with EGFR-mutated non-small-cell lung cancer: a meta-analysis of 13 randomized trials," *Clin. Lung Cancer*, vol. 13, no. 2, pp. 107–114, Mar. 2012, doi: 10.1016/J.CLLC.2011.08.005.

[443] J. Cadranel *et al.*, "Impact of systematic EGFR and KRAS mutation evaluation on progression-free survival and overall survival in patients with advanced non-small-cell lung cancer treated by erlotinib in a French prospective cohort (ERMETIC project--part 2)," *J. Thorac. Oncol.*, vol. 7, no. 10, pp. 1490–1502, 2012, doi: 10.1097/JTO.0B013E318265B2B5.

[444] G. Rennert *et al.*, "Long term follow-up of EGFR mutated NSCLC cases," *Transl. Oncol.*, vol. 14, no. 1, Jan. 2021, doi: 10.1016/J.TRANON.2020.100934.

[445] F. Aguiar *et al.*, "Overall Survival Analysis and Characterization of an EGFR Mutated Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC) Population," *Arch. Bronconeumol.*, vol. 54, no. 1, pp. 10–17, Jan. 2018, doi: 10.1016/J.ARBRES.2017.07.012.

[446] H. Zheng *et al.*, " Prognostic analysis of patients with mutant and wild-type EGFR gene lung adenocarcinoma ," *Cancer Manag. Res.*, vol. 11, pp. 6139–6150, Jul. 2019, doi: 10.2147/CMAR.S200126.

[447] X. Du, Y. Shao, H. F. Qin, Y. H. Tai, and H. J. Gao, "ALK-rearrangement in non-small-cell lung cancer (NSCLC)," *Thorac. Cancer*, vol. 9, no. 4, pp. 423–430, Apr. 2018, doi: 10.1111/1759-7714.12613.

[448] C. Britschgi *et al.*, "Real-World Treatment Patterns and Survival Outcome in Advanced Anaplastic Lymphoma Kinase (ALK) Rearranged Non-Small-Cell Lung Cancer Patients," *Front. Oncol.*, vol. 10, p. 1299, Aug. 2020, doi: 10.3389/FONC.2020.01299/BIBTEX.

[449] A. Yokoyama *et al.*, "Pulmonary Adenocarcinoma, Harboring Both an EGFR Mutation and ALK Rearrangement, Presenting a Stable Disease to Erlotinib and a Partial Response to Alectinib," *Intern. Med.*, vol. 57, no. 16, p. 2377, Aug. 2018, doi: 10.2169/INTERNALMEDICINE.0383-17.

[450] N. Yamaguchi *et al.*, "Smoking status and self-reported race affect the frequency of clinically relevant oncogenic alterations in non-small-cell lung cancers at a United States-based academic medical practice," *Lung Cancer*, vol. 82, no. 1, pp. 31–37, Oct. 2013, doi: 10.1016/J.LUNGCAN.2013.07.013.

[451] M. Soda *et al.*, "A prospective PCR-based screening for the EML4-ALK oncogene in non-small cell lung cancer," *Clin. Cancer Res.*, vol. 18, no. 20, pp. 5682–5689, Oct. 2012, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-11-2947.

[452] H. El Yacoubi *et al.*, "Frequency of anaplastic lymphoma kinase rearrangements in Moroccan patients with non small cell lung cancer: A multi-institutional national retrospective study," *BMC Cancer*, vol. 20, no. 1, pp. 1–5, May 2020, doi: 10.1186/S12885-020-06973-4/TABLES/4.

[453] X. Zhou *et al.*, "Molecular and clinical analysis of Chinese patients with anaplastic lymphoma kinase (ALK)-rearranged non-small cell lung cancer," *Cancer Sci.*, vol. 110, no. 10, pp. 3382–3390, Oct. 2019, doi: 10.1111/CAS.14177.

[454] J. X. Zhou *et al.*, "Oncogenic driver mutations in patients with non-small-cell lung cancer at various clinical stages," *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.*, vol. 24, no. 5, pp. 1319–1325, 2013, doi: 10.1093/ANNONC/MDS626.

[455] G. Jin *et al.*, "EML4-ALK Fusion Gene in Korean Non-Small Cell Lung Cancer," *J. Korean Med. Sci.*, vol. 27, no. 2, p. 228, 2012, doi: 10.3346/JKMS.2012.27.2.228.

[456] A. T. Arfaoui *et al.*, "ALK protein expression in pulmonary adenocarcinoma of Tunisian patients," *J. Immunoassay Immunochem.*, vol. 38, no. 4, pp. 411–419, Jul. 2017, doi: 10.1080/15321819.2017.1319860.

[457] A. Arfaoui Toumi *et al.*, "Assessment of EGFR mutation status in Tunisian patients with pulmonary adenocarcinoma," *Curr. Res. Transl. Med.*, vol. 66, no. 3, pp. 65–70, Sep. 2018, doi: 10.1016/J.RETRAM.2018.02.004.

[458] A. R. Jazieh *et al.*, "Real-World Data on the Prevalence of Anaplastic Lymphoma Kinase–Positive Non–Small-Cell Lung Cancer in the Middle East and North Africa," *JCO Glob. Oncol.*, vol. 7, no. 7, pp. 1556–1563, Dec. 2021, doi: 10.1200/GO.21.00067.

[459] J. H. Paik *et al.*, "Clinicopathologic implication of ALK rearrangement in surgically resected lung cancer: a proposal of diagnostic algorithm for ALK-rearranged adenocarcinoma," *Lung Cancer*, vol. 76, no. 3, pp. 403–409, Jun. 2012, doi: 10.1016/J.LUNGCAN.2011.11.008.

[460] H. Kim and J.-H. Chung, "Overview of clinicopathologic features of ALK-rearranged lung adenocarcinoma and current diagnostic testing for ALK rearrangement," *Transl. Lung Cancer Res.*, vol. 4, no. 2, p. 149, Apr. 2015, doi: 10.3978/J.ISSN.2218-6751.2014.12.02.

[461] Z. Wang *et al.*, "EML4-ALK Rearrangement and its clinical significance in chinese patients with advanced non-small cell lung cancer," *Oncol.*, vol. 83, no. 5, pp. 248–

256, Sep. 2012, doi: 10.1159/000341381.

[462] P. Xia *et al.*, "Molecular characteristics and clinical outcomes of complex ALK rearrangements identified by next-generation sequencing in non-small cell lung cancers," *J. Transl. Med.*, vol. 19, no. 1, pp. 1–12, Dec. 2021, doi: 10.1186/S12967-021-02982-4/FIGURES/5.

[463] L. Fan, Y. Feng, H. Wan, G. Shi, and W. Niu, "Clinicopathological and Demographical Characteristics of Non-Small Cell Lung Cancer Patients with ALK Rearrangements: A Systematic Review and Meta-Analysis," *PLoS One*, vol. 9, no. 6, p. e100866, Jun. 2014, doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0100866.

[464] P. L. Chia, A. Dobrovic, A. Dobrovic, and T. John, "Prevalence and natural history of ALK positive non-small-cell lung cancer and the clinical impact of targeted therapy with ALK inhibitors," *Clin. Epidemiol.*, vol. 6, pp. 423–432, Nov. 2014, doi: 10.2147/CLEP.S69718.

[465] A. T. Shaw *et al.*, "Clinical features and outcome of patients with non-small-cell lung cancer who harbor EML4-ALK," *J. Clin. Oncol.*, vol. 27, no. 26, pp. 4247–4253, Sep. 2009, doi: 10.1200/JCO.2009.22.6993.

[466] R. Zhao *et al.*, "Clinicopathological Features of ALK Expression in 9889 Cases of Non-small-Cell Lung Cancer and Genomic Rearrangements Identified by Capture-Based Next-Generation Sequencing: A Chinese Retrospective Analysis," *Mol. Diagn. Ther.*, vol. 23, no. 3, pp. 395–405, Jun. 2019, doi: 10.1007/S40291-019-00389-Y.

[467] J. X. Zhou *et al.*, "Oncogenic driver mutations in patients with non-small-cell lung cancer at various clinical stages," *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.*, vol. 24, no. 5, pp. 1319–1325, 2013, doi: 10.1093/ANNONC/MDS626.

[468] A. M. Chapman, K. Y. Sun, P. Ruestow, D. M. Cowan, and A. K. Madl, "Lung cancer mutation profile of EGFR, ALK, and KRAS: Meta-analysis and comparison of never and ever smokers," *Lung Cancer*, vol. 102, pp. 122–134, Dec. 2016, doi: 10.1016/J.LUNGCAN.2016.10.010.

[469] S. Hong *et al.*, "A Large-scale Cross-sectional Study of ALK Rearrangements and EGFR Mutations in Non-small-cell Lung Cancer in Chinese Han Population," *Sci. Rep.*, vol. 4, 2014, doi: 10.1038/SREP07268.

[470] T. Fukui *et al.*, "Clinicoradiologic characteristics of patients with lung adenocarcinoma harboring EML4-ALK fusion oncogene," *Lung Cancer*, vol. 77, no. 2, pp. 319–325, Aug. 2012, doi: 10.1016/J.LUNGCAN.2012.03.013.

[471] Y. Li *et al.*, "Clinical significance of EML4-ALK fusion gene and association with EGFR and KRAS gene mutations in 208 Chinese patients with non-small cell lung cancer," *PLoS One*, vol. 8, no. 1, Jan. 2013, doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0052093.

[472] S. J. Rodig *et al.*, "Unique clinicopathologic features characterize ALK-rearranged lung adenocarcinoma in the western population," *Clin. Cancer Res.*, vol. 15, no. 16, pp. 5216–5223, Aug. 2009, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-09-0802.

[473] A. Yoshida *et al.*, "Frequent ALK rearrangement and TTF-1/p63 co-expression in lung adenocarcinoma with signet-ring cell component," *Lung Cancer*, vol. 72, no. 3, pp. 309–315, Jun. 2011, doi: 10.1016/J.LUNGCAN.2010.09.013.

[474] A. Yoshida *et al.*, "Comprehensive histologic analysis of ALK-rearranged lung

carcinomas," *Am. J. Surg. Pathol.*, vol. 35, no. 8, pp. 1226–1234, Aug. 2011, doi: 10.1097/PAS.0B013E3182233E06.

[475] S. Popat *et al.*, "ALK translocation is associated with ALK immunoreactivity and extensive signet-ring morphology in primary lung adenocarcinoma," *Lung Cancer*, vol. 75, no. 3, pp. 300–305, Mar. 2012, doi: 10.1016/J.LUNGCAN.2011.07.017.

[476] Y. J. Dong *et al.*, "Association between the histological subtype of lung adenocarcinoma, EGFR/KRAS mutation status and the ALK rearrangement according to the novel IASLC/ATS/ERS classification," *Oncol. Lett.*, vol. 11, no. 4, p. 2552, Apr. 2016, doi: 10.3892/OL.2016.4233.

[477] X. Zhang *et al.*, "Fusion of EML4 and ALK is associated with development of lung adenocarcinomas lacking EGFR and KRAS mutations and is correlated with ALK expression," *Mol. Cancer*, vol. 9, Jul. 2010, doi: 10.1186/1476-4598-9-188.

[478] J. F. Gainor *et al.*, "ALK Rearrangements Are Mutually Exclusive with Mutations in EGFR or KRAS: An Analysis of 1,683 Patients with Non–Small Cell Lung Cancer," *Clin. Cancer Res.*, vol. 19, no. 15, pp. 4273–4281, Aug. 2013, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-13-0318.

[479] W. Hu, Y. Liu, and J. Chen, "Concurrent gene alterations with EGFR mutation and treatment efficacy of EGFR-TKIs in Chinese patients with non-small cell lung cancer," *Oncotarget*, vol. 8, no. 15, p. 25046, Apr. 2017, doi: 10.18632/ONCOTARGET.15337.

[480] S. Schmid *et al.*, "Clinical Outcome of ALK-Positive Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC) Patients with De Novo EGFR or KRAS Co-Mutations Receiving Tyrosine Kinase Inhibitors (TKIs)," *J. Thorac. Oncol.*, vol. 12, no. 4, pp. 681–688, Apr. 2017, doi: 10.1016/J.JTHO.2016.12.003.

[481] M. Soda *et al.*, "A mouse model for EML4-ALK-positive lung cancer," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 105, no. 50, pp. 19893–19897, Dec. 2008, doi: 10.1073/PNAS.0805381105.

[482] H. R. Kim *et al.*, "Distinct clinical features and outcomes in never-smokers with nonsmall cell lung cancer who harbor EGFR or KRAS mutations or ALK rearrangement," *Cancer*, vol. 118, no. 3, pp. 729–739, Feb. 2012, doi: 10.1002/CNCR.26311.

[483] N. N. Zhang *et al.*, "The Molecular Detection and Clinical Significance of ALK Rearrangement in Selected Advanced Non-Small Cell Lung Cancer: ALK Expression Provides Insights into ALK Targeted Therapy," *PLoS One*, vol. 9, no. 1, p. e84501, Jan. 2014, doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0084501.

[484] K. Kulig, S. Iyer, Y. Wang, and P. Yang, "Predictive and Prognostic Value of ALK Gene Rearrangement in Non- Small Cell Lung Cancer," *Epidemiol. Open Access*, vol. 4, no. 1, pp. 1–8, Jan. 2014, doi: 10.4172/2161-1165.1000146.

[485] J. E. Chaft *et al.*, "Clinical outcomes of patients with resected, early-stage ALK-positive lung cancer," *Lung Cancer*, vol. 122, pp. 67–71, Aug. 2018, doi: 10.1016/J.LUNGCAN.2018.05.020.

[486] A. Tantraworasin, N. Lertprasertsuke, S. Kongkarnka, J. Euathrongchit, Y. Wannasopha, and S. Saeteng, "Retrospective study of ALK rearrangement and clinicopathological implications in completely resected non- small cell lung cancer

patients in Northern Thailand: role of screening with D5F3 antibodies," *Asian Pac. J. Cancer Prev.*, vol. 15, no. 7, pp. 3057–3063, 2014, doi: 10.7314/APJCP.2014.15.7.3057.

[487] Y. Liu, X. Ye, Y. Yu, and S. Lu, "Prognostic significance of anaplastic lymphoma kinase rearrangement in patients with completely resected lung adenocarcinoma," *J. Thorac. Dis.*, vol. 11, no. 10, p. 4258, 2019, doi: 10.21037/JTD.2019.09.65.

[488] Q. Gao *et al.*, "Worse disease-free, tumor-specific, and overall survival in surgically-resected lung adenocarcinoma patients with ALK rearrangement," *Oncotarget*, vol. 8, no. 49, p. 86066, Oct. 2017, doi: 10.18632/ONCOTARGET.20973.

[489] S. H. Shin *et al.*, "Anaplastic lymphoma kinase rearrangement in surgically resected stage IA lung adenocarcinoma," *J. Thorac. Dis.*, vol. 10, no. 6, p. 3460, Jun. 2018, doi: 10.21037/JTD.2018.05.131.

[490] F. H. Blackhall *et al.*, "Prevalence and clinical outcomes for patients with ALK-positive resected stage I to III adenocarcinoma: results from the European Thoracic Oncology Platform Lungscape Project," *J. Clin. Oncol.*, vol. 32, no. 25, pp. 2780–2787, Sep. 2014, doi: 10.1200/JCO.2013.54.5921.

[491] M. Takeda, I. Okamoto, K. Sakai, H. Kawakami, K. Nishio, and K. Nakagawa, "Clinical outcome for EML4-ALK-positive patients with advanced non-small-cell lung cancer treated with first-line platinum-based chemotherapy," *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.*, vol. 23, no. 11, pp. 2931–2936, 2012, doi: 10.1093/ANNONC/MDS124.

[492] P. Martinez *et al.*, "Fluorescence in situ hybridization and immunohistochemistry as diagnostic methods for ALK positive non-small cell lung cancer patients," *PLoS One*, vol. 8, no. 1, Jan. 2013, doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0052261.

Annexes

Annexes 1:

CRF des patients atteints de cancers de poumon non à petites cellules non épidermoïde :

Etude de la fréquence de la mutation EGFR

CENTRE HOSPITALIER UNIVERSITAIRE HASSAN II. FES.

FICHE D'EXPLOITATION

N° ……

IDENTITÉ

Nom et prénom :……

Date de naissance :……/……/……*Age :*…….

Lieu de naissance :……

IP :…….

Sexe : M ❑ F ❑

Origine :…….

Milieu : Urbain ❑ *Rural* ❑

Adresse complète :……..

……..

……..

Numéros de téléphones :

GSM : ……. *Fixe :* …….

Date de la consultation :……

Caractéristiques clinico-radiologiques

Cliniques

TABAC :

- ❑ Fumeur (Actif ou sevré depuis moins d'un an)
  - Tabac
  - Autres (cannabisme, chicha…)
  - ❑ Arrêt tabac ❑ Actif
- ❑ Ex-fumeur (Sevré depuis un an au moins)
- ❑ Non fumeur (moins de 100 cigarettes / vie)

Nombre de paquets années : |__|__|__|

ALCOOL:

❑ OUI ❑ NON

PERTE DE POIDS :

❑ < 5% ❑> 5%

PERFORMANCE STATUS (OMS)

❑ 0 ❑1 ❑2 ❑3 ❑4

SYMPTOMES LIÉS AU CANCER :

❑ OUI ❑ NON

Si oui lesquels ?

❑Douleurs thoraciques

❑Dyspnée

❑Toux

❑Hémoptysie

❑Syndrome paranéoplasique

Si oui, lequel : ……..

❑ Autres (dysphonie)

Radiologiques

SITE DE LA TUMEUR PRIMITIVE :

Poumon droit : ❑ LSD ❑ LMD ❑ LID

Poumon gauche : ❑ LSG ❑ LIG

TAILLE DE LA TUMEUR :… cm

ATELECTASIE*:* ❑ ❑

Si oui :

❑ étendue à la région hilaire seulement ❑étendue au

PNEUMONIE OBSTRUCTIVE : ❑ ❑

Si oui : ❑ étendue à la région hilaire seulement ❑ étendue au

PRESENCE D'UN NODULE :

❑ Dans le même lobe

❑ Dans un autre lobe homolatéral

ENVAHISSEMENT TUMORAL DE :

❑ La paroi thoracique

❑ Le diaphragme

❑

❑ La plèvre médiastinale

❑

❑

❑

❑

❑

❑

❑

- ❑ □□□□□□□□□□□
- ❑ □□□□□□□□□□□□□□□□□□□
- ❑ □□□□□□□□□□

ENVAHISSMENT GANGLIONNAIRE :

- ❑ Intra-pulmonaire
- ❑ Péri-bronchique homolatéral
- ❑ Hilaire homolatéral
- ❑ Sous carénaire
- ❑ Médiastinal homolatéral
- ❑ Médiastinalcontro-latéral
- ❑ Hilaire contro-latéral
- ❑ Scalénique
- ❑ Sus claviculaire

SITES DE METASTASES (si présence) :

Nombre de métastases : ……

- ❑ Ganglions cervicaux et sus-claviculaires
- ❑ Cerveau et méninges.
- ❑ Plèvre
- ❑ Poumon
- ❑ Foie
- ❑ Surrénales
- ❑ Os
- ❑ Peau
- ❑ Autres (préciser) :

……..

NOMBRE DE SITES METASTATIQUES :

❑ **1** ❑**2** ❑ **3** ❑**≥ 4**

T : |__| N : |__| M : |__| **STADE : |_____|**

Caractéristiques anatomo-pathologiques

DATE ET HEURE DU PRELEVEMENT : ……../……./…… ;…….. H

TYPE DE FIXATEUR :

TYPE DE PRELEVEMENT :

- ❑ PIECE OPERATOIRE
- ❑ BIOPSIE (nombre carottes)
  - Bronchique
  - Pleurale à l'aveugle
  - Ganglionnaire périphérique
  - Nodule sous cutané
  - Radio guidée (scannoguidée, échoguidée)
- ❑ CYTOBLOC
- ❑ Médiastinoscopie
- ❑ Thoracoscopie

NOMBRE D'ACTES POUR AVOIR HISTOLOGIE :……..

A préciser : ……..……..

DATE DE L'HISTOLOGIE : ……/……/……..

TYPE HISTOLOGIQUE :

- ❑ LEPIDIQUE :
- ❑ ACINAIRE :
- ❑ PAPILLAIRE :
- ❑ MICROPAPILLAIRE :
- ❑ SOLIDE :

IMMUNOHISTOCHIMIE :

CK 5 /6	
P63	
TTF1	
MUCINES	
NAPSINE A	
Ck 7	
Ck 20	

DATE DE LA RECHERCHE DE LA MUTATION DE L'EGFR : ……/……/……..

LE % DE LA TUMEUR :

TECHNIQUE D'ANALYSE : ……

……

……*MUTATION EGFR :*

- ❑ Exon 18 ❑Exon 19 ❑Exon 20 ❑Exon 21
- ❑ Autre (préciser) : ……

MUTATION T790M :

- ❑ Présente ❑Absente ❑Non

TRAITEMENT

TRAITEMENT DES STADES I ET II

A- CHIRURGIE D'EXERESE COMPLETE

Référence Anapath :……..

Référence du prélèvement tumoral frais :……

Date et heure de réception de la pièce :……

❖ DESCRIPTION DE LA PIECE OPERATOIRE

- **TYPE DE PRELEVEMENT**
  ❑ POUMON ❑POUMON ELARGI ❑LOBE ❑ BILOBECTOMIE
  ❑SEGMENT ❑RESECTION ATYPIQUE ❑AUTRE

- **COTE :**❑DROIT ❑GAUCHE

- **LOCALISATION DE LA/DES TUMEUR(S) DANS L'ORGANE**

  ❑ PROXIMAL ❑ PARENCHYMATEUX ❑ AUTRE

❖ DESCRIPTION HISTOPATHOLOGIQUE

- **TYPE HISTOLOGIQUE :** ❑ADENOCARCINOME ❑ AUTRES

- ❑ LEPIDIQUE :
- ❑ ACINAIRE :
- ❑ PAPILLAIRE :
- ❑ MICROPAPILLAIRE :
- ❑ SOLIDE :

- **IMMUNOHISTOCHIMIE :**

CK 5 /6	
P63	
TTF1	
MUCINES	
NAPSINE A	
Ck 7	
Ck 20	

- **EXTENSION TUMORALE**

- ÉTAT DE LA TRANCHE DE SECTION BRONCHIQUE ET DES RECOUPES VASCULAIRES❑ SAINE ❑ ATTEINTE

- ETAT DES LIMITES DE RESECTION PLEURALE PARIETALE, PERICARDIQUE, LIMITES OSSEUSES ET INTERCOSTALES❑ SAINES❑ ATTEINTES

- **TAILLE DE LA TUMEUR** (EN CM)…….

- **DISTANCE PAR RAPPORT A LA SECTION BRONCHIQUE**…….

- **EXTENSION A PLEVRE/PAROI**
  ❑ OUI ❑ NON

- **EXTENSION AUX ORGANES DU MEDIASTIN**
  ❑ OUI ❑ NON

- **NOMBRE DE TUMEURS**
  ❑ UNIQUE ❑ MULTIPLES

- **GANGLIONS PULMONAIRES**

❑ INTRAPULMONAIRES❑PERIBRONCHIQUES ❑HILAIRES HOMOLAT

- **GANGLIONS MEDIASTINAUX**

❑HOMOLAT❑ CONTROLATERAUX

pT:……pN……

- **QUALITE DE LA RESECTION**❑ R0 ❑ R1 ❑ R2

B- CHIMIOTHERAPIE ADJUVANTE

❑ NON

❑ OUI :

Si oui :

- Laquelle :

❑ CISPLATINE ❑ VINORELBINE

❑ GEMCITABINE ❑ DOCETAXEL ❑ PEMETREXED
❑ CARBOPLATINE ❑ PACLITAXEL

- Nombre de cures…..

TRAITEMENT DE STADES IIIA ET IIIB

A- CHIMIOTHERAPIE NEO-ADJUVANTE

❑ NON ❑ OUI :

Si oui :

- Laquelle :

❑ CISPLATINE ❑ VINORELBINE

❑ GEMCITABINE ❑ DOCETAXEL ❑ PEMETREXED
❑ CARBOPLATINE ❑ PACLITAXEL

- Nombre de cures …..

B- CHIRURGIE D'EXERESE

Référence Anapath :……..

Référence du prélèvement tumoral frais :…….

Date et heure de reception de la pièce :……

❖ DESCRIPTION DE LA PIECE OPERATOIRE

TYPE DE PRELEVEMENT

❑ POUMON ❑ POUMON ELARGI ❑ LOBE
❑ BILOBECTOMIE

❑ SEGMENT ❑ RESECTION ATYPIQUE ❑ AUTRE

COTE

❑DROIT ❑ GAUCHE

LOCALISATION DE LA/DES TUMEUR(S) DANS L'ORGANE

❑ PROXIMAL ❑ PARENCHYMATEUX ❑ AUTRE

❖ DESCRIPTION HISTOPATHOLOGIQUE

- **TYPE HISTOLOGIQUE :** ❑ADENOCARCINOME ❑ AUTRES
  - ❑ LEPIDIQUE :
  - ❑ ACINAIRE :
  - ❑ PAPILLAIRE :
  - ❑ MICROPAPILLAIRE :
  - ❑ SOLIDE :

- **IMMUNOHISTOCHIMIE :**

CK 5 /6	
P63	
TTF1	
MUCINES	
NAPSINE A	

EXTENSION TUMORALE

- ÉTAT DE LA TRANCHE DE SECTION BRONCHIQUE ET DES RECOUPES VASCULAIRES
  ❑ SAINE ❑ ATTEINTE

- ETAT DES LIMITES DE RESECTION PLEURALE PARIETALE, PERICARDIQUE, LIMITES OSSEUSES ET INTERCOSTALES
  - ❑ SAINES ❑ ATTEINTES

TAILLE DE LA TUMEUR (EN CM)…….

DISTANCE PAR RAPPORT A LA SECTION BRONCHIQUE……...

EXTENSION A PLEVRE/PAROI

❑ OUI ❑ NON

EXTENSION AUX ORGANES DU MEDIASTIN

❑ OUI ❑ NON

NOMBRE DE TUMEURS

❑ UNIQUE ❑ MULTIPLES

GANGLIONS PULMONAIRES

❑ INTRAPULMONAIRES ❑ PERIBRONCHIQUES ❑HILAIRES HOMOLAT

GANGLIONS MEDIASTINAUX

❑ HOMOLATERAUX ❑ CONTROLATERAUX

pT:……*pN*……

QUALITE DE LA RESECTION

❑ R0 ❑ R1 ❑ R2

C- RADIOTHERAPIE

❑ ADJUVANTE

❑ CONCOMITANTE A LA CHIMIO

❑ SEQUENTIELLE

Dose totale :……

Fractionnement :……

Date de début :……..

Fin de la radiothérapie :……

Type de chimiothérapie si associée :……..

Nombre de cycles :……..

D- CHIMIOTHERAPIE ADJUVANTE

❑ OUI ❑ NON

❑ CISPLATINE ❑ VINORELBINE

❑ GEMCITABINE ❑ DOCETAXEL ❑ PEMETREXED
❑ CARBOPLATINE ❑ PACLITAXEL

❑ TOXICITIE……

❑ GRADE 1 ❑ GRADE 2 ❑ GRADE 3 ❑ GRADE

TRAITEMENT DES DE STADE IV

A- SOINS PALLIATIFS SEULS

❑ OUI ❑ NON

B- TRAITEMENTS SYSTEMIQUES

❑OUI ❑ NON

❑ ASSOCIATION ❑ MONOTHERAPIE

DROGUES UTILISEES

❑ CISPLATINE ❑ CARBOPLATINE ❑ DOCETAXEL
❑ PEMETREXED ❑ GEMCITABINE ❑ PACLITAXEL
❑ IRINOTECAN ❑ VINORELBINE

TOXICITIE……

❑ GRADE 1 ❑ GRADE 2 ❑ GRADE 3 ❑ GRADE 4

NOMBRE DE CYCLES ……

ASSOCIATION AU BEVACIZUMAB

❑ OUI ❑ NON

ASSOCIATION AUX BIPHOSPHONATES

❑ OUI ❑ NON

❑ ACIDE ZOLEDRONIQUE ❑ ACIDE BANDRONIQUE

❑ DENOSUMAB

THERAPIE DE MAINTENANCE

❑ OUI ❑ NON

DROGUES UTILISEES

❑ BEVACIZUMAB

❑ PEMETREXED

NOMBRE DE CYCLES EN MAINTENANCE :……..

INHIBITEUR DE L'EGFR:

⇒ DATE DE DEBUT : ……/……/……

- ERLOTINIB ❑ GEFITINIB❑ AFATINIB❑

⇒ DOSE (MG/JR) : ……

⇒ TOXICITIE……

❑ GRADE 1 ❑ GRADE 2 ❑ GRADE 3 ❑ GRADE 4

⇒ REDUCTION DE DOSE: ❑ OUI ❑ ????

EVALUATION

TECHNIQUE :

❑ TDM ❑Autre

RYTHME DE SURVEILLANCE :

❑ Mensuel ❑ 2 mois ❑ 3mois
❑ Autre (préciser) : …….

REPONSE A LA PREMIERE LIGNE :

❑ Complète ❑ Partielle ❑ Stabilité ❑ Progression

❖ ***PREMIERE PROGRESSION SELON RECIST:***

DATE DE DEBUT DU TRAITEMENT DE PREMIERE LIGNE *:……/……/……*

DATE DE PROGRESSION *:……/……/……*

TYPE DE PROGRESSION :

Majoration des lésions existantes: ❑OUI ❑NON

Majoration de la tumeur primitive: ❑OUI ❑NON

❑ LSD ❑ LMD ❑LID
❑ LSG ❑ LIG

Majoration des Sites métastatiques : ❑OUI ❑NON

❑ Cerveau et Méninges. Nombre de métastases :……..
❑ Ganglions cervicaux et sus-claviculaires
❑ Poumon❑ Foie ❑ Surrénales❑ Os ❑ Peau
❑ Autres (préciser) : ……...

Nouvelles lésions :❑OUI ❑NON

Nombre : ❑1 ❑2 ❑>2

Site :

- ❑ Poumon
- ❑ Cerveau et Méninges. Nombre de métastases :……..
- ❑ Ganglions cervicaux et sus-claviculaires
- ❑ Foie ❑ Surrénales❑ Os ❑ Peau
- ❑ Autres (préciser) : ……...

Symptômes initiaux : ❑ Amélioration ❑ Stable ❑Aggravation

Nouveaux symptômes : ❑OUI ❑NON

Si oui : lesquels : ……..

MODALITÉS DU TRAITEMENT A LA PREMIERE PROGRESSION:

- ❑ ***Patients sous TKI***
- ❑ *Poursuite TKI*
- ❑ *Poursuite TKI + Traitement local :*
  - ❑ Radiothérapie❑ Chirurgie❑ Radiofréquence
  - ❑ Autre (préciser) : …….
    Site de traitement local:
    - ❑ Poumon
    - ❑ Cerveau et Méninges. Nombre de métastases :……..
    - ❑ Ganglions cervicaux et sus-claviculaires
    - ❑ Foie ❑ Surrénales ❑ Os ❑ Peau
    - ❑ Autres (préciser) : ……...
- ❑ *Switch à la chimiothérapie :*
  - ❑ Bithérapie sels de platine + drogue 3ème génération (préciser) : ……
  - ❑ Bevacizumab
  - ❑ Monothérapie (préciser) : ……
- ❑ *Soins de support.*

- ❑ ***Patients sous chimiothérapie***
- ❑ *Chimiothérapie 2ème ligne*
  - ❑ Docetaxel ❑ Gemcitabine ❑ Vinorelbine ❑ Autres :
- ❑ *Chimiothérapie + Traitement local :*
  - ❑ Radiothérapie❑ Chirurgie❑ Radiofréquence
  - ❑ Autre (préciser) : …….
    Site de traitement local:
    - ❑ Poumon
    - ❑ Cerveau et Méninges. Nombre de métastases :……..
    - ❑ Ganglions cervicaux et sus-claviculaires
    - ❑ Foie ❑ Surrénales ❑ Os ❑ Peau
    - ❑ Autres (préciser) : ……...
- ❑ *TKI*
- ❑ *Soins de support.*

REPONSE APRES TRAITEMENT DE LA PREMIERE PROGRESSION :

❑ Complète ❑ Partielle ❑ Stabilité ❑ Progression

❖ ***SECONDE PROGRESSION SELON RECIST :***

DATE DE DEBUT DU TRAITEMENT DE PREMIERE LIGNE *:……/……/……*

DATE DE PROGRESSION *:……/……/……*

TYPE DE PROGRESSION :

Majoration des lésions existantes: ❑OUI ❑NON

Majoration de la tumeur primitive: ❑OUI ❑NON

- ❑ LSD ❑ LMD ❑LID
- ❑ LSG ❑ LIG

Majoration des Sites métastatiques : ❑OUI ❑NON

- ❑ Cerveau et Méninges. Nombre de métastases :……..
- ❑ Ganglions cervicaux et sus-claviculaires
- ❑ Poumon ❑ Foie ❑ Surrénales ❑ Os ❑ Peau
- ❑ Autres (préciser) : ……...

Nouvelles lésions :❑OUI ❑NON

Nombre : ❑1 ❑2 ❑>2

Site :

- ❑ Poumon
- ❑ Cerveau et Méninges. Nombre de métastases :……..
- ❑ Ganglions cervicaux et sus-claviculaires
- ❑ Foie ❑ Surrénales ❑ Os ❑ Peau
- ❑ Autres (préciser) : ……...

Symptômes initiaux : ❑ Amélioration ❑ Stable ❑Aggravation

Nouveaux symptômes : ❑OUI ❑NON

Si oui : lesquels :….

MODALITÉS DU TRAITEMENT A LA DEUXIEME PROGRESSION:

- ❑ ***Patients sous TKI***
- ❑ *Poursuite TKI.*
- ❑ *Poursuite TKI + Traitement local :*
  - ❑ Radiothérapie❑ Chirurgie❑ Radiofréquence
  - ❑ Autre (préciser) : ……
    Site de traitement local:
    - ❑ Poumon
    - ❑ Cerveau et Méninges. Nombre de métastases :……..
    - ❑ Ganglions cervicaux et sus-claviculaires
    - ❑ Foie ❑ Surrénales ❑ Os ❑ Peau
    - ❑ Autres (préciser) : ……...
- ❑ *Switch à la chimiothérapie :*
  - ❑ Préciser : ……
- ❑ *Soins de support.*

- ❑ ***Patients sous chimiothérapie***
- ❑ *Chimiothérapie 3ème ligne*
  - ❑ Docetaxel ❑ Gemcitabine ❑ Vinorelbine ❑ Autres :
- ❑ *Chimiothérapie + Traitement local :*
  - ❑ Radiothérapie❑ Chirurgie❑ Radiofréquence
  - ❑ Autre (préciser) : …….
    Site de traitement local:
    - ❑ Poumon
    - ❑ Cerveau et Méninges. Nombre de métastases :……..
    - ❑ Ganglions cervicaux et sus-claviculaires
    - ❑ Foie ❑ Surrénales ❑ Os ❑ Peau
    - ❑ Autres (préciser) : ……...
- ❑ *TKI*
- ❑ *Soins de support.*

REPONSE APRES TRAITEMENT DE LA DEUXIEME PROGRESSION :

❑ Complète ❑ Partielle ❑ Stabilité ❑ Progression

SUIVI

DATE DES DERNIERES NOUVELLES : ……/……/….

❑ Vivant ❑Décédé

SI DECEDE : DATE DU DECES : ……/……/……

Annexes 2:

Liste de production scientifique

Articles publiés :

Article 1

Original Research Article

Cancer Control
Volume 29: 1–9
© The Author(s) 2022
Article reuse guidelines:
sagepub.com/journals-permissions
DOI: 10.1177/10732748221084930
journals.sagepub.com/home/ccx
SAGE

Correlation of Epidermal Growth Factor Receptor Mutation With Major Histologic Subtype of Lung Adenocarcinoma According to IASLC/ATS/ERS Classification

Sara Boukansa, PhD[1,3], Zineb Benbrahim, MD[2], Sanaa Gamrani, PhD[1,3], Sanae Bardai, PhD[3], Laila Bouguenouch, MD[4], Asmae Mazti, MD[3], Nadia Boutahiri, MD[5], Mounia Serraj, MD[5], Bouchra Amara, MD[5], Yassine Ouadnouni, MD[6], Mohamed Smahi, MD[6], Badreeddine Alami, MD[7], Nawfel Mellas, MD[2], and Hinde El Fatemi, MD[1,3]

Abstract

Objective: Our prospective study aims to define the correlation of *EGFR*(epidermal growth factor receptor) mutations with major histological subtypes of lung adenocarcinoma from resected and non-resected specimens, according to the WHO 2015 classification, in Moroccan North East Population.

Methods: *Epidermal growth factor receptor* mutations of 150 primary lung adenocarcinoma were performed using Real-Time PCR or SANGER sequencing. SPSS 21 was used to assess the relationship between histological subtypes of lung adenocarcinoma and *EGFR* mutation status.

Results: 25 mutations were detected in the series of 150 lung adenocarcinomas, most of which were found in cases with papillary, acinar, patterns than without these patterns and more frequently occurred in the cases without solid pattern than with this pattern. A significant correlation was observed between *EGFR* mutation and acinar (P = 0,024), papillary pattern (P = 0,003) and, negative association with a solid pattern (P < 0,001). In females, *EGFR* mutations were significantly correlated with the acinar pattern (P = 0,02), whereas in males with the papillary pattern (P = 0,01). Association between the histologic component and exon 19 deletions and exon 21 mutations were also evaluated and, we found a significant correlation between the papillary major pattern with exon 19 mutations (P = 0,004) and, ex21 with the acinar component (P = 0,03).

Conclusion: An analysis of resected and non-resected lung ADC specimens in 150 Moroccan Northeast patients, revealed that acinar and papillary patterns may predict the presence of a mutation in the *EGFR* gene. While the solid major pattern may indicate a low mutation rate of the *EGFR* gene.

Keywords
EGFR mutations, histology, adenocarcinoma, biomarker, cell lung cancer

[1]Faculty of Medicine and Pharmacy, Laboratory of Biomedical and Translational Research, Sidi Mohamed Ben Abdellah University, Fez, Morocco
[2]Department of Oncology, University Hospital Hassan II, Sidi Mohamed Ben Abdellah University, Fez, Morocco
[3]Laboratory of Anatomic Pathology and Molecular Pathology, University Hospital Hassan II, Sidi Mohamed Ben Abdellah University, Fez, Morocco
[4]Unit of Medical Genetics and Oncogenetics, University Hospital Hassan II, Sidi Mohamed Ben Abdellah University, Fez, Morocco
[5]Department of Pneumology, University Hospital Hassan II, Sidi Mohamed Ben Abdellah University, Fez, Morocco
[6]Department of Thoracic Surgery, University Hospital Hassan II, Sidi Mohamed Ben Abdellah University, Fez, Morocco
[7]Department of Radiology, University Hospital Hassan II, Sidi Mohamed Ben Abdellah University, Fez, Morocco

Corresponding Author:
Sara Boukansa, Faculty of Medicine and Pharmacy, Laboratory of Biomedical and Translational Research, Sidi Mohamed Ben Abdellah University, Boite Postale 1893 - KM 2.200 Route Sidi Harazem Fès, Fez 30070, Morocco.
Email: sara.boukansa@usmba.ac.ma

Creative Commons Non Commercial CC BY-NC: This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/) which permits non-commercial use, reproduction and distribution of the work without further permission provided the original work is attributed as specified on the SAGE and Open Access pages (https://us.sagepub.com/en-us/nam/open-access-at-sage).

Article 2

Hindawi
The Breast Journal
Volume 2022, Article ID 9238804, 9 pages
https://doi.org/10.1155/2022/9238804

Research Article

The Prognosis and Predictive Value of Estrogen Negative/Progesterone Positive (ER−/PR+) Phenotype: Experience of 1159 Primary Breast Cancer from a Single Institute

S. Gamrani,[1,2] S. Boukansa,[1,2] Z. Benbrahim,[3] N. Mellas,[3] F. Fdili Alaoui,[4] M. A. Melhouf,[4] C. Bouchikhi,[4] A. Banani,[4] M. Boubbou,[5] T. Bouhafa,[6] and H. El Fatemi[1,2]

[1]*Laboratory of Biomedical and Translational Research, Hassan II University Hospital, University Sidi Mohammed Ben Abdillah, Fez, Morocco*
[2]*Department of Pathology, Hassan II University Hospital, Fez, Morocco*
[3]*Department of Oncology, University Hospital Center Hassan II, Fez, Morocco*
[4]*Department of Obstetrics and Gynecology, University Hospital Center Hassan II, Fez, Morocco*
[5]*Department of Radiology, University Hospital Center Hassan II, Fez, Morocco*
[6]*Department of Radiation Oncology, University Hospital Center Hassan II, Fez, Morocco*

Correspondence should be addressed to S. Gamrani; sanaa.gamrani@gmail.com

Received 7 February 2022; Revised 20 April 2022; Accepted 25 April 2022; Published 17 May 2022

Academic Editor: Junwon Min

Copyright © 2022 S. Gamrani et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Breast cancer is a serious worldwide public health problem and is currently the most common cancer overall. Its endocrine therapy is related to the expression of the steroid hormones, estrogen receptor (ER), and progesterone receptor (PR). Breast cancers can be presented under multiple profiles of steroid hormones: ER(−)/PR(+), ER(+)/PR(−), double-positive/negative ER, and PR. 2–8% of all breast cancers express only PR (ER−/PR+) which is an abnormal phenotype, with less known about their behaviors and outcomes. Our study was performed on a large and well-characterized database of primary breast cancer from 2012 to 2019, up to 1159 cases. These cases were divided according to ER and PR expression, as we put all of our focus on ER-negative/PR-positive group, more specifically ER−/PR+/HER2+ and ER−/PR+/HER2− gene expressions, to highlight their features and find a pattern that links HR (hormone receptors) profiles and breast cancer subtypes. Out of the informative cases, 94 patients (8%) had ER−/PR+ breast cancers, while 676 (58.4%) had ER+/PR+, 88 (7.6%) had ER+/PR−, and 164 (14.2%) had ER−/PR− tumors. The ER−/PR+ group was statistically correlated with a high risk of recurrence and death in midway between the double-negative and double-positive HR. According to HER2 status, a low DFS was observed in patients ER−/PR+/HER2−, which is closer to the DFS of TNBC cases but worse than ER+/PR any. On the other side, the ER−/PR+/HER2+ showed also a poorer DFS closer to the HER2+ subgroup in between TNBC and ER+/PR any. The clinicopathological features of the ER−/PR+/HER2− and ER−/PR+ HER2+ have distinguished the patients into two groups with a difference in some clinicopathological characteristics: both groups had closer OS estimation, which was worse than ER−/PR any and better than TNBC and HER2. The ER−/PR+/HER2− seems to increase the risk of recurrence than ER−/PR+/HER2+ when compared to ER+/PR any. On the other hand, the ER−/PR+/HER2+ seems to increase the risk of death more than ER−/PR+/HER2− in comparison with ER+/PR any. Our results support that ER−/PR+ tumors really exist and are rare and clinically and biologically distinct subtypes of breast cancer. In addition, our analysis, which was based on dividing the groups according to HER2 expression, has revealed the existence of two distinct groups; this gave the ER−/PR+ subgroup a heterogeneity characterization. Moreover, this breast cancer subtype should not be treated as a luminal tumor but rather according to the HER2 expression status.

Articles soumis :

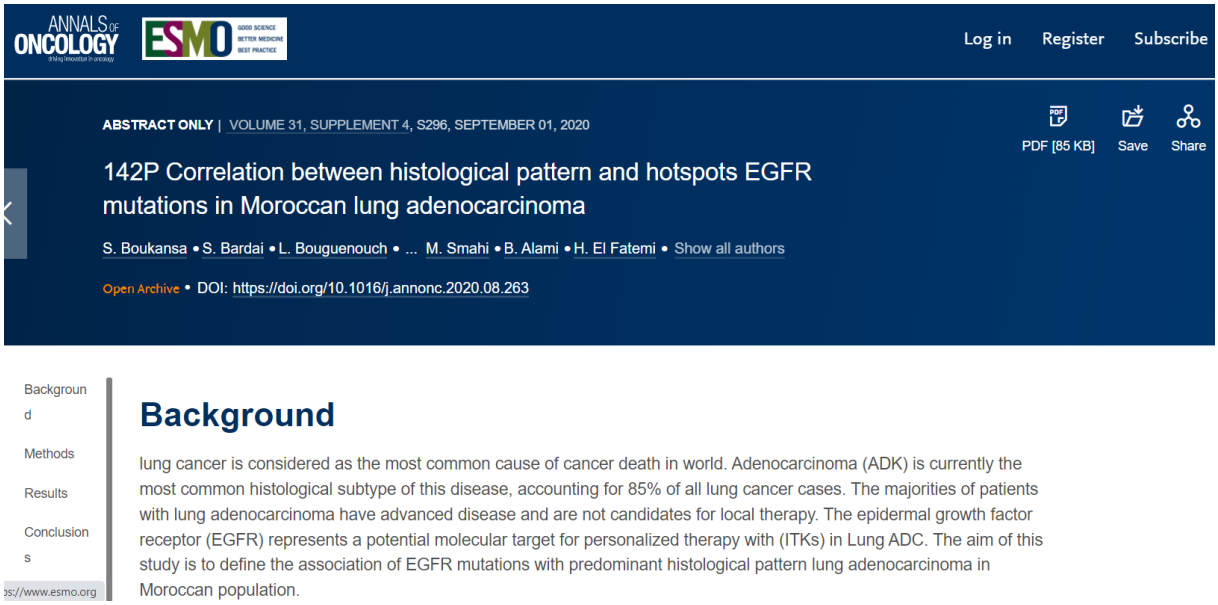
S. Boukansa, Z. Benbrahim, S. Gamrani, S. Bardai, L. Bouguenouch, M. Serraj, B. Amara, Y. Ouadnouni, M. Smahi, B. Alami, N. Mellas, H. El Fatemi. **Molecular testing for EGFR mutation in Moroccan NSCLC patients: CHU Hassan II-Fez experience**.

S. Boukansa, Z. Benbrahim, S. Gamrani, S. Bardai, L. Bouguenouch, M. Serraj, B. Amara, Y. Ouadnouni, M. Smahi, B. Alami, N. Mellas, H. El Fatemi. **Uncommon EGFR mutations in Moroccan NSCLC patients**.

S. Boukansa, Z. Benbrahim, S. Gamrani, S. Bardai, L. Bouguenouch, M. Serraj, B. Amara, Y. Ouadnouni, M. Smahi, B. Alami, N. Mellas, H. El Fatemi.**Targeted therapy impact of EGFR mutation heterogeneity in NSCLC: case report**.

Résumés publiés :

Résumé 1 :



ANNALS OF ONCOLOGY | ESMO GOOD SCIENCE BETTER MEDICINE BEST PRACTICE

Log in Register Subscribe

ABSTRACT ONLY | VOLUME 31, SUPPLEMENT 4, S296, SEPTEMBER 01, 2020

PDF [85 KB] Save Share

142P Correlation between histological pattern and hotspots EGFR mutations in Moroccan lung adenocarcinoma

S. Boukansa • S. Bardai • L. Bouguenouch • ... M. Smahi • B. Alami • H. El Fatemi • Show all authors

Open Archive • DOI: https://doi.org/10.1016/j.annonc.2020.08.263

Backgroun d

Methods

Results

Conclusion s

://www.esmo.org

Background

lung cancer is considered as the most common cause of cancer death in world. Adenocarcinoma (ADK) is currently the most common histological subtype of this disease, accounting for 85% of all lung cancer cases. The majorities of patients with lung adenocarcinoma have advanced disease and are not candidates for local therapy. The epidermal growth factor receptor (EGFR) represents a potential molecular target for personalized therapy with (ITKs) in Lung ADC. The aim of this study is to define the association of EGFR mutations with predominant histological pattern lung adenocarcinoma in Moroccan population.

Résumé 2 :

diagnostic biopsy and surgical piece).
Methods: We retrieved PD-L1 expression (%) and histological subtype from 1051 cases of NSCLC diagnosed in 2017-2018 in our centre. 621 samples (59.1%) were external consult cases. Our cases (430) were 206 diagnostic biopsies, 154 surgical pieces and 70 cytology specimens (50 cell block and 20 liquid cytology samples). Fifteen surgical pieces were paired with biopsy (12) or cytology (3), and 12 diagnostic biopsies with cytology.
Results: PD-L1 was evaluable in 993 cases (94.5%). PD-L1 expression was negative [<1%] in 378 cases (37.9%), it had low expression [1-49%] in 330 patients (33.1%), and high expression [≥50%] in 289 cases (29.0%). We found a higher proportion of PD-L1≥1% in squamous cell carcinoma (68.8%) than in adenocarcinoma (57.8%). Biopsy-surgical piece concordance was poor with Kappa=0.28 and an Intraclass Correlation Coefficient (ICC) of 0.04, while cytology-biopsy concordance was moderate with Kappa=0.50 and ICC=0.60. Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) mutations were associated with a lower level of PD-L1 expression, as 15 (68.2%) EGFR mutated cases were PD-L1 negative (P=0.005).
Conclusion: Our PD-L1 expression prevalence is similar to that described in current literature. Despite having only a few paired cases, we believe that poor to moderate concordance is caused by tumour heterogeneity and not by the type of sample chosen. Besides, EGFR mutations may affect PD-L1 expression profile.

PS-13-007
Expression of pluripotency factors Oct4 and LIN28 in lung adenocarcinoma
P. Bosgana[1], F. Dimitrakopoulos[2], F. Sampsonas[3], H. Kalofonos[4], V. Zolota[5]
[1] Department of Pathology, University Hospital of Patras, Greece, [2] Department of Oncology, University Hospital of Patras., Greece, [3] Department of Respiratory Medicine, University Hospital of Patras, Greece, [4] Department of Oncology, Medical School, University of Patras, Greece, [5] Department of Pathology, Medical School, University of Patras, Greece

Background & Objectives: Lung adenocarcinoma is a leading cause of cancer mortality worldwide despite recent therapeutic advances. Cancer stem cells (CSCs) have gained an increasing attention, due to their ability to generate new tumour through their self-renewal potential and differentiation into multiple cell lineages.OCT4 and LIN28 (homolog A and B) have been identified as key regulators of pluripotency in mammalian embryonic and induced stem cells and are proven to be crucial for cancer development, but our knowledge concerning their exact role in lung adenocarcinoma is limited.
Methods: The present study investigates the immunohistochemical expression of pluripotency factors (OCT4, LIN28A, B) and their association

PS-13-008
EGFR mutations in Fez population: about 69 patients
S. Boukansa[1], S. El Bardai[2], Z. Benbrahim[3], N. Mellas[3], H. El Fatemi[4,5]
[1] Medical Centre of Biomedical and Translational Research, Faculty of Medicine and Pharmacy Fez, Morocco, [2] Anatomy and Cyto-pathological Department, CHU HASSAN II Fez, University Sidi Mohamed Ben Abdellah, Morocco, [3] Department of Oncology, CHU HASSAN II Fez, University Sidi Mohamed Ben Abdellah, Morocco, [4] Department of Pathology, Hassan II University Hospital, Fez, Morocco, [5] Faculty of Medicine and Pharmacy of Fez, Morocco

Background & Objectives: EGFR mutations in NSCLC, dysregulate various oncogenic mechanisms, including proliferation, increased malignant cell survival, invasion and metastasis. The management of NSCLC has envolved with the use of driver mutation in tumours samples toward selecting the right agent for a patients treatement. EGFR mutations is a predictive marker of tumour response to EGFR tyrosine kinase inhibitor treatment. The aim of this prospective study is to define the frequency and predictive value of EGFR mutations in Fez population with NSCLC.
Methods: 69 formalin-fixed paraffin-embedded tumours from patients diagnosed with NSCLC were included. The presence of EGFR mutations was determined by three methods according to percentage of tumour cells. For tumours with high percentage of tumour cells> 30%, PCR amplification followed by automatic direct sequencing was performed. The therascreen EGFR RGQ PCR Kit which is designed to detect the most commonly reported EGFR 29 mutations, was performed in samples with tumour cells< 30%. All mutations obtained by QPCR were comfirmed by Pyrosequencing.
Results: 17 mutations were detected in the serie of 69, more frequently in womens(52.9%) and non smokers(70.5%). The main types were in-frame deletions in exon19 (58.8 %), followed by the missense substitution in exon21 (23.5%), three patients had exon20 mutations (17.6%). 8patients were excluded due to lost to follow-up or death. 7patients demonstrated a marked response to afatinib with stable disease. One patient devellop a resistance after 12 month on afatinib therapy, a T790M mutation is thought to cause this resistance.
Conclusion: Consistent with what has been reported in other studies, EGFR mutations were more common in womens, non smokers and lung adenocarcima histology. This preliminary results of EGFR mutations in Fez population reveals an overall prevalence of 24.6%, wich is somewhat higher than north america (22%), higher than Europe (15%), but lower than Asia Pacific (47%).

PS-13-009
Optimal diagnostic algorithm for morphological diagnosis and management of patients with NSCLC lung tumours: 4 years experience of one center
M. Byakhova[1], L. Gurevich[2], V. Ashevskaya[1], V. Byakhova[3]

Résumé 3 :

Mucinous type of lung adenocarcinomas were predominantly ALK positive (43,7%), followed by papillary type (25%), acinic type (13%) and solid type (3%). There was strong correlation between the ALK expression in surgical biopsy and cytological specimens ($p<0.05$).
Conclusion: These results represent that immunohistochemical expression of ALK gene rearrangement is valid detection technique revealing distinctive clinicopathological and morphological features of the tumour especially in scant biopsies and cytological specimens.

E-PS-22-005
Genetic analysis of multiple synchronous lung cancer in a single lobe showing three different histological types
S. Aida[1], M. Kato[1], N. Sakaniwa[2], T. Okunaka[2]
[1] Department of Pathology, Mita Hospital, International University of Health and Welfare, Japan, [2] Department of Respiratory Surgery, Sanno Hospital, Japan

Background & Objectives: We experienced a case of multiple synchronous lung cancer in a single lobe showing three different histological types. The results of genetic analysis of the tumours showed interesting findings to suggest a developmental mechanism of collision cancer.
Methods: Case presentation: A 73-year-old Japanese woman with a history of smoking for 20 years (50 cigarettes daily). She had undergone a partial colectomy due to colon cancer 7years before. The follow up CT revealed tumour shadows in S6 and S10 of the right lower lobe of lung. Partial lung resection of right S6 and S10 was performed on the suspicion of colon cancer metastasis. The resected tumours were histopathologically, immunohistochemically and genetically examined.
Results: S6; A 10mm sized solid adenocarcinoma was seen. The tumour cells were immunohistochemically positive for TTF1. P53 mutation Ex6 S215G was detected, S10: Two distinct adjacent tumours were seen. One was 20mm sized large cell neuroendocrine carcinoma which was immunohistochemically positive for TTF1, synaptophysin and CD56. P53 mutation Ex7 P250L was detected. Another was 12mm sized lepidic adenocarcinoma, immunohistochemically positive for TTF1. P53 mutation Ex7 P250L was detected. The two tumours were connected each other in a small area.
Conclusion: The two tumours in S10 are morphologically consistent with collision cancer but the genetic analysis of p53 mutation suggests that they are derived from a common multipotential cell. The tumour in S6 has different p53 mutation from S10 tumours and is proved to be not a metastasis but a primary cancer.

(31.1%) and papillary (16.9%). The smallest average tumour size was found in papillary (39.6 mm), solid (49.9 mm), acinar (47.8 mm), while the highest was in the lepidic (52,4 mm) and micropapillary (55.8 mm). The most prevalent type with pleural infiltration was solid (6.8%), acinar (6.1%) micropapillary (6.1%), with statistically significant association (Fisher's non-parametric test, $p = 0.011$). Infiltration of surrounding structures was found in acinar (2%) and solid (2%).
Conclusion: In this paper, we point the importance of an accurate assessment of the subtype of AD highlighting certain aspects of its clinical relevance and potential impact on future new research in this direction.

E-PS-22-007
A case report of exon 20 resistant insertion
S. Boukansa[1], S. El Bardai[2], Z. Benbrahim[3], N. Mellas[3], H. El Fatemi[4,5]
[1] Medical Centre of Biomedical and Translational Research, Faculty of Medicine and Pharmacy Fez, Morocco, [2] Anatomy and Cytopathologycal department, CHU HASSAN II Fez, University Sidi Mohamed Ben Abdellah, Morocco, [3] Department of Oncology, CHU HASSAN II Fez, University Sidi Mohamed Ben Abdellah, Morocco, [4] Department of Pathology, Hassan II University Hospital, Fez, Morocco, [5] Faculty of Medecine and Pharmacy of Fez, Morocco

Background & Objectives: Most patients whose tumours harbor exon19 deletions or L858R mutations have substantial clinical and radiographic responses to EGFR TKIs. In contrast to the classic activating EGFR mutations, insertions in exon 20 are not often associated with clinical benefit and radiographic responses with EGFR TKIs, they have been linked to insentivity and resistance to reversible and irreversible EGFR TKIs. These include the exon 20 insertion mutants D770(ins G)N 771T, D770ins(SVQ), D770_N771(inS NPG) that account for about 4% of all EGFR mutations.
Methods: We report a case of 36 year-old-male, occasional smoker for 5 years, presented with a two month history of bone pain. Chest radiograph revealed a large opacity overlying the right upper lobe. Magnetic resonance imaging (MRI) showed lung, bone and liver metastases. A bronchial biopsie was performed for pathological diagnosis, which revealed an acinair adenocarcinoma with intensively positive TTF-1 and CK7 in differentiated glandular structure. For genetic testing, the extraction of DNA was performed with invitrogen DNA FFPE Tissue Kit from

Résumé 4 :

lymph node metastasis, TIL level, tertiary lymphoid structures (TLSs) around tumour and presence of germinal center (GC) in TLSs.
Results: The high level of TILs was significantly correlated with differentiation ($p = 0.023$), necrosis ($p = 0.042$), abundance of TLSs ($p < 0.001$) and presence of GC in TLSs ($p = 0.004$). High level of TILs was associated with better progression-free survival ($p = 0.017$) and overall survival ($p = 0.049$).
Conclusion: Modified version of measurement for TIL level in breast cancer has a high reproducibility. Histologic evaluation of TILs level in lung adenocarcinoma with the same method has a prognostic value in routine surgical pathology.

PS-05-046
Clinico-pathological and molecular characteristics of patients with NSCLC
S. Boukansa*, L. Tahiri El Ousrouti, L. Chbani, S. Bennis, H. El Fatemi
*Faculty of Medicine and Pharma, Molecular Biology, Fez, Morocco

Objective: Determination of the clinico-pathological and molecular characteristics of patients with NSCLC.
Method: This retrospective, descriptive and analytical study involved 350 patients with NSCLC recruited in CHU Hassan II, Fes, during 63 mounth extending from 01/01/2011 to 01/03/2016. Data information and molecular abnormalities were obtained from the pathological and clinical records of patients.
Results: The average age of patients was 59 years. Among 350 patients, 80 % were male. The most common clinical presentation was pain (75 %) followed by hemoptysis (30 %). Thoracic CT was performed in all patients, tumour size were classified as T1 (4 %), T2 (25 %), T3 (17 %) and T4 (54 %). 94 % of patients had metastases at the time of diagnosis. Pulmonary adenocarcinoma was the most frequent histologic type (75 %) followed by squamous cell carcinomas (22 %), whereas large cell neuroendocrine carcinomas were only 3 %. The expression of CK7, TTF1, CK5 / 6, P63 and synaptophysin was statistically significant (p <0.00001). In our series the mean survival of our patients was estimated to be 280 days, significantly increased in subjects <50 years (345 days) ($p = 0.027$). A molecular study of EGFR was performed in 15 patients, that two of them showed a deletion at exon 19 of the EGFR gene.

18 × 17 × 8 cm and weighted 1500 g. Histologically, the pulmonary architecture was diffusely altered because of the filling of alveoli with multiple microliths. Patchy inflammation was frequently present with variable degrees of interstitial fibrosis as well as osseous metaplasia.
Conclusion: PAM has been considered to be an autosomal recesive disorder because it is transmits horizontally and is associated with consanguinity. The clinical course is not uniform. The optimal diagnostic procedure is the association of chest HRCT with bronchoalveolar lavage. The differential diagnosis may include miliary tuberculosis and sarcoidosis. At present lung transplantation is the only effective therapy. However, better knowledge of the gene responsible offers hope for new therapies.

PS-05-048
Primary pleural epithelioid hemangioendothelioma: A case report and review of literature
S. Ben Rejeb*, D. Ben Ghachem, A. Dhaoui, K. Bellil, R. Ayadi
*Security Forces Hospital, Dept. of Pathology, Tunis, Tunisia

Objective: Epithelioid hemangioendothelioma (EHE) is a rare vascular tumour. It commonly affects liver, lung and bones. Pleural involvement is extremely rare with less than 30 cases reported in the literature. We aim to describe another case primary EHE of the pleura with a review of literature.
Method: A 79-year-old man with history of chronic obstructive pulmonary disease presented with right-sided chest pain and breathlessness. On physical examination there was dullness to percussion and decreased breath sounds over the right hemithorax with signs of heart failure. Computerized tomography revealed multifocal right pleural thickening and effusion. A pleural biopsy was performed.Chest radiograph confirmed the presence of pleural effusion. Computerized tomography (CT) revealed multifocal right pleural thickening and effusion. Image-guided pleural biopsy was performed.
Results: Microscopically, the tumour showed a biphasic pattern with cords and nests of epithelioid cells set in a myxoid stroma. Some cells show mild atypia and rare mitosis with intracytoplasmic lumina containing red blood cells. The second pattern is composed of spindle-shaped cells with occasional necrosis. Immunohistochemically, the tumour cells were positive for CD34 and focally with CK7. The diagnosis of EHE with high grade pattern was made. Unfortunately, the patient passed away 1 month later.

Liste des communications orales et affichés

Communication Orales :

Sara Boukansa et Hinde El Fatemi. Les aspects morphologiques, immunohistochimiques et moléculaires du cancer bronchique non à petite cellule non épidermoïde. Deuxième journée du doctorant en biologie de l'USMBA 2017, faculté des sciences et techniques de Fès.

Sara Boukansa, Zineb Benbrahim, Sanae Bardai, Laila Bouguenouch, Mounia Serraj, Bouchra Amara, Yassine Ouadnouni, Mohamed Smahi, Badreeddine Alami, Nawfel Mellas, and Hinde El Fatemi. Testing EGFR : Expérience de CHU Hassan II de Fès. 1èr Congrès National (AMOT) - 2ème congrès International d'oncologie thoraciqueThème : Actualités thérapeutiques et perspectives d'avenir en Oncologie Thoracique 2022, Hotel Hilton Houara, Tanger.

Sara Boukansa, Zineb Benbrahim, Sanae Bardai, Laila Bouguenouch, Mounia Serraj, Bouchra Amara, Yassine Ouadnouni, Mohamed Smahi, Badreeddine Alami, Nawfel Mellas, and Hinde El Fatemi. Distribution hétérogène de la mutation EGFR : cas clinique. 12ème congrès national d'oncologie 1 er congres d'oncogériatrie de la méditerranée 2022, hôtel Savoy, Marrakech.

Communication Affichés :

S. Boukansa, S. Bardai, L. Bouguenouch, Z. Benbrahim, N. Mellas, M. Serraj, Y. Ouadnouni, M. Smahi, B. Alami, H. El Fatemi. Correlation between histological pattern and hotspots EGFR mutations in Moroccan lung adenocarcinoma. ESMO virtual congress 2020.

S. Boukansa, S. Bardai, L. Bouguenouch, Z. Benbrahim, N. Mellas, M. Serraj, Y. Ouadnouni, M. Smahi, B. Alami, H. El Fatemi. Corrélation histo-moléculaire des adénocarcinomes pulmonaires dans la population du Nor-Est de Maroc. Congrès international d'oncologie thoracique, Hotel Michlifen-Ifran 2019.

S. Boukansa, S. El Brdai, Z. Benbrahim, N. Mellas, K. Ouldim, L. Bouguenouch, Hinde El Fatemi. EGFR mutations in Fez population: about 69 patients. 31th European Congress of Pathology, Pathology is Nice 2019.

S. Boukansa, S. El Brdai, K. Ouldim, L. Bouguenouch, Hinde El Fatemi. A case report of exon 20 resistant insertion. 31th European Congress of Pathology, Pathology is Nice 2019.

S. Boukansa, L. Tahiri El Ousrouti, L. Chbani, S. Bennis, H. El Fatemi. Clinico-pathological and molecular characteristics of patients with NSCLC. 29th European Congress of Pathology Pathology for Patient Care, Rai Amesterdam 2017.