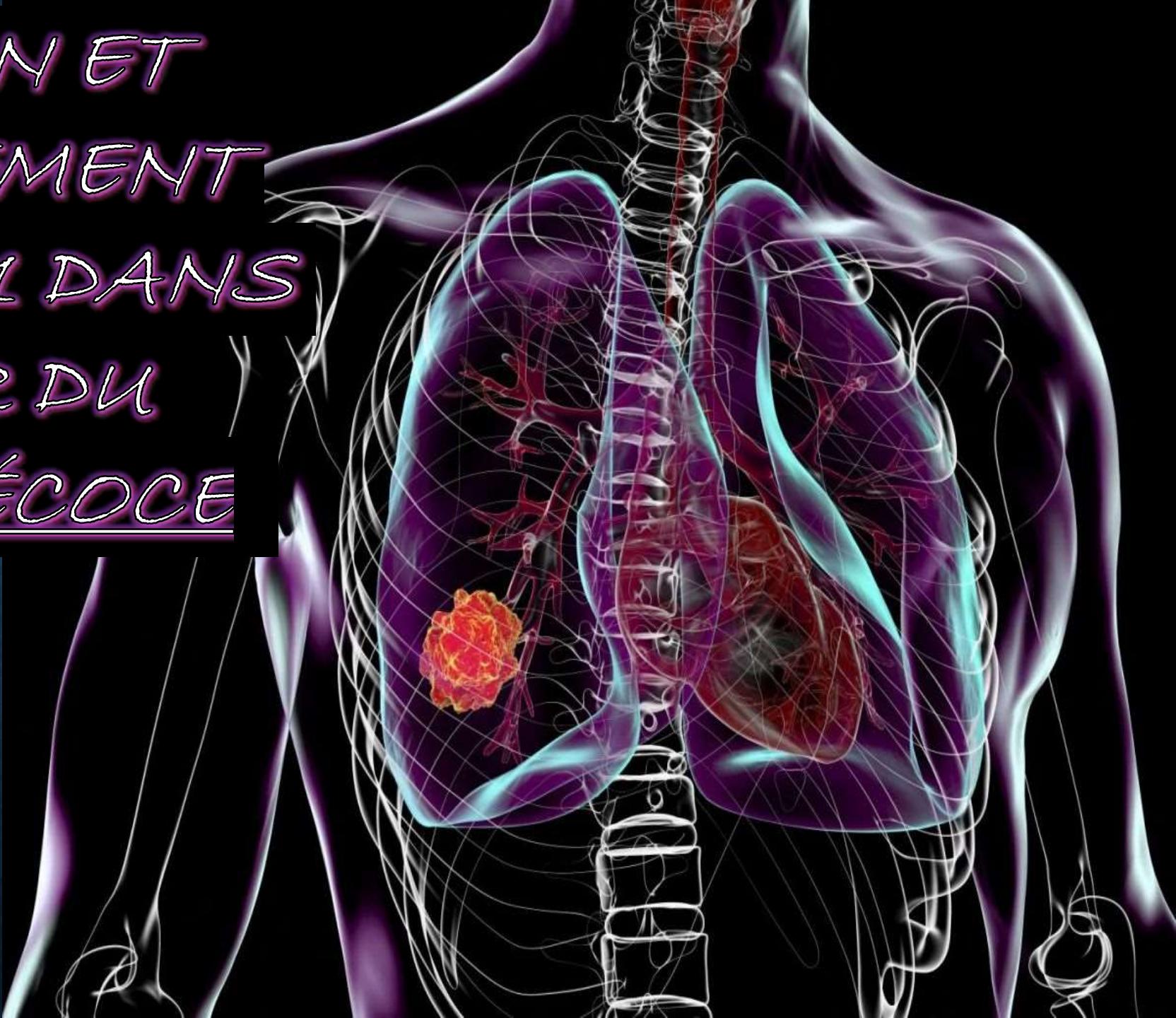


EXPRESSION ET RÉARRANGEMENT DU GÈNE ROS1 DANS LE CANCER DU POUMON PRÉCOCE

Présenter PAR :

CHIGRI AINES

AZZOUZ SAFAA

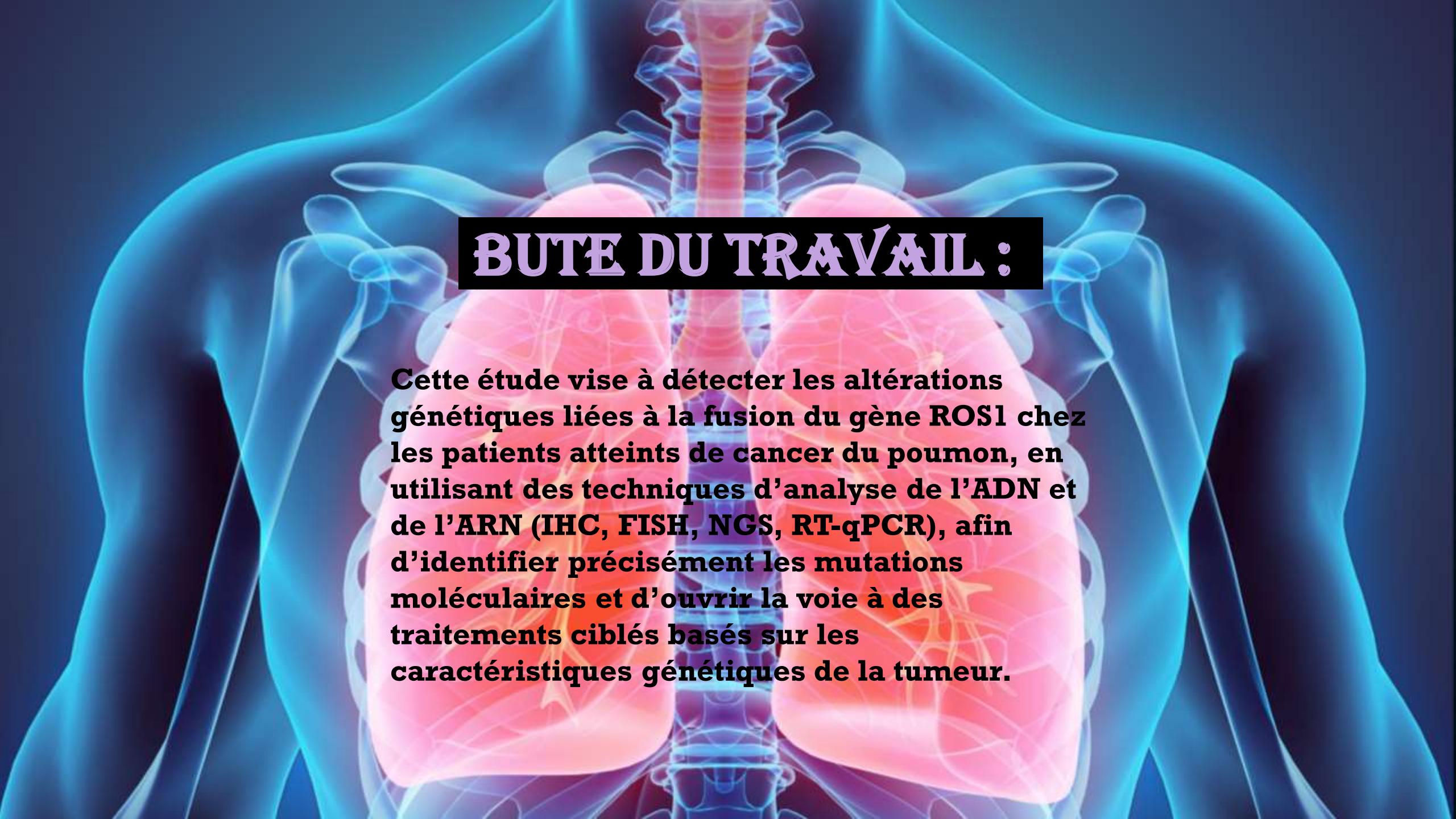


INTRODUCTION

Cancer du poumon est une maladie fréquente et difficile à traiter.

Les thérapies ciblées ont amélioré la prise en charge des formes avancées, mais leur utilisation reste limitée dans les stades précoces

- La protéine ROS1 est une cible prometteuse. Pour la détecter, des techniques comme Hybridation *in situ* par fluorescence (FISH) et Séquençage de nouvelle génération (NGS) sont utilisées, ouvrant la voie à de nouvelles stratégies thérapeutiques précoces.



BUTÉ DU TRAVAIL :

Cette étude vise à détecter les altérations génétiques liées à la fusion du gène ROS1 chez les patients atteints de cancer du poumon, en utilisant des techniques d'analyse de l'ADN et de l'ARN (IHC, FISH, NGS, RT-qPCR), afin d'identifier précisément les mutations moléculaires et d'ouvrir la voie à des traitements ciblés basés sur les caractéristiques génétiques de la tumeur.



MATÉRIEL :
LES PATIENTS ATTEINTS

LES CHERCHEURS ONT UTILISÉ DES ÉCHANTILLONS DE PATENTS OPÉRÉS POUR CANCER DU POUMON ENTRE 2006 ET 2018.

TOUS LES ÉCHANTILLONS PROVENAIENT DE LA BIOBANQUE DE L'HOPITAL UNIVERSITAIRE D'OSLO, QUI CONTIENT:

Des données histopathologie

Biologique

Le suivi médian dépassait 5 ans

Cliniques liées aux patients

Les données de mortalité ont été importé du registre de la population norvégienne

Les patients atteints de tumeurs carcinoïde ou thymomes ont été exclus

Tous les participants ont donné un consentement éclairé et l'étude a été approuvée par comité d'éthique

MÉTHODOLOGIE



LES TECHNIQUES UTILISANT POUR DÉTECTER L'ANOMALIE

LE 1ÈRE MÉTHODE: IHC

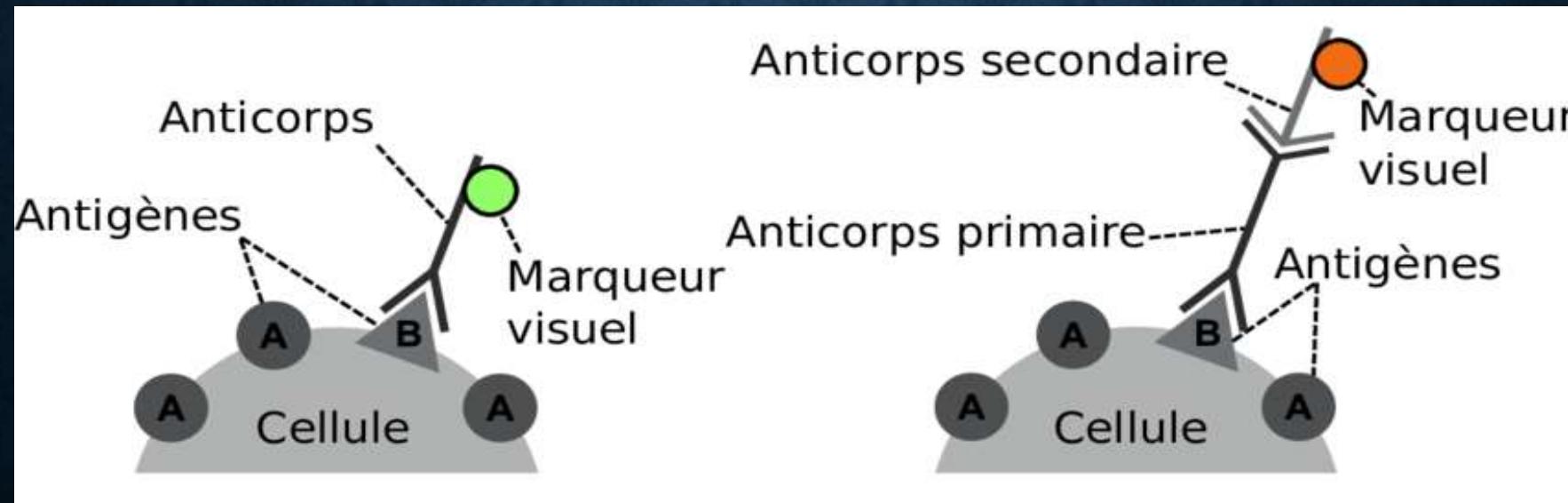
La **technique IHC (ImmunoHistoChimie)** est une méthode de laboratoire utilisée pour **déetecter la présence et la localisation de protéines spécifiques** dans des **coupes de tissus** à l'aide d'**anticorps**.

Identifier quelles cellules ou zones tissulaires expriment une protéine donnée

- ✓ Permet de localiser précisément la présence d'une protéine dans un tissu ou un organe.

Aider au diagnostic des cancers (ex : identifier le type de tumeur)

- ✓ L'IHC distingue les différents types de cellules cancéreuses, ce qui aide à poser un diagnostic précis (par exemple : adénocarcinome vs carcinome épidermoïde).

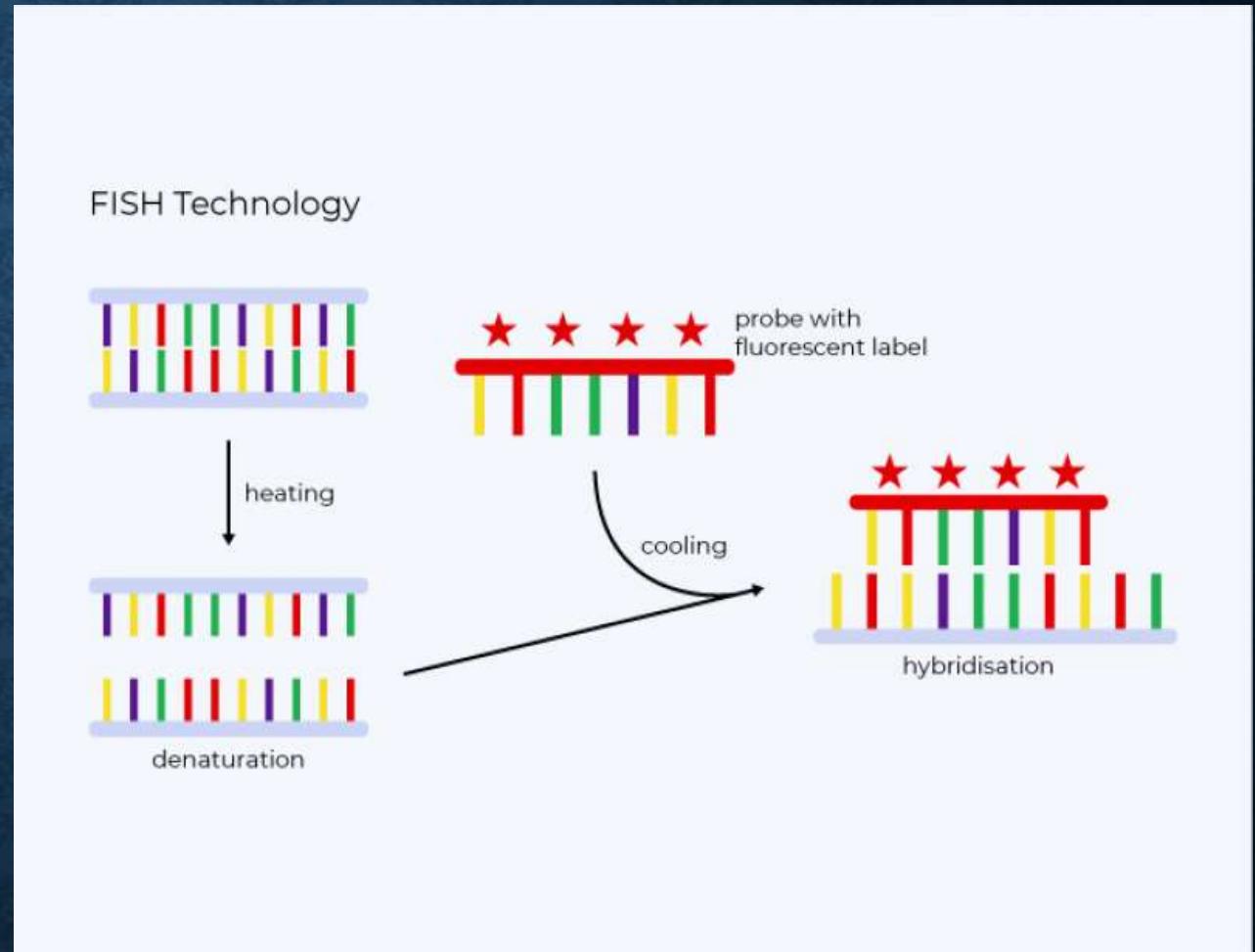


LE 2ÈME MÉTHODE :FISH

La technique **FISH (fluorescence in situ hybridisation)** est une méthode qui utilise des **sondes fluorescentes** pour se fixer sur des **séquences d'ADN spécifiques** dans les cellules.

Elle permet d'observer, sous un microscope à fluorescence, **la présence, l'absence ou la réorganisation** de certains gènes.

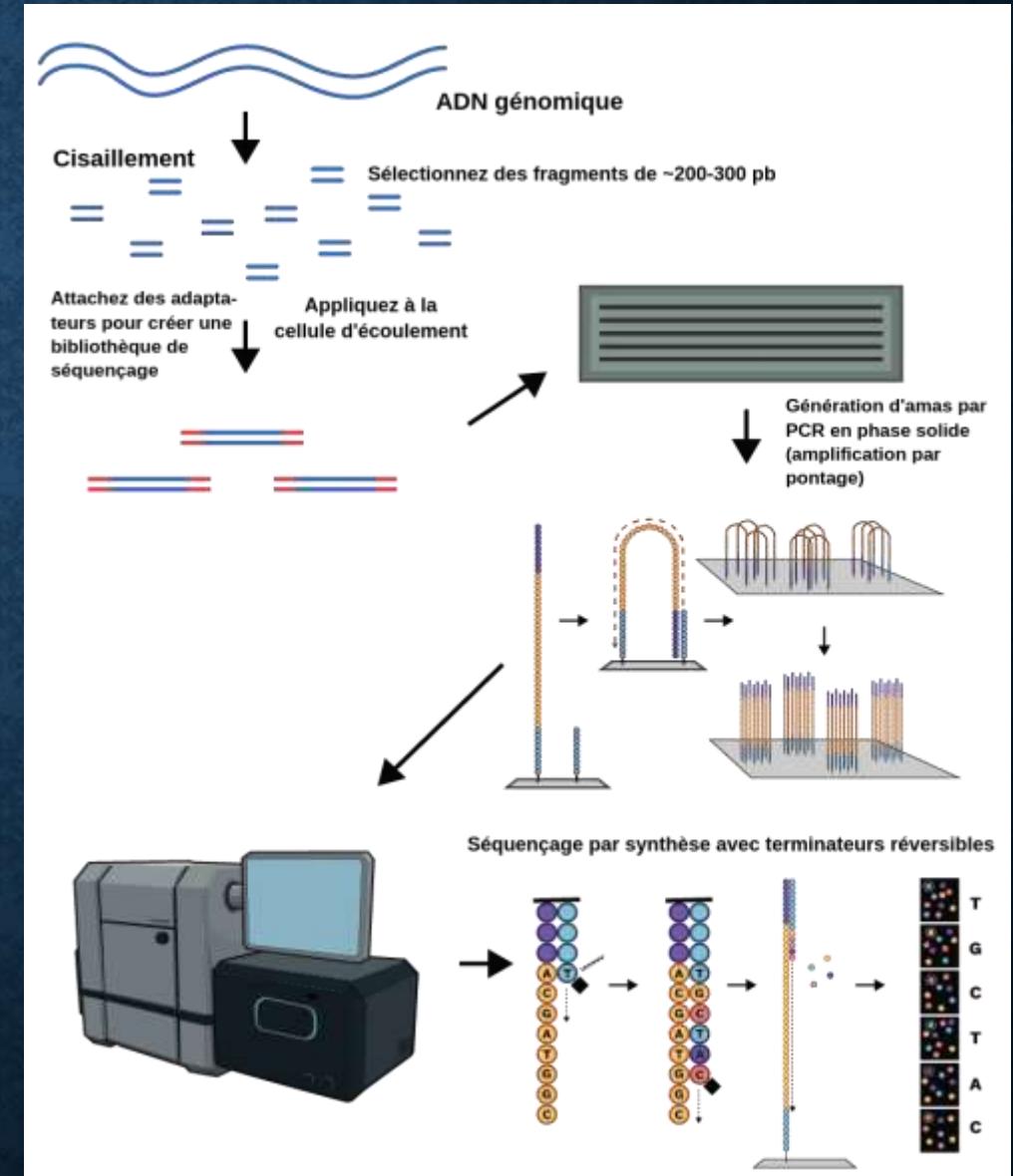
- Déetecter **les anomalies ou mutations génétiques** dans les cellules pulmonaires.
- Identifier le **gène ou la translocation concerné(e)** (ex: **ROS1**).
- **Suivre l'évolution de la maladie** et la réponse au traitement



3ÈME MÉTHODE: NGS

La **NGS (Next Generation Sequencing)**, ou séquancage de nouvelle génération , est une technique **moléculaire** qui permet d'analyser rapidement et simultanément plusieurs gènes dans un échantillon d'ADN ou d'ARN

Permettre une médecine personnalisée , ou chaque patient reçoit un traitement adapté aux caractéristiques génétiques de sa tumeur.



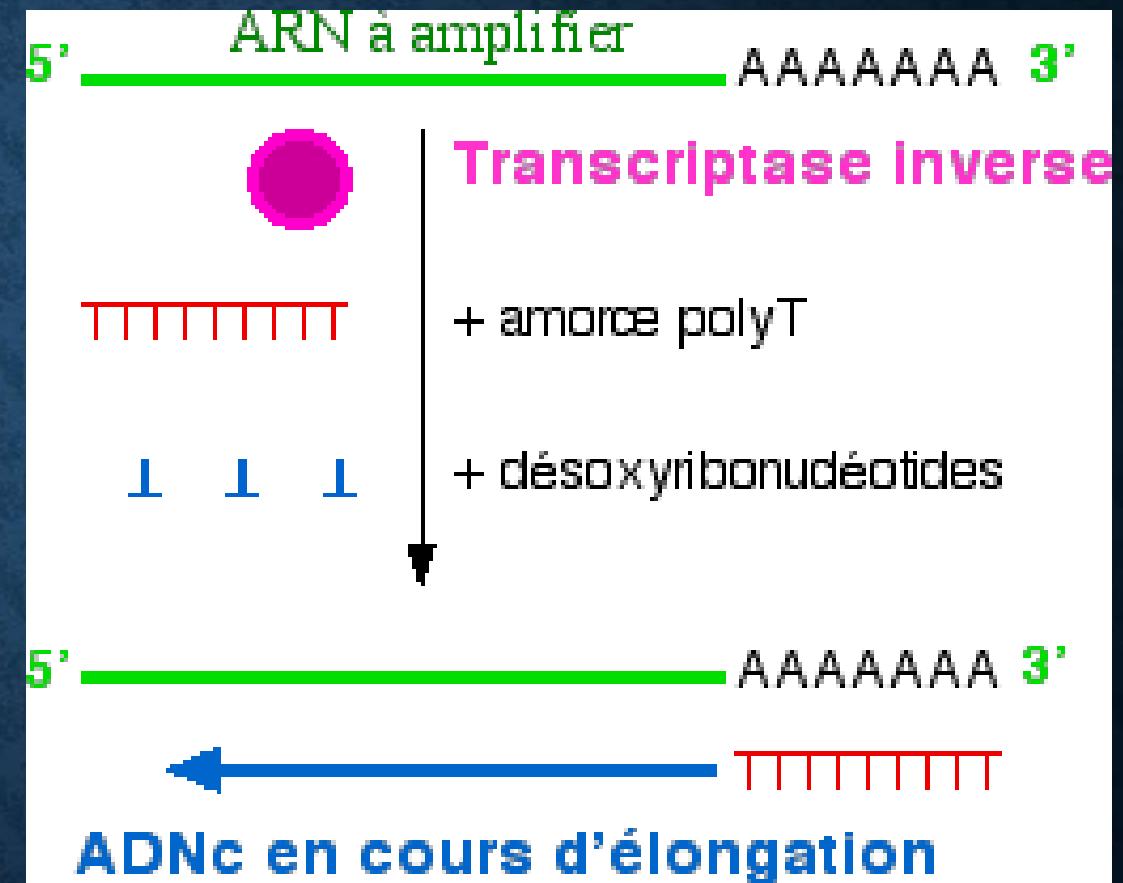
4ÈME MÉTHODE : RT-QPCR

La **RT-qPCR** (Reverse Transcription quantitative PCR) est une **technique de biologie moléculaire** utilisée pour **mesurer l'expression des gènes** dans les cellules.

Dans le **cancer du poumon**, elle permet de détecter et quantifier certains **ARN messagers (ARNm)** liés au développement tumoral.

❖ L'objectif de la RT-qPCR dans le cancer du poumon est de :

- **Détecter et quantifier** l'expression des gènes liés au cancer
- **Identifier les mutations génétiques** responsables du développement tumoral.



Dans le cancer du poumon, la **RT-qPCR** est une méthode **rapide, sensible et précise** ;

Elles sont utiliser pour confirmé les méthodes précédent

MÉTHODOLOGIE

- Échantillons : 921 spécimens de tissus provenant d'une biobanque hospitalière (Oslo).
- Âge médian : 67,5 ans (39–87 ans).

Type de cancer :

- Adénocarcinomes : 58,8 % Carcinomes épidermoïdes : 32,6 %
- Carcinomes à grandes cellules : 3,0 %

Stade tumoral

- Stades I-II : 83,7 %
- Stades III-IV : 16,1 %

Deux techniques d'immunohistochimie (IHC) ont été testées sur des micro-arrays tissulaires (TMA) :

- D4D6 : 891 échantillons analysés
- SP384 : 902 échantillons analysés

Des cas positifs en IHC ont ensuite été vérifiés par : • FISH (Hybridation in situ) • NGS (Séquençage de nouvelle génération)

RÉSULTAT

Marquage ROS1 par immunohistochimie (IHC)

- Deux anticorps utilisés : D4D6 et SP384.
- Positifs :
 - D4D6 : 28/921 (3,1 %)
 - SP384 : 40/921 (4,4 %)

Ces cas positifs ont été ensuite analysés par **FISH** et **NGS** pour confirmer les réarrangements ROS1.

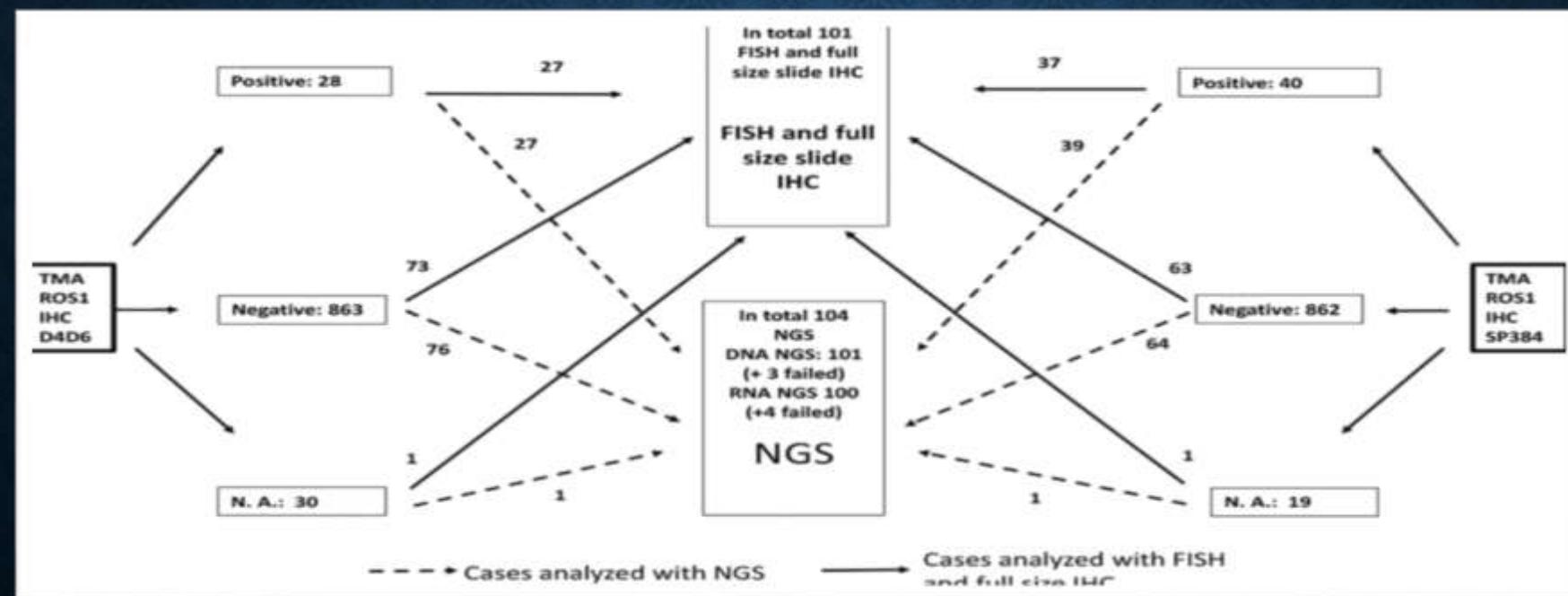
Table 1 Demographic-, clinical and histopathological variables at baseline

	All frequency, n (%)	ROS1 IHC D4D6 Total: 891 Missing:30		ROS1 IHC SP384 Total: 902 Missing: 19	
		Positive	Negative	Positive	Negative
Total	921 (100%)	28 (3.1%)	863 (96.9%)	40 (4.4%)	862 (95.6%)
Age, median years (range)	67.5 (39.2–87.0)	67.8 (51.3–81.6)	67.5 (39.2–87)	68.4 (46.4–82.6)	67.5 (39.2–87)
Sex					
Male	474 (51.5%)	13 (46.4%)	447 (51.8%)	19 (47.5%)	444 (51.5%)
Female	447 (48.5%)	15 (53.6%)	416 (48.2%)	21 (52.5%)	418 (48.4%)
Smoking status					
Never smoker	64 (6.9%)	3 (10.7%)	61 (7.1%)	11 (27.5%)	53 (6.1%)
Current/former smoker	857 (93.1%)	25 (89.3%)	802 (92.9%)	29 (72.5%)	809 (93.9%)
Median pack-year	32.9	24	31.5	23.8	31.5
pStage					
Ia and Ib	501 (54.4%)	17 (60.7%)	463 (53.7%)	26 (65%)	462 (53.6%)
Ila and Ib	270 (29.3%)	8 (28.6%)	256 (29.7%)	8 (20.0%)	257 (29.8%)
III a and b	137 (14.9%)	2 (7.1%)	132 (15.3%)	5 (12.5%)	131 (15.2%)
IV	11 (1.2%)	1 (3.6%)	10 (1.2%)	1 (2.5%)	10 (1.2%)
Unknown stage	2 (0.2%)		2 (0.2%)		2 (0.2%)
Histology					
Adenocarcinoma (incl. former bronchioalveolar carc.)	542 (58.8%)	27 (96.4%)	495 (57.4%)	37 (92.5%)	492 (57.1%)
Adenosquamous	16 (1.7%)	0	16 (1.9%)	0	16 (1.9%)
Large cell carcinoma	28 (3.0%)	0	27 (3.1%)	0	27 (3.1%)
Squamous cell carcinoma	300 (32.0%)	0	291 (33.7%)	3 (7.5%)	292 (33.9%)
Other	35 (3.8%)	1 (3.6%)	34 (3.9%)	0	35 (4.1%)

The majority of patients had adenocarcinoma or squamous cell carcinoma and were in stage I and II. Missing: Samples with too few viable tumourcells in the TMAs

Le flux d'analyse

- Montre le parcours des échantillons :
 - ✓ 921 cas initiaux → IHC (D4D6 et SP384)
 - ✓ Cas positifs → tests **FISH** et **NGS**.
 - ✓ En tout, 101 cas testés par FISH, 104 par NGS.



Distribution des marqueurs tumoraux

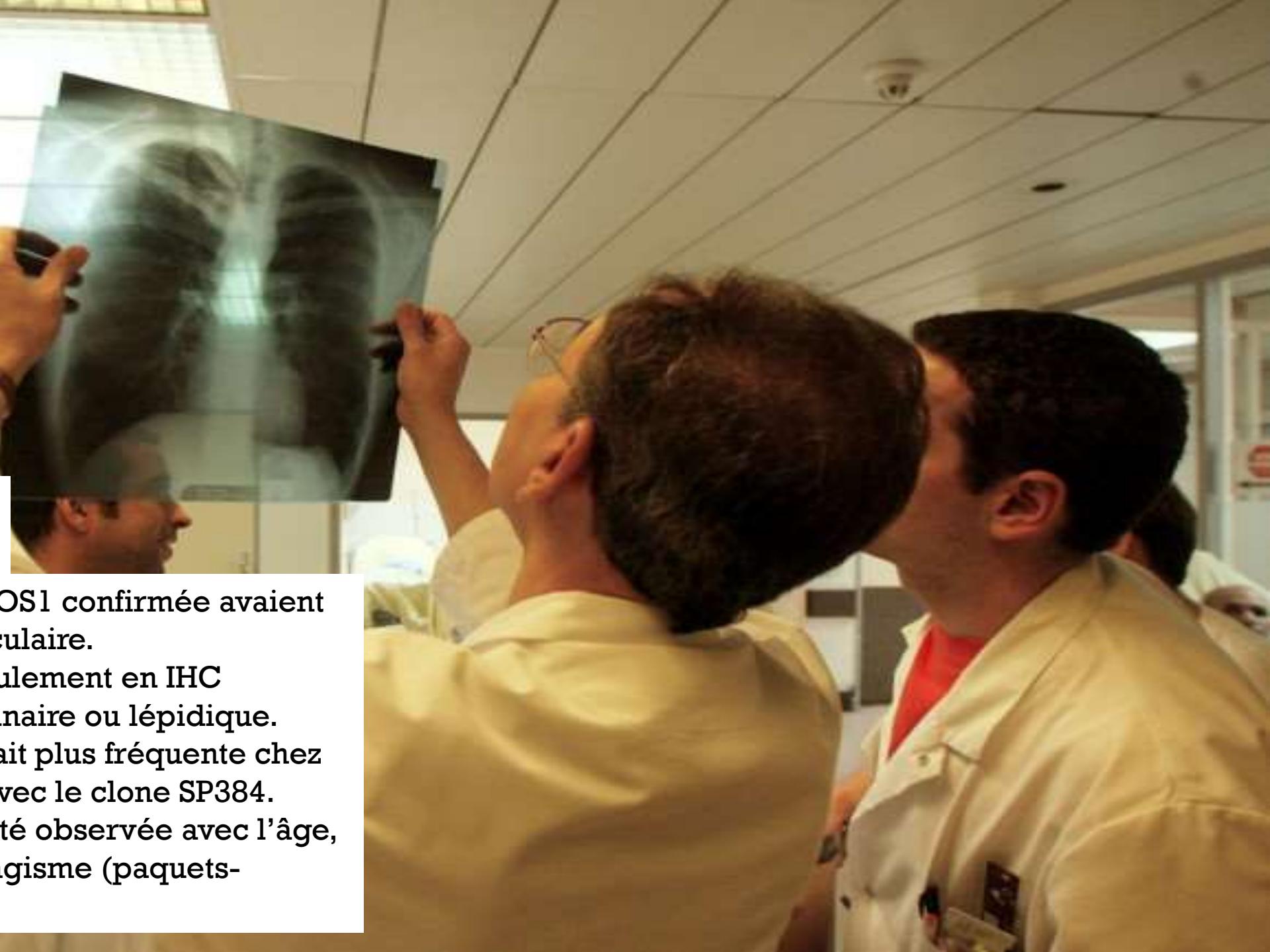
- La majorité des cas étaient **négatifs ou faiblement marqués**.
- Les cas diffus/intenses (fortement positifs) sont rares :
 - D4D6 : 8 cas
 - SP384 : 15 cas
- Quelques fusions détectées par **NGS** : ROS1 etc ...

scoring group	totally negative	focal, weak	focal, moderate/strong	diffuse, weak	diffuse, moderate/strong	no viable tumour cells
D4D6 TMA N (%)	837 (90.9)	26 (2.8)	1 (0.1)	19 (2.1)	8 (0.9)	30 (3.3)
Mean/median H-score (range)	0	18.7/20 (5–40)	35/35 (35)	82.6/80 (60–130)	221.3/220 (160–300)	
FISH positive	2/68	0/5	0/1	0/19	3/7	0/1
NGS	69/837	7/26	1/1	18/19	8/8	1/30
-RNA/Fusions	ALK: 1 FGFR3: 1 MYB: 1 RET: 1 Failed: 2 Negative: 63	Negative: 6 Failed: 1	Negative: 1	Met exon 14 skipping: 1 Failed: 1 Negative: 16	ROS1: 3 Negative: 5	Negative: 1
SP384 TMA N (%)	827 (89.8)	35 (3.8)	1 (0.1)	24 (2.6)	15 (1.6)	19 (2.1)
Mean/median H-score (range)	0	25.3/30 (5–40)	40/40 (40)	100.4/100 (60–140)	204/200 (120–300)	
FISH positive (Positive/total tested)	2/56	0/7	0/1	0/21	3/15	0/1
NGS	60/827	4/35	1/1	23/24	15/15	1/19
-RNA/Fusions	FGFR3: 1 MYB: 1 Failed: 2 Negative: 56	RET: 1 Negative: 3	Negative: 1	ALK: 1 MET: 1 Failed: 1 Negative: 20	ROS1: 3 Failed: 1 Negative: 11	Negative: 1

Discussion

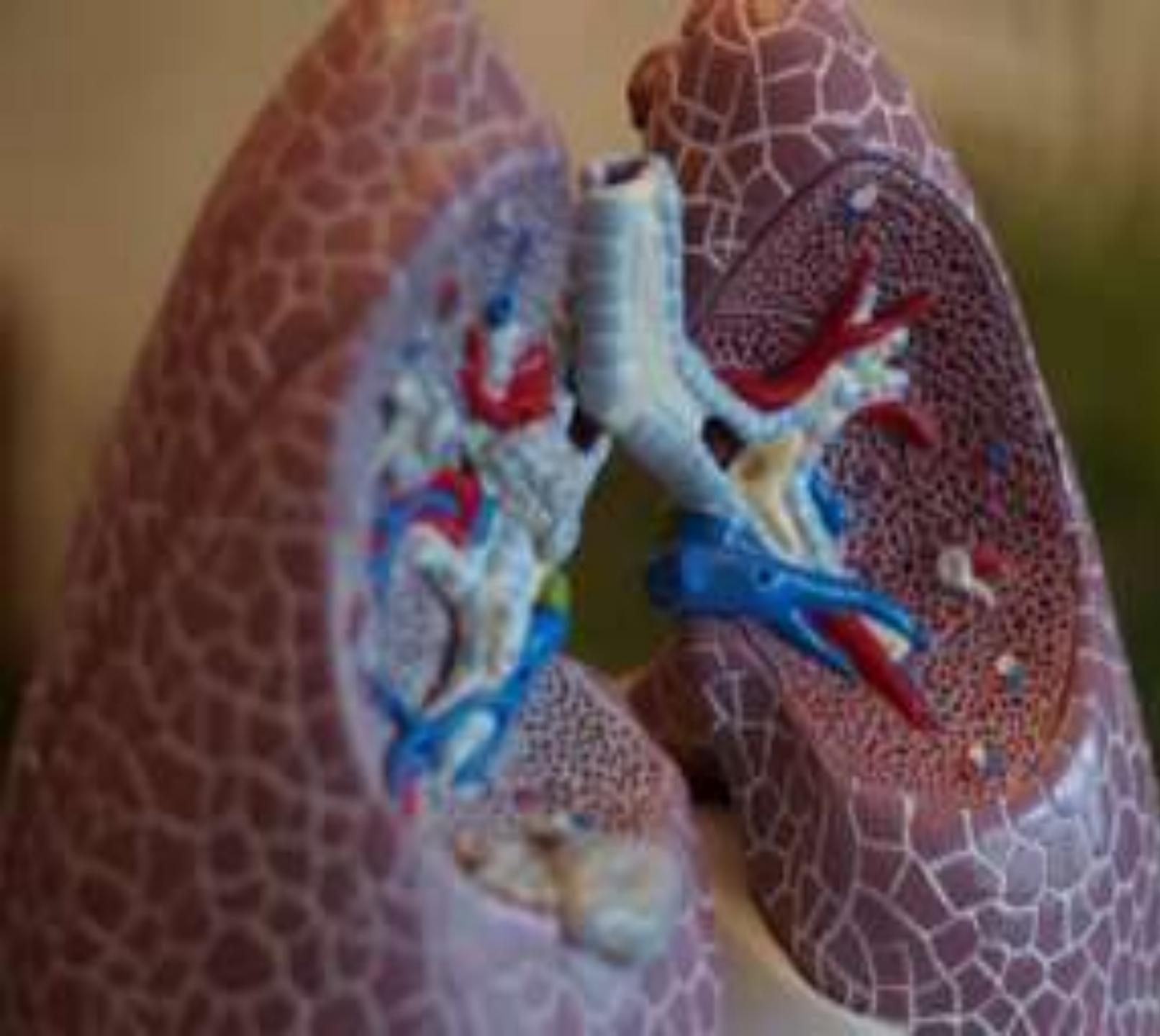
Les tumeurs avec fusion ROS1 confirmée avaient un patron solide ou trabéculaire.

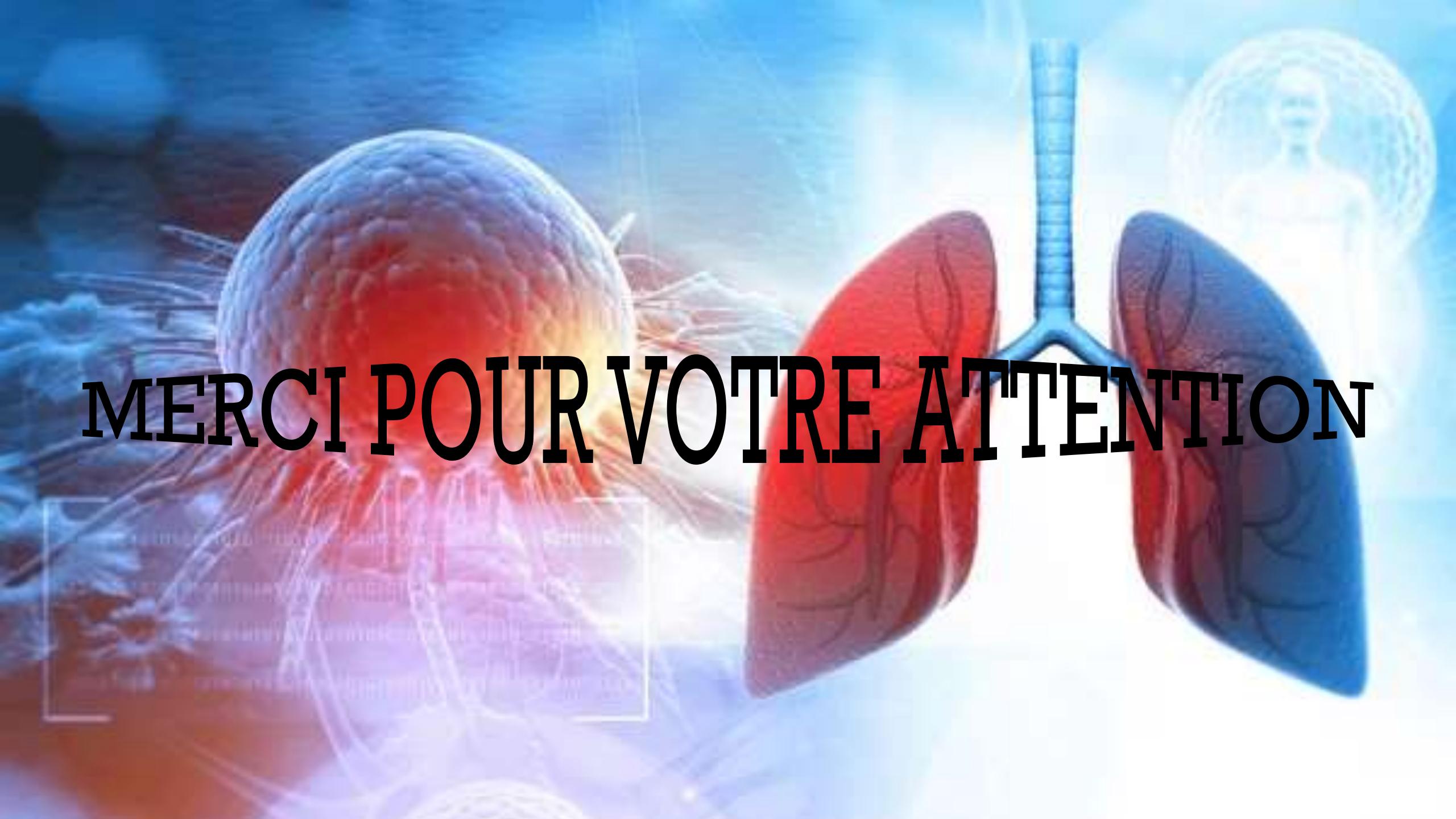
- Les tumeurs positives seulement en IHC présentaient un patron acinaire ou lépidique.
- L'expression de ROS1 était plus fréquente chez les non-fumeurs, surtout avec le clone SP384.
- Aucune corrélation n'a été observée avec l'âge, le sexe, le stade ou le tabagisme (paquets-années).



CONCLUSION

Les réarrangements du gène ROS1 sont rares mais cliniquement importants dans le cancer du poumon à un stade précoce. L'immunohistochimie (IHC) seule n'est pas suffisante pour poser le diagnostic, car elle peut produire des faux positifs. Une confirmation par des méthodes moléculaires (FISH ou NGS) est donc indispensable. L'étude souligne l'importance d'un dépistage multimodal, rigoureux et standardisé pour une détection fiable des fusions ROS1.





MERCI POUR VOTRE ATTENTION