



HAL
open science

Cancer avec addiction oncogénique, détection de nouvelles cibles et recherche de mécanismes de résistance

Philippe Jamme

► **To cite this version:**

Philippe Jamme. Cancer avec addiction oncogénique, détection de nouvelles cibles et recherche de mécanismes de résistance. Sciences du Vivant [q-bio]. Université de Lille, 2021. Français. NNT : 2021LILUS018 . tel-04558810

HAL Id: tel-04558810

<https://hal.science/tel-04558810>

Submitted on 25 Apr 2024

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Public Domain

École doctorale biologie – santé

UMR 9020 CNRS - UMR-S 1277 Inserm - Université de Lille - Institut Pasteur de Lille - CHU de Lille

Thèse de doctorat
En vue de l'obtention du grade de
Docteur de l'Université Lille 2 Droit et Santé

Spécialités : physiologie, physiopathologie, biologie systémique médicale

Spécialité : Biologie

Cancer avec addiction oncogénique, détection de nouvelles cibles et recherche de mécanismes de résistance

Soutenue le 25 Janvier 2021 par Philippe Jamme

Sous la direction de : M. le Pr Alexis Cortot

Co-encadrante : Mme le Dr Zoulika Kherrouche

Présidente du Jury : Mme le Pr Réjane Paumelle-Lestrelin

Rapporteurs : Mr le Pr Nicolas Girard

Mr le Dr Antonio Maraver

Examineur : Mme le Dr Stephanie Kermogant

"Science sans conscience n'est que ruine de l'âme"

Pantagruel,

François Rabelais ,

Table des matières

1	Résumé de la thèse	4
2	ABRÉVIATIONS	9
3	Liste des Figures et des Tableaux:	12
1	Les cancers bronchopulmonaire avec addiction oncogénique	15
1.1	Généralités sur les cancers pulmonaires.....	15
1.2	Prise en charge des CBNPC avec addiction oncogénique	18
1.2.1	Les outils thérapeutiques disponibles.....	18
1.2.2	Les CBNPC avec mutation <i>EGFR</i>	21
1.2.3	Les CBNPC avec réarrangement <i>ALK</i>	23
1.2.4	Les autres altérations moléculaires dans les CBNPC	26
2	Structure et rôle physiologique du récepteur MET et de son ligand l'HGF	30
2.1	Découverte et structure du récepteur MET	30
2.2	Structure et synthèse de l'HGF.....	32
2.3	Rôle physiologique du récepteur MET.....	34
3	Activation, voies de signalisation et régulation du récepteur MET	36
3.1	Activation du récepteur MET	36
3.2	Voies de signalisation du récepteur MET	37
3.2.1	La voie MET-PI3K.....	37
3.2.2	La voie MET-MAPKinase	41
3.2.3	La voie MET-STAT3.....	41
3.2.4	La voie MET-CRK-RAC1.....	42
3.3	Régulation du récepteur MET	43
3.3.1	Voie de régulation HGF-dépendante.....	43
3.3.2	Voie de régulation HGF-indépendante.....	44
4	Les altérations de MET dans le cancer	47
4.1	Les mutations du domaine kinase de MET (MET/DK)	47
4.2	Les mutations du domaine sémaphorine (MET/DS)	48
4.3	Les fusions du gène <i>MET</i>	50
4.4	Les amplifications du gène <i>MET</i>	52
4.5	Les mutations <i>METex14</i>	54
4.5.1	Découverte des mutations <i>METex14</i>	54
4.5.2	Caractéristiques cliniques histologiques et moléculaires des patients porteurs d'un CBNPC avec mutation <i>METex14</i>	55
4.5.3	Revue des ITK MET dans la prise en charge des CBNPC mutés <i>METex14</i>	56
5	Objectif de la thèse	60
6	ARTICLE	61
7	DISCUSSION	95
7.1	Médecine de précision et mécanisme de résistance.....	96
7.1.1	Définition d'un mécanisme de résistance	96
7.1.2	Revue des mécanismes de résistance et des biomarqueurs de réponse aux ITK MET	98
7.2	Voie PI3K et résistance aux thérapies anticancéreuses	104
7.3	Détection des biomarqueurs : enjeux et problématiques	105
7.3.1	Place des différents outils de biologie cellulaire et moléculaire dans la détection des altérations moléculaires en oncologie.....	106
7.3.2	Enjeu et défi de la détection des mécanismes de résistances en routine clinique.....	108
7.3.3	Impact de la détection de co-altérations sur le choix thérapeutique	109

7.4	Conclusion.....	109
8	Reference.....	111
9	Annexe.....	138

1 Résumé de la thèse

Introduction

La détection d'altérations moléculaires susceptibles de répondre à des thérapies ciblées ainsi que l'identification des mécanismes de résistance à ces thérapies représentent deux aspects majeurs de la médecine de précision qui ont été étudiés dans mes travaux de thèse.

Articles

Mes travaux de thèses se sont d'abord focalisés sur l'étude des altérations de la voie PI3K-AKT dans la résistance aux inhibiteurs tyrosines kinase MET (ITK MET) dans les cancers bronchiques non à petites cellules porteurs d'un saut de l'exon 14 de MET (CBNPC-METex14) (article n°1). En constituant une cohorte de 65 patients, nous avons mis en évidence que des altérations de la voie PI3K (i.e mutation *PIK3CA* et perte de PTEN) étaient communes dans les CBNPC METex14. Nous avons observé que le taux de réponse à un ITK MET des patients porteurs d'une co-altération MET/PI3K était plus faible que dans les CBNPC-METex14 sans altération PI3K. *In vitro*, l'étude de lignées cellulaires mutées METex14 avec une altération de la voie PI3K a permis de confirmer la résistance aux ITK MET, surmonter par l'ajout d'un inhibiteur PI3K.

Par la suite, nous nous sommes intéressés à la recherche de nouveaux biomarqueurs prédictifs de réponse aux ITK MET. Nous avons identifié un patient porteur d'un cholangiocarcinome avec une fusion CAPZA-2-MET. Ce patient, initialement réfractaire à la chimiothérapie, a reçu un ITK MET (capmatinib) permettant l'obtention d'une réponse objective. Après plusieurs mois de traitement, une progression tumorale nous a conduit à mettre en évidence l'émergence d'une mutation du domaine kinase de MET (article n°2).

Enfin, nous nous sommes intéressés à la faisabilité de la recherche des mutations de résistance à d'autres thérapies ciblées, les ITK ALK, chez les patients porteurs d'un CBNPC ALK+ (article n°3). Nous avons établi une cohorte de 23 patients porteurs d'un CBNPC ALK+ traité par un ITK ALK pour lesquels une biopsie à progression était disponible. Un mécanisme de résistance a été identifié chez 9 patients (39%). Tous les patients ayant reçu un ITK ALK présumé actif sur le mécanisme de résistance détecté ont présenté une réponse de leur maladie. Ces résultats confirment l'utilité de rechercher les mécanismes de résistance afin d'orienter les choix thérapeutiques

Conclusion

Ces travaux illustrent la pertinence d'identifier des cibles thérapeutiques nouvelles, comme les mutations METex14 ou les fusions de MET. Ils illustrent aussi les limites de cette approche avec la survenue de mécanismes de résistance primaire ou acquise, et la nécessité de les identifier pour pouvoir mieux les surmonter.

Introduction

The identification of mechanisms of resistance to targeted therapies and the detection of new predictive biomarkers of response are crucial to improving patient management. My PhD thesis work focuses on these two aspects of precision medicine.

Articles

My thesis work explores the study of alterations in the PI3K-AKT pathway as a mechanism of resistance to MET tyrosine kinase inhibitors (MET TKI) in non-small cell lung cancers (NSCLC) with MET exon 14 skipping mutation (NSCLC-METex14) (Article #1). We reviewed clinical data from 65 patients with METex14 NSCLC, assessing PI3K pathway alterations. We observed that PI3K pathway alterations (i.e., PIK3CA mutation and loss of PTEN expression) are common in METex14 NSCLC. We discovered that the clinical activity of MET TKI is lower in patients with METex14 NSCLC and PI3K alteration. *In vitro* studies of METex14 mutated cell lines with alterations in the PI3K pathway confirmed resistance to METTKI, which can be overcome by the addition of a PI3K inhibitor.

Subsequently, we focused on research for new predictive biomarkers of response to MET TKI. We examined a cholangiocarcinoma patient with a CAPZA-2-MET fusion and observed that MET fusion is associated with a response to the MET TKI capmatinib. We also found the emergence of a MET kinase mutation (D1228N) as a potential resistance mechanism to first generation MET TKI (Article #2).

Finally, we investigated the feasibility and relevance of detection of mechanisms of resistance to ALK inhibitors in ALK-rearranged NSCLC. We reviewed clinical data from 23 patients with advanced ALK-rearranged NSCLC who had undergone at least one repeat biopsy at progression during an ALK TKI treatment. A resistance mechanism was identified in 9 of the 23 patients (39%). All patients who received a TKI presumed to act on the detected ALK mutant achieved disease control. These results confirm that the detection of mechanism of resistance is suitable for routine practice and can help select the best treatment for patients.

Conclusions

This work illustrates the relevance of identifying new therapeutic targets, such as METex14 mutations or MET fusions. It also illustrates the limitations of this strategy with the emergence of primary or acquired mechanisms of resistance, and the necessity to identify them in order to overcome them.

REMERCIEMENTS

Je remercie le Pr Nicolas Girard et le Dr Antonio Maraver, pour avoir accepté d'évaluer mes travaux en tant que rapporteur. Je remercie le Pr Rejane Paumelle d'être présidente de mon jury de thèse et d'avoir accepté d'examiner mes recherches. Je remercie le Dr Stephanie Kermogant d'avoir accepté d'être examinatrice à mon jury de thèse

Au Pr Alexis Cortot et Dr Zoulika Kherrouche pour m'avoir accompagné durant ces dernières années et d'avoir fait preuve de patience et de pédagogie. Trois belles années au sein de l'UMR 8161 qui m'auront beaucoup apportées tant sur le plan humain que sur la rigueur.

Au Dr David Tulasne pour ses conseils tout au long de mon parcours et aux (très nombreuses) questions lors des présentations trimestrielles qui m'ont permis de progresser sur mon sujet.

Au Pr Marie-Christine Copin et au Dr Clotilde Descarpentries pour l'écoute et la grande aide apportée durant ces années à la réalisation de nos travaux. Je remercie le docteur Sarah Humez d'avoir assuré la continuité du Pr Copin sur les différents projets et lui souhaite plein de réussite. Je remercie l'ensemble des membres de l'équipe « Target, Efficacy and resistance to anti-tumor targeted therapies » pour ces moments de joies partagés. Catherine, Fabrice, Audrey, Angela (et la petite Julia), Sonia.

Je remercie mes amis et amies doctorants et étudiants pour leurs conseils, leurs aides et leurs sens de l'humour : Simon, Leslie, Anthony, Marie et Martine, Camille, Vincent, Erwan, Alexandre, Abhishek, Marta et Sarah.

Je remercie toute l'équipe du service de Dermatologie du Pr Laurent Mortier de m'avoir accueilli pour la réalisation du clinicat.

Je remercie toute ma famille

A ma Maman et Eric d'un grand soutien ces derniers mois

A Matthieu, Amélie et mes deux neveux Léopold et Côme

A Arielle et François pour le soutien inconditionnel

A Estelle et ma fille Albane, les deux femmes de mon cœur

PUBLICATIONS EN LIEN AVEC LES TRAVAUX DE THÈSE

Publications :

Jamme P, Fernandes M, Copin MC, Descarpentries C, Escande F, Morabito A, Grégoire V, Jamme M, Baldacci S, Tulasne D, Kherrouche Z* and Cortot AB*. Alterations in the PI3K pathway drive resistance to MET inhibitors in NSCLC harboring MET exon 14 skipping mutations. *Journal of Thoracic Oncology*. 2020 May;15(5):741.

Baldacci S., Figeac M., Antoine M., Descarpentries C., Kherrouche Z., **Jamme P.**, Copin MC., Tulasne D., Nanni I., Beau-Faller M., Melaabi S., Levallet G., Quoix E., Moro-Sibilot D., Friard S., Missy P., Barlesi F., Cadranel J., and Cortot AB. High MET overexpression does not predict the presence of MET exon 14 splice mutations in NSCLC: results from the IFCT Predict.amm study. *J Thorac Oncol*. 2020 Jan;15(1):120-124.

Jamme P., Descarpentries C., Gervais R., Dansin E., Wislez M., Grégoire V., Richard N., Baldacci S., Rabbe N., Kyheng M., Kherrouche Z., Escande F., Copin MC. and Cortot AB. Relevance of detection of mechanisms of resistance to ALK inhibitors in ALK+earranged NSCLC in routine practice. *Clin Lung Cancer*. 2019 Jul;20(4):297-304.

Descarpentries C, Leprêtre F, Escande F, Kherrouche Z, Figeac M, Sebda S, Baldacci S, Grégoire V, **Jamme P**, Copin MC, Tulasne D, Cortot AB. Optimization of routine testing for MET exon 14 splice site mutations in non-small cell lung cancer patients. *J Thorac Oncol*. 2018 Dec;13(12):1873-1883.

Duplaquet L, Kherrouche Z, Baldacci S, **Jamme P**, Cortot AB, Copin MC, Tulasne D. The multiple paths towards MET receptor addiction in cancer. *Oncogene*. 2018 Jun;37(24):3200-3215.

Communications :

Posters:

ESMO 2018 1036 - Clinical characteristics and outcomes of non-small cell lung cancer (NSCLC) patients harboring MET exon 14 splice sites mutations.

Communications Orales :

WCLC 2017: MA 07.06: Detection of Mechanisms of Resistance to ALK Inhibitors in Routine Practice: A Retrospective Study

2 ABRÉVIATIONS

ADAM : A Disintegrin And Metalloproteinase

AC : Anticorps

AGC : cAMP-dependent, cGMP-dependent and protein kinase C

AKT : AKT8 virus oncogene cellular homolog

ALK : Anaplastic Lymphoma Kinase

AMM : Autorisation de Mise sur le Marché

ANSM : L'agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé

ARN : Acide RiboNucléique

ATU : Autorisation temporaire d'utilisation

BAD : Beclin (Bcl)-2 antagonist of cell death

BCR-ABL: Breakpoint cluster region protein- Abelson murine leukemia virus

BRAF : b-Rapidly Accelerated Fibrosarcoma

BTK : tyrosine kinase de Bruton

CAPZA2 : F-actin-capping protein subunit alpha-2

CBL : Casitas B-lineage Lymphoma

CBNPC : Cancer Bronchique Non à Petites Cellules

CEP7 : Pericentromeric regions of chromosomes 7

CLIP2 : CAP-Gly Domain Containing Linker Protein 2

CRK : CT regulator kinase

CTLA-4 : Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4

DCTN1 : Dynactin subunit 1

EGFR : Epidermal Growth Factor Receptor

EML4/ALK : Echinoderm microtubule-associated protein like 4

ERK : Extracellular signal Regulated Kinase

EPS15 : Epidermal Growth Factor Receptor Pathway Substrate 15

ETS-1 : Avian Erythroblastosis Virus E26 homolog-1

FAK : Focal Adhesion kinase

FAS : Fibroblast Associated

FGFR : Fibroblast growth factor receptor

FLIP : FLICE-like inhibitory protein/Protéine FLICE-Like inhibitrice

FLT3 : fms like tyrosine kinase 3

FISH : Fluorescence In Situ Hybridization

GAB1 : GRB2-associated binder 1

GRB2 : Growth factor Receptor –Bound protein 2

GSK3 : Glycogen synthase kinase 3 beta

HER : Human Epidermal growth factor Receptor

HGF/SF : Hepatocyte Growth Factor/ Scatter Factor

HLA-DRB1 : HLA class II histocompatibility antigen, DRB1 beta chain

HRS : HGF Regulated tyrosine kinase Substrate

IGF-1R : Insulin growth factor receptor 1
INSR : Insulin receptor precursor
IPT : Immunoglobulin-like region in Plexin and Transcription factors
ITK : Inhibiteur de Tyrosine Kinase
ITSK : serine-thréonine kinase
KIF5 : Kinesin-related protein 5
KLC1 : Kinesin light chain 1
KRAS : V-Ki-ras2 Kirsten Rat Sarcoma viral oncogene homolog
LBx : Liquid biopsy
LRRFIP1 : Leucine-rich repeat flightless-interacting *protein 1*
MAPK : Mitogen Activated Protein Kinase
MET/HGFR : Hepatocyte growth factor receptor
MEK : Mitogen-activated extracellular signal-regulated protein kinase
MDM2 : Murine Double Minute 2
mTOR : mammalian Target Of Rapamycin
NGS : Next generation sequencing
NTRK : Neurotrophic tyrosine kinase
PD-1/L-1 : *Programme death-1/ligand-1*
PEA3 : Polyoma enhancer activator 3
PH : Pleckstrin Homology domain/ Domaine d'homologie à la pleckstrin
PI3K : Phosphatidyl Inositol 3 Kinase
PIP2 (4, 5) : Phosphatidyl Inositol (4, 5) biPhosphate
PIP3 (3, 4, 5) : Phosphatidyl Inositol (3, 4, 5) triphosphate
PKC : Protéine kinase C
PP2A : Protéine phosphatase 2A
PPFIB1 : Liprin-beta-1
PSI : Plexin Semaphorin Integrin
PTEN : Phosphatase and TENsin homolog
PTPN3 : Protein tyrosine phosphatase, non receptor type 3
PTPRZ1 : protein tyrosine phosphatase receptor type Z1
RAC1 : RAs-related C3 botulinum toxin substrate 1
RAF : Rapidly Accelerated Fibrosarcoma
RET : Rearranged during transfection
ROS1 : ROS Proto-Oncogene 1
RTK : Récepteur Tyrosine Kinase
RT-PCR : Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction
SEMA : Semaphorin
SHC : SH2 domain containing transforming protein
SRC : Sarcome proto-oncogene
STK22D : Serine/threonine kinase 22D

TBx : Tumor Biopsy

TFG : TRK-Fused Gene

TGF : Transforming growth factor

TPR : Translocated Promoter Region

TRIM4 : Tripartite motif-containing protein 4

ZKSCAN1 : Zinc finger protein with KRAB and SCAN domains

3 Liste des Figures et des Tableaux:

Figure 1: Les altérations moléculaires responsables d'une addiction oncogénique dans les CBNPC et les différentes thérapies ciblées (page 16)

Figure 2 : Représentation schématique de la structure du récepteur MET et des principaux sites de régulation et d'activation (page 32)

Figure 3 : Représentation schématique de la structure de l'HGF (page 34)

Figure 4: Représentation schématique des PI3K de classe I (page 38)

Figure 5 : Représentation schématique des différentes voies de signalisation du récepteur MET (page 40)

Figure 6 : Représentation schématique de la voie de signalisation MET-PI3K-AKT (page 42)

Figure 7 : Représentation schématique des voies de régulation HGF-dépendantes et HGF-indépendantes du récepteur MET (page 46)

Figure 8 : Représentation des mutations du domaine SEMA, du domaine juxtamembranaire et du domaine kinase de MET identifiées dans les CBNPC (page 46)

Figure 9 : Représentation schématique des fusions du gène MET. Figure issue de la publication « The multiple paths towards MET receptor addiction in cancer » par Duplaquet et al. (page 51)

Figure 10 : Représentation schématique des mutations des sites d'épissage de l'exon 14 de MET. Schéma issu de l'article « MET exon 14 splicing sites mutations: a new therapeutic opportunity in lung cancer » de Baldacci et al. (page 56)

Table 1 : Essais cliniques des ITK MET dans les CBNPC METex14 (page 59)

Introduction

La médecine personnalisée, appelée également médecine de précision, a pour objectif d'individualiser la prise en charge de chaque patient.

En oncologie, l'identification des oncogènes a été l'une des grandes avancées de la médecine personnalisée (Eifert et Powers 2012). Le premier oncogène *v-src* responsable du sarcome du poulet a été découvert en 1976. Cette découverte a été récompensée d'un prix Nobel en 1989. Un oncogène se définit par une altération moléculaire sur un gène responsable de la transformation d'une cellule normale en cellule tumorale (oncogénèse). Lorsque l'activité de cet oncogène est nécessaire et suffisante au processus oncogénique, il est appelé driver car il est responsable d'une addiction oncogénique. L'addiction oncogénique se définit par la dépendance en termes de survie, d'invasion et de prolifération de la cellule tumorale vis-à-vis des modifications générées par l'expression et/ou l'activité anormale d'un oncogène.

Bien que conférant un avantage, cette dépendance est également une faiblesse pouvant être ciblée afin de bloquer la prolifération des cellules tumorales. Deux types de thérapies ciblées sont utilisées en oncologie : les inhibiteurs protéine kinase regroupant les inhibiteurs tyrosine kinase (ITK) et serine-thréonine kinase (ITSK), d'une part, et les anticorps monoclonaux (Ac monoclonaux), d'autre part (Kannaiyan et Mahadevan 2018 ; Pento 2017). L'utilisation des thérapies ciblées est récente, datant du début des années 2000, avec l'arrivée des anti-HER2 (*Human Epidermal growth factor Receptor 2*) dans les cancers du sein (Romond et al. 2005), des anti-EGFR (*Epidermal growth factor Receptor*) dans les cancers du poumon (Shepherd et al. 2005), et des inhibiteurs des fusions *bcr-abl* (*Breakpoint cluster region protein-Abelson murine leukemia virus*) dans les leucémies myéloïdes chroniques (Druker et al. 2001). Aujourd'hui, les thérapies ciblées sont utilisées dans une grande majorité des cancers. Bien qu'elles montrent une bonne efficacité, avec des taux de réponse fréquemment supérieurs à 70 %, leur durée d'action est parfois assez limitée, et la progression tumorale est inéluctable après plusieurs mois de traitement. Les mécanismes de résistance présents avant traitement (résistance primaire) ou émergeant sous traitement (résistance acquise) sont les principales causes d'échec thérapeutique.

L'identification de toutes les altérations moléculaires à l'origine d'un processus oncogénique ou responsables de la résistance est un défi pour la médecine de précision dans laquelle s'inscrit mon projet de thèse.

La première partie du manuscrit sera tout d'abord consacrée à l'étude des carcinomes bronchiques non à petites cellules (CBNPC). Environ 50 % des CBNPC présentent un oncogène driver dont la majorité est actionnable par une thérapie ciblée (Planchard *et al.* 2018). Durant mes travaux de thèse, nous nous sommes particulièrement intéressés aux CBNPC avec altération du récepteur MET (*Hepatocyte growth Factor receptor*). Dès lors, nous proposons une revue du récepteur MET et de ses altérations dans le cancer.

La seconde partie sera consacrée à nos travaux de recherche. Dans un premier temps, nous nous sommes focalisés sur l'étude des mécanismes de résistance dans les CBNPC porteurs d'une mutation responsable d'un saut de l'exon 14 de MET (CBNPC METex14). Sur la base des données d'efficacité des inhibiteurs de MET dans les CBNPC METex14 (\approx 50 % de taux de réponse), nous avons émis l'hypothèse de la présence de mécanismes primaires de résistance. Nos données ont permis d'identifier la voie de signalisation PI3K-AKT dans la résistance aux inhibiteurs tyrosine kinase de MET (ITK MET). Par ailleurs, nous avons proposé une stratégie thérapeutique afin de surmonter ces résistances.

Dans un second temps, nous avons identifié un patient porteur d'un cholangiocarcinome avec une fusion de MET. Un traitement par ITK MET a été introduit et a permis l'obtention d'une réponse importante, malheureusement de courte durée. La recherche d'un mécanisme de résistance acquis sous ITK MET nous a conduit à identifier une mutation du domaine kinase de MET.

Enfin, un dernier travail a porté sur la faisabilité et l'utilité dans la pratique clinique de la recherche des mécanismes de résistance dans les CBNPC porteurs d'un réarrangement du gène *ALK* (CBNPC ALK+). En établissant une cohorte de patients ayant présenté une progression sous ITK ALK, nous avons identifié plusieurs tumeurs pour lesquelles un mécanisme de résistance a pu être identifié. De plus, l'ensemble des patients ayant reçu un ITK ALK, adapté au mécanisme de résistance identifié, avait présenté une réponse. Ces travaux ont ainsi démontré que dans les CBNPC ALK+ la recherche des mécanismes de résistance était possible et pouvait influencer la décision thérapeutique.

1 Les cancers bronchopulmonaire avec addiction oncogénique

1.1 Généralités sur les cancers pulmonaires

En 2018, environ 50 000 nouveaux cas de cancers bronchiques ont été diagnostiqués en France. Les cancers du poumon se situent au quatrième rang des cancers incidents, tous sexes confondus (deuxième rang chez l'homme et quatrième rang chez la femme). Environ 85 % des cancers pulmonaires diagnostiqués sont des CBNPC. Avec environ 31 000 décès par an en France, les cancers bronchiques sont la première cause de mortalité par cancer. Durant la période 1990-2018, la mortalité par cancers du poumon a progressivement diminué chez l'homme (- 0,3 %/an) mais a crû chez la femme (+ 5,3 %/an) du fait d'une augmentation du tabagisme (cf. référentiel de l'institut national du cancer).

Malgré les progrès thérapeutiques récents (thérapies ciblées et immunothérapies), le taux de survie à cinq ans, tous stades confondus, est inférieur à 20 % (Planchard *et al.* 2018).

L'identification d'altérations moléculaires sur des oncogènes a profondément modifié la prise en charge des patients.

L'analyse moléculaire représente une part prépondérante de la prise en charge des patients atteints d'un CBNPC. On estime à environ 60 % les tumeurs porteuses d'une altération moléculaire impliquant un oncogène dont plus de la moitié sont actionnables par une thérapie (Planchard *et al.* 2018) (**Figure 1**).

Diverses techniques sont régulièrement utilisées pour la détection de anomalies moléculaires telles que le séquençage de nouvelle génération (NGS), l'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH), la puce d'hybridation génomique comparative (CGH) (Gregg, Li et Yoneda 2019). On distingue trois grandes familles d'anomalies moléculaires : les mutations dont le gène KRAS (*V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*) est le plus fréquemment altéré dans les cancers du poumon (33 %), suivi par le gène EGFR dans environ 10 à 15 % des cas et par les gènes MET, BRAF (*b-Rapidly Accelerated Fibrosarcoma*), HER2, PIK3CA (*phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate kinase*) dans 1 à 3 % des cas (**Figure 1**). Les mutations peuvent être des substitutions (remplacement d'un nucléotide), des délétions (perte d'une séquence nucléotidique) ou des insertions (ajout d'une séquence nucléotidique). Les

mutations sont le plus souvent retrouvées au niveau du domaine kinase de la protéine (ex : EGFRdel19, PIK3CAH1044R, BRAFV600E) ou au niveau d'un site régulateur (ex : PIK3CAE544K, METex14).

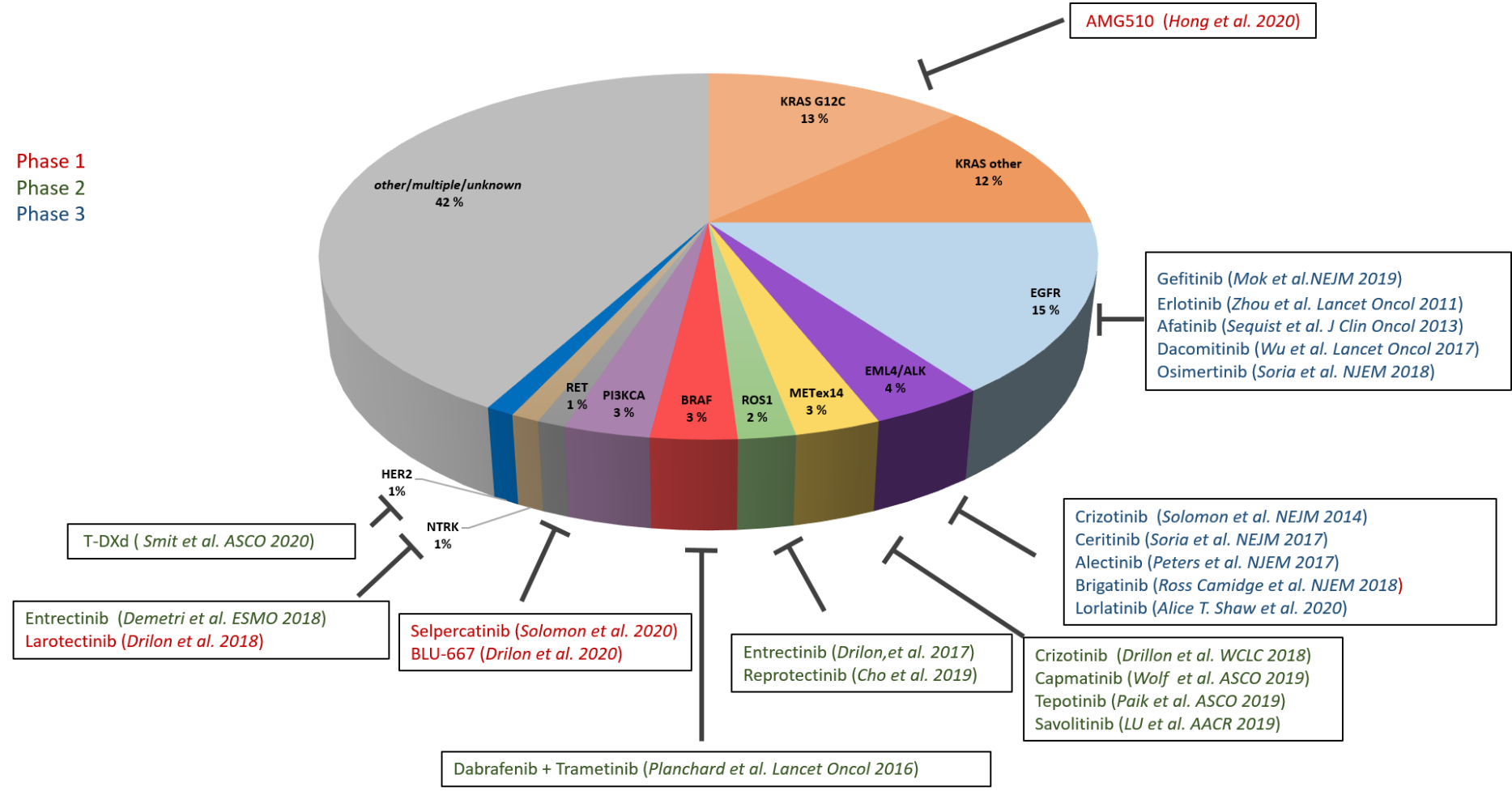
Les translocations ou réarrangements correspondent à des échanges de matériels chromosomiques entre deux chromosomes non homologues. Dans les CBNPC, plusieurs gènes peuvent être impliqués dans des mécanismes de réarrangement tels que les gènes *ALK* (*Anaplastic Lymphoma Kinase*), *ROS1* (*ROS Proto-Oncogene 1*) et *NTRK* (*Neurotrophic tyrosine kinase*).

Les amplifications se définissent par une accumulation surnuméraire d'un segment chromosomique. Elles ont pour conséquence une augmentation du nombre de copies d'un gène conduisant à une surexpression du transcrite de ce gène. Parmi les gènes les plus fréquemment amplifiés dans les CNBPC, on retrouve *HER2*, *FGFR* (*Fibroblast growth factor receptor*) et *MET*.

À ce jour, une majorité des altérations moléculaires responsables d'une addiction oncogénique dans les CBNPC sont actionnables par une thérapie ciblée. Nous disposons de plus d'une vingtaine de molécules disponibles pour la prise en charge des CBNPC et leur nombre ne cesse de croître chaque année (**Figure 1**).

Nous nous intéresserons aux différentes altérations responsables d'une addiction oncogénique décrites dans les CBNPC.

Figure 1 : Les altérations moléculaires responsables d'une addiction oncogénique dans les CBNPC et les différentes thérapies ciblées



1.2 Prise en charge des CBNPC avec addiction oncogénique

1.2.1 Les outils thérapeutiques disponibles

Il existe trois options thérapeutiques disponibles dans la prise en charge des CBNPC métastatiques avec une addiction oncogénique : les thérapies ciblées (ITK, ISTK et Ac monoclonaux), la chimiothérapie et l'immunothérapie.

Les ITK, qui constituent la majorité des thérapies ciblées utilisées dans les CBNPC avec addiction oncogénique, sont rapidement devenus le traitement standard en première (voire deuxième) ligne des CBNPC avec addiction oncogénique ciblable, compte tenu de leur supériorité par rapport à la chimiothérapie. Les ITK appartiennent à une famille de petites molécules capables d'inhiber les récepteurs tyrosine kinase (RTK) en ciblant le domaine kinase du récepteur, bloquant ainsi la phosphorylation de la protéine et l'activation des voies de signalisation en aval (Hubbard 2002).

On distingue deux grandes sous-familles : les inhibiteurs dits « irréversibles » qui ont la particularité de former des liaisons covalentes avec le domaine kinase et les inhibiteurs réversibles. Les ITK sont également divisés en deux groupes selon leur mode de liaison : les inhibiteurs compétitifs (types I et II) et allostériques (types III et IV) (Roskoski 2015). Les inhibiteurs compétitifs se fixent au niveau du site de liaison à l'ATP et entrent directement en compétition avec ce dernier. Les inhibiteurs de type I occupent la poche de l'ATP dans une conformation active appelée « DFG-*in* », tandis que les inhibiteurs de type II occupent la poche de l'ATP dans une conformation inactive appelée « DFG-*out* » (Zhang, Yang et Gray 2009). Les inhibiteurs allostériques vont venir se fixer à un site allostérique différent du site de fixation de l'ATP. Les inhibiteurs de type III se fixent au niveau d'un site proche de la poche de l'ATP tandis que les inhibiteurs de type IV se fixent sur un site éloigné (Zhang, Yang et Gray 2009).

La chimiothérapie, est actuellement recommandée en 1^{ère} ligne pour les patients porteurs d'un CBNPC, sans addiction oncogénique, et présentant une contre-indication à l'immunothérapie (D. Planchard et al. 2018). Le protocole de chimiothérapie de référence repose sur une combinaison associant une chimiothérapie de 3^{ème} génération (paclitaxel, gemcitabine, docetaxel, vinorelbine) et un sel de platine (carboplatin, cisplatine) (Schiller et

al. 2002). Une méta analyse de 2005 a montré que le doublet de chimiothérapie (3ème génération + sel de platine) est associé à une réduction du risque de décès de 22% ("Chemotherapy and Supportive Care versus Supportive Care Alone for Advanced Non-Small Cell Lung Cancer" 2010). En présence de certains oncogènes driver, la chimiothérapie a rapidement montré son infériorité par rapport aux ITK. Dès lors, dans la prise en charge des CBNPC avec une addiction oncogénique, la chimiothérapie est reléguée en deuxième ou troisième ligne thérapeutique (Girard 2015).

L'immunothérapie a profondément modifié la prise en charge des CBNPC en situation métastatique. Les molécules de référence actuellement recommandées, dans la prise en charge des CBNPC, sont des anticorps monoclonaux ciblant des points de contrôle de l'immunité tels que les anti PD-1/PDL-1 (*Programme Death 1/Ligand*) et les anti CTLA-4 (*Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*) (D. Planchard et al. 2018). La place de l'immunothérapie dépend essentiellement de 2 différents biomarqueurs, le score d'expression de PDL-1 de la tumeur et sa charge mutationnelle. En présence d'un CBNPC avec un score PDL-1 > 50%, le traitement recommandé en 1^{ère} ligne métastatique repose sur l'association chimiothérapie plus pembrolizumab (anti PD-1). Cette combinaison a été validée, suite aux résultats de l'essai KEYNOTE 024 comparant la chimiothérapie associée au pembrolizumab *versus* une chimiothérapie seule. La combinaison chimiothérapie plus pembrolizumab a démontré un bénéfice net en termes de taux de réponse objectif (45 % contre 28 %), de survie sans progression (10.3 mois contre 6.0 mois) et de survie globale (HR 0,6, 95 % IC 0,41-0,89, P=0,005) (Reck et al. 2016). En l'absence d'information concernant le statut PDL-1, plusieurs options thérapeutiques sont proposées. En cas de charge mutationnelle élevée (> 10 mutations par méga-base), la combinaison nivolumab (anti PD1) plus ipilimumab (anti CTLA-4) a démontré, dans l'essai CHECKMATE 227, sa supériorité face à la chimiothérapie avec une survie sans progression supérieure (HR 0,58, 97,5% IC 0,41-0,81, P<0,001) (Boumber 2018). Concernant les autres possibilités thérapeutiques, pour les patients porteurs d'un adénocarcinome pulmonaire, la combinaison atezolizumab (anti PD-L1), bevacizumab (anti VEGFR) plus chimiothérapie a démontré, dans l'essai IMPOWER150, sa supériorité par rapport au protocole de chimiothérapie standard avec un bénéfice net de survie sans progression (8,3 contre 6,8 mois) et de survie globale (19,9 contre 14,9mois). Par ailleurs, pour les patients porteurs d'un adénocarcinome pulmonaire métastatique, l'essai de

phase 3 IMPOWER130 a démontré l'efficacité de la combinaison atezolizumab (anti PD-L1) plus nab-placitaxel, suivie d'une maintenance par atezolizumab plus pemetrexed, par rapport à la chimiothérapie standard, avec un gain de survie globale (18,6 contre 13,9 mois) et de survie sans progression (7.0 versus 5.5 mois).

IMPOWER130 est un essai de phase 3 ayant inclus des patients porteurs d'un adénocarcinome pulmonaire métastatique. Dans cet essai, les patients étaient randomisés soit pour recevoir 4 à 6 cycles d'atezolizumab plus du nab-placitaxel suivie d'une maintenance par atezolizumab plus pemetrexed, soit de la chimiothérapie standard ("IMpower132: Efficacy of Atezolizumab (Atezo) + Carboplatin (Carbo)/Cisplatin (Cis) + Pemetrexed (Pem) as 1L Treatment in Key Subgroups with Stage I... | OncologyPRO" n.d.). Cet essai a démontré un gain en termes de survie globale (18.6 contre 13.9 mois) et de survie sans progression PFS (7.0 versus 5.5 mois) dans le bras chimiothérapie plus immunothérapie établissant ainsi une nouvelle option thérapeutique pour ces patients.

Concernant les patients porteurs d'un carcinome épidermoïde pulmonaire, l'étude KEYNOTE-407 a évalué une stratégie thérapeutique reposant sur 4 cycles d'une combinaison carboplatine plus placitaxel ou nab-placitaxel en association avec le pembrolizumab versus chimiothérapie standard. Une maintenance par pembrolizumab ou placebo était également proposée. La combinaison chimiothérapie plus pembrolizumab a démontré une plus grande efficacité en termes de taux de réponse (58.4% contre 35.0%) et de survie globale (15,9 contre 11,3 mois) (Paz-Ares et al. 2018). Toutefois, en présence d'un oncogène driver, la place de l'immunothérapie reste à définir (Mhanna et al. 2019). Récemment, une étude multicentrique, rétrospective, menée sur 551 patients porteurs d'un CBNPC avec une altération moléculaire responsable d'une addiction oncogénique, a révélé une efficacité variable de l'immunothérapie selon le sous-groupe moléculaire. L'immunothérapie était associée à un taux de réponse de 26 % en présence d'une mutation de *KRAS* alors que ce taux était de 0 % en présence d'une altération *ALK* (Mazieres et al. 2019). Malgré le caractère rétrospectif de cette étude, l'immunothérapie est à ce jour considérée comme une option en deuxième ou troisième ligne chez les patients porteurs d'un CBNPC avec driver oncogénique.

1.2.2 Les CBNPC avec mutation *EGFR*

1.2.2.1 Découverte des mutations *EGFR*

Le récepteur *EGFR*, codé par le gène *EGFR*, est une glycoprotéine transmembranaire, constituée d'un domaine extracellulaire, composé notamment du domaine liaison au ligand (EGF), et d'une partie intracellulaire où se situe le domaine tyrosine kinase. *EGFR* appartient à une famille de quatre récepteurs tyrosine kinases apparentés (ERBB) et agit comme un médiateur clé dans les voies de signalisation cellulaire impliquant la prolifération cellulaire, l'apoptose, l'angiogenèse et l'invasion (Ayati et al. 2020).

Les premières mutations du gène *EGFR* dans les CBNPC ont été décrites en 2004 (Lynch et al. 2004). Ces mutations sont localisées dans le domaine kinase *EGFR* (codé par les exons 18 et 21). Les délétions dans l'exon 19 et la substitution L858R dans l'exon 21 représentent plus de 90 % de ces altérations. De manière plus rare, on retrouve des insertions dans l'exon 20 dans 5 % des cas et des mutations T790M (exon 20) et L861Q (exon 21) dans 2 % des cas (Ayati et al. 2020). Les mutations du domaine kinase *EGFR* sont responsables d'une addiction oncogénique rendant possible son inhibition par des thérapies ciblées.

En Occident, les mutations *EGFR* sont détectées chez environ 10 à 15 % des patients atteints de CBNPC. Ce taux de détection atteint 50 % chez les patients asiatiques porteurs d'un CBNPC (Shi et al. 2014). Elles sont retrouvées majoritairement chez des patients non-fumeurs, d'âge jeune et de sexe féminin. Le type histologique le plus fréquent est l'adénocarcinome (Tsao et al. 2006).

1.2.2.2 Place des inhibiteurs tyrosines kinase *EGFR* dans la prise en charge des CBNPC mutés *EGFR*

La prise en charge des CBNPC *EGFR* mutés a été révolutionnée par l'arrivée des ITK *EGFR*. Les ITK *EGFR* ont d'abord été évalués dans des populations non sélectionnées atteintes d'un CBNPC réfractaire à la chimiothérapie. Malgré des résultats peu spectaculaires, les ITK *EGFR* ont obtenu une autorisation de mise sur le marché (AMM) en deuxième et troisième lignes. L'identification des mutations *EGFR* a permis de mieux sélectionner les patients et, ainsi, de démontrer la supériorité des ITK *EGFR* par rapport à la chimiothérapie dans une population choisie.

Par la suite, les ITK EGFR ont rapidement obtenu une AMM en première ligne. La découverte des mutations de résistance conduisant au développement des ITK de deuxième et troisième générations, plus performants que leurs aînés, a amené à réfléchir sur la place de chaque inhibiteur dans la prise en charge des CBNPC EGFR mutés (Girard et al. 2020).

À ce jour cinq molécules sont disponibles dans le cadre du traitement des CBNPC EGFR mutés (**Figure 1**). Le géfitinib et l'erlotinib, sont des inhibiteurs spécifiques de l'EGFR, de première génération, qui se fixent de façon réversible au récepteur muté. Le géfitinib et l'erlotinib ont démontré leur supériorité par rapport à un doublet de chimiothérapie dans les études de phase III IPASS, OPTIMAL et EURTAC (Rosell *et al.* 2012 ; Mok *et al.* 2009 ; Zhou *et al.* 2011). Avec un gain en survie sans progression (9.7-13.1 contre 4.6-5.2 mois) et des taux de réponse d'environ 70 à 80 % dans le sous-groupe de patients mutés *EGFR*, le géfitinib et l'erlotinib disposent d'une AMM dans les CBNPC EGFR mutés en première ligne, respectivement obtenues en 2009 et 2012.

L'afatinib et le dacomitinib sont des ITK de deuxième génération qui se lient à EGFR de façon irréversible. L'afatinib a obtenu une AMM en 2014 suite aux résultats de l'essai LUX-Lung 3 l'ayant comparé à un doublet de chimiothérapie (Cisplatine-Pemetrexed). L'afatinib a démontré sa supériorité en matière de taux de réponse (56 % *versus* 23 %) et de PFS (13,6 mois *versus* 6,9 mois). Par la suite, dans l'étude LUX-Lung 7, l'afatinib a démontré son équivalence en première ligne par rapport au géfitinib en matière de survie globale (27,9 *versus* 24,5 mois) (Paz-Ares *et al.* 2017). Le dacomitinib a également prouvé son équivalence face au géfitinib en première ligne dans l'étude ARCHER (Wu *et al.* 2017). Le dacomitinib a obtenu une AMM dans les CBNPC EGFR mutés en première ligne en 2019.

L'osimertinib est un ITK EGFR de troisième génération développé afin de cibler la mutation de résistance EGFR-T790M. L'osimertinib était initialement recommandé en deuxième ligne et en cas de survenue d'une mutation EGFR-T790M (Soria *et al.* 2018 ; Mok *et al.* 2017). L'AMM a récemment changé suite à l'étude FLAURA qui, comparant l'osimertinib à des inhibiteurs de première génération en première ligne métastatique, a démontré un bénéfice net en termes de survie globale et sans récurrence en faveur de l'inhibiteur de troisième génération (18). Ce dernier a obtenu une AMM en première ligne thérapeutique. Par ailleurs, l'osimertinib devrait bénéficier prochainement d'une AMM en adjuvant chez des patients porteurs d'un CBNPC EGFR muté stade II et III réséqué, compte tenu des résultats de l'essai ADAURA révélant une réduction de 83 % du risque de récurrence à deux ans (Wu *et al.* 2020).

1.2.3 Les CBNPC avec réarrangement ALK

1.2.3.1 Découverte des réarrangements ALK et caractérisation clinique

Le gène *ALK* est situé sur le bras court du chromosome 2 (2p23), codant, pour la protéine ALK, un RTK transmembranaire appartenant à la superfamille des récepteurs de l'insuline (Soda *et al.* n. d.). La principale altération du gène *ALK* identifiée dans les cancers du poumon est le réarrangement. Ce dernier résulte de la translocation entre deux gènes conduisant à la formation d'une protéine chimérique anormalement activée. Dans les CBNPC, le réarrangement du gène *ALK* a été décrit pour la première fois en 2007 (Soda *et al.* n. d.). Il s'agissait du réarrangement *EML4/ALK* (*Echinoderm microtubule-associated protein like 4*) qui représente le variant le plus fréquent dans les CBNPC (90 % des altérations *ALK*) (Du *et al.* 2018). Le réarrangement *EML4/ALK* résulte d'une fusion entre la partie N-terminale du gène *EML4* qui code pour le domaine coiled coil et la région c-terminale du gène *ALK* codant pour le domaine tyrosine kinase. Il en résulte une protéine de fusion *EML4/ALK*, présentant une activation constitutive de l'activité kinase, indépendante de la fixation d'un ligand (Lantuejoul *et al.* 2012). La protéine de fusion *EML4-ALK* active plusieurs voies de signalisation intracellulaires telles que la voie des MAPK (*Mitogen activated protein kinase*) et PI3K-AKT/mTOR (*mammalian Target Of Rapamycin*) (Soda *et al.* n. d.). De nombreux autres gènes partenaires ont été identifiés, tels que les *KIF5* (*Kinesin-related protein 5*), *KLC1* (*Kinesin light chain 1*), *TGF* (*Transforming growth factor*), *PTPN3* (*Protein tyrosine phosphatase, non receptor type 3*), conduisant également à l'activation du domaine kinase de la protéine ALK (Du *et al.* 2018). Les réarrangements du gène *ALK* représentent 5 à 6 % des cas de CBNPC (CBNPC ALK+).

Concernant les caractéristiques cliniques, l'âge médian des patients atteints d'un CBNPC ALK+ est de 55 ans. Ils sont majoritairement non fumeurs. Le sexe ne semble pas influencer la survenue de cette altération (Kang *et al.* 2014).

Le diagnostic des réarrangements *ALK* repose sur différentes techniques telles que l'immunohistochimie, la RT-PCR (*Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction*) ou l'hybridation in situ par fluorescence (FISH) (Hofman 2017).

1.2.3.2 Place des inhibiteurs ALK dans le traitement des cancers bronchiques non à petites cellules métastatiques avec réarrangement ALK

Le traitement des CBNPC ALK+ repose principalement sur l'utilisation d'ITK ALK. L'émergence de mécanismes de résistance, majoritairement des mutations du domaine kinase ALK, est la principale cause d'échec thérapeutique. À ce jour, on compte plus d'une quinzaine de mutations de résistance du gène *ALK* identifiées dont les plus fréquentes sont les mutations ALK C1156Y, L1196M et G1202R. Le développement des inhibiteurs de nouvelle génération est, notamment, basé sur la capacité à surmonter ces mutations de résistance.

À ce jour, cinq ITK ALK disposent d'une AMM dans la prise en charge des CBNPC ALK+ (**Figure 1**) : le crizotinib, le céritinib, l'alectinib, le brigatinib et le lorlatinib.

Le crizotinib est un inhibiteur de type I, qui cible les protéines MET, ALK et ROS1 (Zou *et al.* 2007). Il est le premier inhibiteur à avoir obtenu une AMM en 2012 dans la prise en charge des CBNPC ALK+. L'approbation du crizotinib repose sur les résultats de l'étude de phase I PROFILE 1001. Contrairement au développement des ITK EGFR, le crizotinib a, d'emblée, été évalué chez des patients sélectionnés porteurs d'un CBNPC ALK+ prétraité par chimiothérapie. Les taux de réponse obtenus ont été de 60,8 % avec une médiane de survie sans progression de 9,7 mois (Camidge *et al.* 2012). Ces résultats ont été validés par l'étude de phase II PROFILE 1005 dans laquelle un taux de réponse de 59,8 % et une médiane de survie de 8,1 mois ont été obtenus (D.-W. Kim *et al.* 2012). Enfin, le crizotinib a montré sa supériorité par rapport à la chimiothérapie à base de sels de platine dans les études de phase III, PROFILE 1007 puis 1014, avec une survie sans progression (10,9 mois *versus* 7,0 mois, $p < 0,001$) et un taux de réponse (74 % *versus* 45 %) qui ont permis l'obtention de l'AMM en première ligne chez les patients naïfs de traitement (Tsang Shaw *et al.* 2016 ; Solomon *et al.* 2014). Toutefois, les limites du crizotinib ont rapidement émergé. En effet, il possède une diffusion cérébrale faible conduisant à une progression cérébrale fréquente. Par ailleurs, une exposition prolongée au crizotinib conduit à l'émergence de mutations kinase ALK dans environ 30 % des cas, ce qui entraîne une perte de son efficacité (Dagogo-Jack *et Shaw* 2016 ; Ng *et Camidge* 2016).

Le céritinib est un ITK de deuxième génération, ciblant les protéines ALK, IGF-1R (*Insulin growth factor receptor 1*), INSR (*Insulin receptor precursor*), STK22D (*Serine/threonine kinase 22D*) et FLT3 (*fms like tyrosine kinase 3*), développé afin de surmonter les résistances induites par le crizotinib telles que les mutations ALK L1196M, G1269A et I1171T (Fontana et al. 2015). Le céritinib dispose d'un AMM en première ligne dans la prise en charge des CBNPC ALK+. Il a été évalué en première ligne en comparaison avec la chimiothérapie dans le cadre de l'étude ASCEND-4. La médiane de survie sans progression était supérieure dans le bras traité par céritinib (16,6 *versus* 8,1 mois) avec un taux de réponse plus élevé (72,5 % *versus* 26,7 %) (Soria et al. 2017). La même année, le céritinib a été évalué chez des patients réfractaires au crizotinib. Le taux de réponse obtenu était de 56 % avec une survie sans progression supérieure en faveur du céritinib par rapport à la chimiothérapie (5,4 mois *versus* 1,6 mois, $p < 0,001$) (Tsang Shaw *et al.* 2017). Le céritinib a obtenu une AMM en première ligne en 2018. L'exposition prolongée au céritinib conduit à l'émergence de résistance dont, notamment, les secondes mutations ALK G1202R, V1180L et C1156Y (Gainor et al. 2016).

L'alectinib est un ITK ALK de deuxième génération ciblant le gène *ALK*. L'alectinib a été développé afin de surmonter les mutations de résistance ALK L1196M, C1156Y et F1174L (Okada et al. 2019). L'alectinib a été évalué chez les patients prétraités par crizotinib et naïfs de traitement dans le cadre de l'essai NP28763 avec un taux de réponse de 50 % et une médiane de survie sans progression de 8,9 mois. En 2017, l'alectinib a, dans un premier temps, obtenu l'AMM en deuxième ligne après échec du crizotinib dans les CBNPC ALK+ (Tsang Shaw *et al.* 2016). Par la suite, l'étude ALEX a comparé l'alectinib et le crizotinib en première ligne. L'alectinib a démontré sa supériorité face au crizotinib avec une médiane de survie sans progression de 25,7 mois *versus* 10,4 mois ($p < 0,001$) (Peters et al. 2017). Comparé au crizotinib, l'alectinib est caractérisé par un taux important de réponse intracrânienne (81 % *versus* 50%) et une durée médiane de réponse intracrânienne de 17,3 mois *versus* 5,5 mois. Les mécanismes de résistance émergents après exposition à l'alectinib sont les mutations ALK G1202R, L1196M et V1180L (Gainor et al. 2016).

Le brigatinib est un ITK de deuxième génération ciblant les protéines ALK, ROS1 et EGFR. Il a été développé afin de surmonter les mutations de résistance C1156Y, F1174L, L1196M et G1202R (Gainor et al. 2016). Le brigatinib a été évalué dans une étude de phase I/II chez des patients prétraités par ITK ALK et naïfs de traitement (Gettinger et al. 2016). Les taux

de réponse étaient de respectivement 72 % et 100 %. L'étude de phase II du brigatinib (ALTA) a examiné 2 dosages, 90 et 180 mg (D.-W. Kim et al. 2017). L'efficacité du brigatinib était dose-dépendante avec une médiane de survie sans progression de 12,9 mois pour le bras 180 mg et de 9,2 mois pour le bras 90 mg. Le brigatinib possède une AMM pour les CBNPC ALK+ prétraités par crizotinib. Une étude de phase III a comparé le brigatinib avec le crizotinib en première ligne chez des patients porteurs d'un CBNPC ALK+ (Camidge et al. 2018). Le taux de survie sans progression à 12 mois était de 67% dans le bras brigatinib contre 43% dans le bras crizotinib. Les principaux mécanismes de résistance émergeants sous brigatinib sont les mutations ALK E1210K et G1202R (Gainor et al. 2016).

Le lorlatinib est un ITK de troisième génération ciblant les protéines ALK et ROS1. Il a été développé afin de surmonter les mutations ALK G1202R, L1196M, G1269A, C1156Y, F1174L et S1206Y (Zou et al. 2015a). Le lorlatinib a présenté des signes d'activité intéressants chez des patients prétraités par un ou plusieurs ITK ALK avec des taux de réponse globale allant de 17 à 40 % selon l'ITK ALK reçu préalablement. (Felip Font et al. 2017). Plus récemment, une étude de phase III a comparé le lorlatinib avec le crizotinib en première ligne chez des patients porteurs d'un CBNPC ALK+. Le lorlatinib a démontré sa supériorité avec un taux de patients n'ayant pas récidivé à 1 an de 78 % *versus* 39 % dans le groupe crizotinib (Alice T. Shaw et al. 2020).

1.2.4 Les autres altérations moléculaires dans les CBNPC

Outre les mutations *EGFR* et les réarrangements *ALK*, il existe d'autres altérations pour lesquelles des thérapies ciblées ont été évaluées dont les fusions des gènes *ROS1*, *NTRK* et *RET* (*Rearranged during transfection*) ainsi que les mutations des gènes *BRAF*, *KRAS* (*KRASG12C*), *HER2* et *MET* (*METex14*) (qui feront l'objet d'une partie spécifique du chapitre 4 « Les altérations de MET dans le cancer ») (**Figure 1**).

La protéine ROS1 est un RTK appartenant à la superfamille des récepteurs à insuline à l'instar du récepteur ALK. Les fusions du gène *ROS1* constituent environ 1 à 2 % des CBNPC (Davies et Doebele 2013 ; Zhu *et al.* 2015). Il existe plus de 26 gènes identifiés comme partenaires de fusion de *ROS1*, dont les plus fréquents sont *CD74*, *SLC34A2* et *SDC4* (Ou et

Nagasaka 2020). Les fusions de *ROS1* sont plus fréquemment observables chez les femmes jeunes, peu ou non fumeuses et d'origine asiatique (Zhu *et al.* 2015). Plusieurs études ont été menées avec des ITK préalablement évalués dans les CBNPC ALK+ tels que le crizotinib, le céritinib et le lorlatinib avec des taux de réponse aux alentours de 60 % (Tsang Shaw *et al.* 2019 ; Cho *et al.* 2017 ; Tsang Shaw *et al.* 2017). Les résultats les plus prometteurs ont été obtenus dans les essais de phase II STARTRK-2 et TRIDENT-1 ayant étudié respectivement l'entrectinib et le reprotectinib, des inhibiteurs ALK/ROS1/TRK avec des taux de réponse aux alentours de 80 % (Drilon, Siena *et al.* 2017 ; Cho *et al.* 2019).

Les fusions du gène *NTRK* représentent moins de 1 % des CBNPC (Cocco, Scaltriti et Drilon 2018). Néanmoins, elles ont été décrites dans de nombreux cancers tels que les cancers ORL, les sarcomes, les cancers thyroïdiens. À ce jour, deux ITK ont été évalués dans la prise en charge des CBNPC avec fusion du *NTRK* : l'entrectinib et le larotrectinib. Le larotrectinib a, notamment, été examiné dans une étude de phase Ⅱ ayant inclus 55 patients dont quatre porteurs d'un CBNPC avec fusion du *NTRK* avec un taux de réponse de 75 % (Drilon *et al.* 2018).

Les fusions du gène *RET* concernant 1 à 2 % des patients porteurs d'un CBNPC. Elles touchent principalement les patients jeunes et non fumeurs. Les essais évaluant des inhibiteurs de *RET* multikinases (cabozantinib, lenvatinib et sorafenib) ont présenté des résultats décevants avec des taux de réponse évalués entre 0 et 28 % (Drilon *et al.* 2016 ; Horiike *et al.* 2016 ; Hida *et al.* 2019). Toutefois, récemment, deux inhibiteurs spécifiques du *RET*, le selpercatinib et le pralsetinib, évalués dans des essais de phase I/II, ont révélé des taux de réponse de respectivement 68 et 56 % (Solomon *et al.* 2020 ; Gainor *et al.* 2019 ; Drilon *et al.* 2020).

Les protéines RAS, sont de petites GTPase de 21 kDa (comportant quatre isoformes *HRAS*, *NRAS*, *KRAS4A* et *KRAS4B*) codées par trois gènes distincts *KRAS* (Kirsten RAS chromosome 12p12.1), *HRAS* (Harvey RAS, chromosome 11p15.5) et *NRAS* (Neuroblastoma RAS, chromosome 1p13.2). Les altérations du gène *KRAS* sont retrouvées dans approximativement 20 à 25% des CBNPC en Occident et dans 10 à 15% des cas en Asie. Il s'agit de l'altération moléculaire potentiellement actionnable la plus fréquente des CBNPC. Les mutations *KRAS* affectent principalement les codons 12 et 13 situés dans l'exon 2 au niveau

du site de liaison au GTP (Pylayeva-Gupta, Grabocka, and Bar-Sagi 2011). Parmi les CBNPC KRAS mutés, le variant le plus fréquemment identifié est KRAS-G12C dans environ 39-40% (13 % des CBNPC totaux), suivie de KRAS-G12V dans 18-21% et KRAS-G12D dans 17-18% (Hong et al. 2020). Les mutations KRAS ont longtemps été considérées comme non-actionnables compte tenu de la très haute affinité des protéines RAS pour le GTP et de l'abondance de ce dernier dans le cytoplasme (P. Liu, Wang, and Li 2019). L'arrivée du sotorasib (AMG-510), pourrait modifier la prise en charge des patients porteurs d'un CBNPC KRAS-G12C. En effet, cet inhibiteur, développé pour former une liaison covalente irréversible avec le résidu de cystéine de la forme mutée de KRAS, est un inhibiteur spécifique de la mutation KRASG12C qui a montré, dans un essai de phase I, un taux de réponse de 32,2 % et un contrôle de la maladie de 88,1 % (Hong et al. 2020)(P. Liu, Wang, and Li 2019).

Les mutations du gène *BRAF* représentent 2 % des CBNPC (Planchard *et al.* 2017). Il s'agit essentiellement de la mutation BRAF V600E localisée dans l'exon 15 du gène BRAF (codant pour le domaine kinase). À l'instar de ce qui est proposé dans la prise en charge des mélanomes BRAF V600E-mutés, la combinaison du dabrafenib, un inhibiteur de RAF, et du tramétinib, un inhibiteur de MEK (*Mitogen-activated extracellular signal-regulated protein kinase*), a été évaluée chez 85 patients porteurs d'un CBNPC BRAF V600E avec un taux de réponse de 64 % (Planchard *et al.* 2017).

Les altérations du gène *HER2* sont fréquentes dans les CBNPC avec des amplifications et des mutations (majoritairement de l'exon 20) retrouvées dans respectivement 4 % et 1 % des cas. Bien que de nombreuses molécules aient été développées afin de cibler la protéine HER2, elles n'ont pas prouvé d'efficacité dans les CBNPC avec une altération de *HER2*. La sélection des patients inclus peut expliquer cela. En effet, dans de nombreuses études, la présence d'une surexpression de la protéine HER2 (identifiée dans 30 % des CBNPC) en l'absence d'anomalie du gène était autorisée. Néanmoins, quatre essais ont spécifiquement sélectionné des patients porteurs d'altérations du gène *HER2*, et malheureusement là encore, les résultats étaient décevants. Ainsi, le dacomitinib a obtenu des taux de réponse de 12 % pour les patients porteurs d'un CBNPC *HER2* muté et de 0 % pour les patients porteurs d'un CBNPC *HER2* amplifié (Kris et al. 2015). L'afatinib quant à lui a obtenu, dans l'étude NICHE de phase II, un taux de réponse de 7 %.

Néanmoins, les résultats concernant les anticorps conjugués ciblant HER2 sont prometteurs. Le TDM-1, un anticorps couplant un anti HER2 (le trastuzumab) et un inhibiteur des microtubules (l'emtansine) a été évalué chez 18 patients porteurs d'un CBNPC avec mutation *HER2*. Le TDM-1 a permis d'obtenir un taux de réponse de 44 % avec une survie sans progression de cinq mois (Li *et al.* 2018). Récemment, dans l'essai de phase II Destiny Lung 01, le T-DXd, un anticorps conjugué couplant le trastuzumab avec un inhibiteur de la topoisomérase I (deruxtecan), a permis d'obtenir un taux de réponse de 61,9 %. Une autorisation temporaire d'utilisation est actuellement octroyée pour le T-DXd dans la prise en charge des CBNPC HER2-mutés (exon 20) (Smit *et al.* 2020).

2 Structure et rôle physiologique du récepteur MET et de son ligand l'HGF

2.1 Découverte et structure du récepteur MET

Le récepteur MET (appelé également HGFR) est un RTK qui a été pour la première fois décrit dans une lignée cellulaire humaine d'ostéosarcome (HOS) exposée à un carcinogène, le n-METHyl-n'-nitro-n-nitrosoguanidine (MNNG), auquel il doit sa dénomination (Cooper et al. 1984). L'étude des altérations causées par le carcinogène sur la lignée HOS a permis de mettre en évidence une translocation entre une partie du gène *TPR* (*translocated promoter region*) situé sur le chromosome 1 et le gène *MET* situé sur le chromosome 7. La protéine de fusion TPR-MET générée comporte le domaine d'oligomérisation de la nucléoporine principale du complexe de pore nucléaire TPR couplé au domaine kinase de MET. La partie intracellulaire de la protéine MET, bien que tronquée de son domaine extracellulaire, conserve son ancrage à la membrane *via* le domaine TPR qui provoque la dimérisation et l'activation constitutive du récepteur en l'absence de ligand responsable du caractère oncogénique (Park *et al.* 1987 ; Giordano *et al.* 1989 ; Rodrigues et Park 1993).

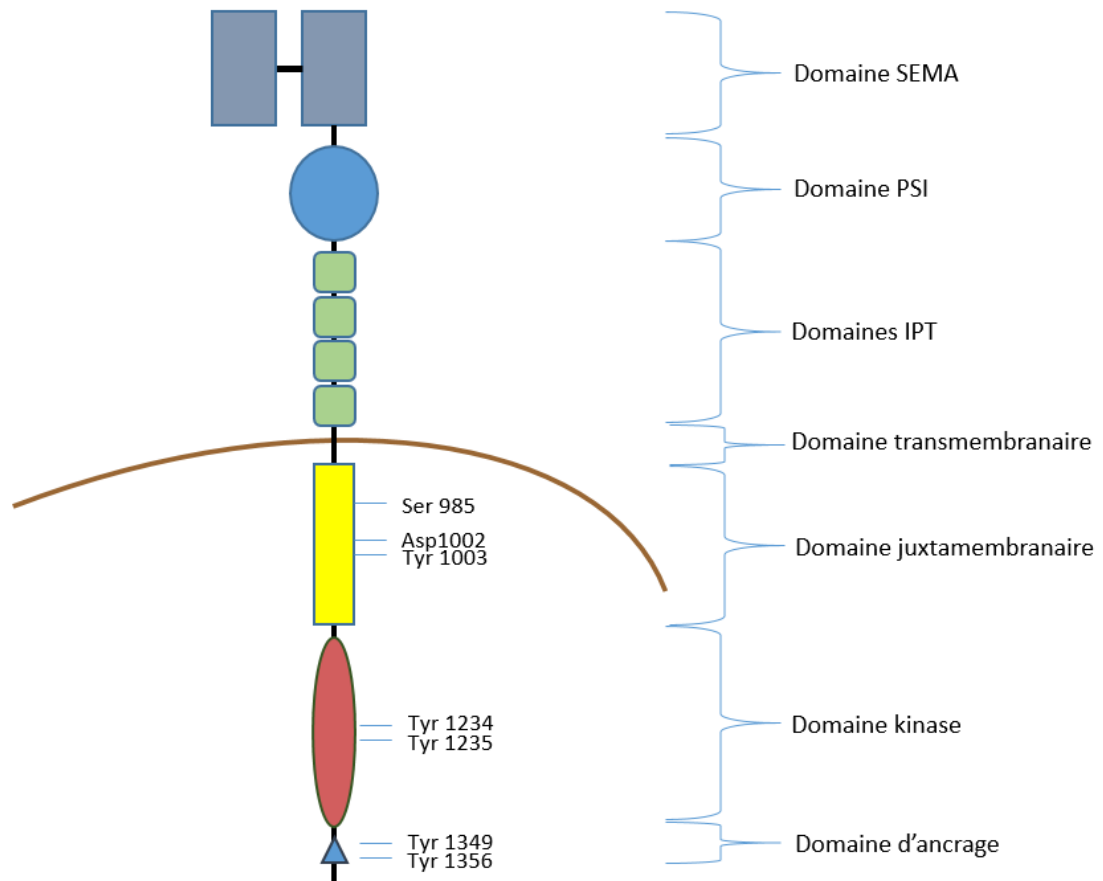
Le gène *MET* comprend 21 exons et 20 introns pour une longueur totale de 126 kb. Localisé sur le bras long du chromosome 7 q21-q31, le gène *MET* est transcrit sous forme de différents ARN (acide ribonucléique) messagers dont la forme majoritaire est de 8 kb (Lin *et al.* 1998 ; Duh *et al.* 1997). La traduction de l'ARN messager majoritaire mène à la synthèse d'une protéine immature de 170 kDa. Cette forme immature subira différentes modifications post-traductionnelles incluant la N-glycosylation du domaine extracellulaire (Giordano et al. 1989) et un clivage protéolytique par la furine entre la lysine 307 et l'arginine 308 menant à la formation de deux sous-unités, α (chaîne extracellulaire de 50 kDa) et β (chaîne extracellulaire, transmembranaire et intracellulaire de 145 kDa) (Komada et al. 1993). Les chaînes α et β sont reliées par un pont disulfure conduisant à l'établissement d'une protéine fonctionnelle de 190 kDa appelée p190MET (Tempest, Stratton et Cooper 1988). Il existe

également un isoforme minoritaire de MET appelé p170MET, issu d'un épissage alternatif de l'ARN messager 8 Kb, non dimérisé, incomplètement glycosylé et constitué de 18 acides aminés supplémentaires dans le domaine extracellulaire (Rubin, Bottaro, and Aaronson 1993).

Sur le plan structurel, le récepteur MET se compose de dix domaines :

- la partie extracellulaire comporte six domaines :
 - un domaine SEMA, nommé ainsi car présentant une homologie avec les domaines des sémaphorines, jouant un rôle dans la fixation du ligand (Ma, Maulik, et al. 2003),
 - un domaine riche en cystéines appelé PSI (*Plexin Semaphorin Integrin*) de par son homologie avec les domaines des plexines dont la fonction est d'orienter le fragment extracellulaire de MET afin qu'il lie correctement son ligand (Kozlov et al. 2004),
 - quatre domaines homologues aux immunoglobulines IPT (*Immunoglobulin-like region in Plexin and Transcription factors*) (Ma, Maulik, et al. 2003) **(Figure 2)** ;
- le domaine transmembranaire également appelé hélice transmembranaire relie les parties extracellulaire et intracellulaire ;
- la partie intracellulaire comprend :
 - un domaine juxtamembranaire, adjacent à la partie membranaire, qui comporte trois sites essentiels à la régulation du récepteur : la sérine 985, l'acide aspartique 1002 la tyrosine 1003 (Peschard et al. 2004),
 - un domaine kinase, qui est responsable de l'activité de la protéine via la phosphorylation des sites tyrosine 1234 et 1235 (Asses et al. 2009),
 - un domaine C-Terminal, qui présente les site d'ancrages aux protéines de signalisation d'aval grâce à la phosphorylation des sites tyrosine 1349 et 1356 (Ma, Maulik, et al. 2003).

Figure 2 : Représentation schématique de la structure du récepteur MET et des principaux domaines de régulation et d'activation



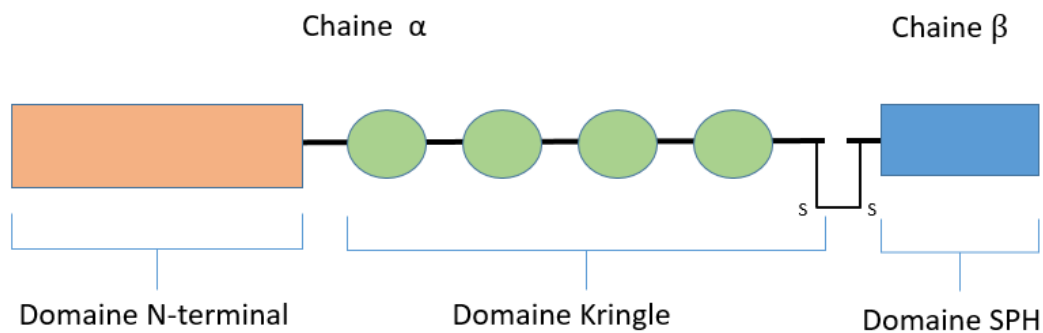
2.2 Structure et synthèse de l'HGF

Le facteur de croissance hépatocytaire ou *Scatter factor* (HGF/SF) est le ligand à haute affinité du récepteur MET. Sa découverte a été réalisée dans les années 1980 par deux équipes indépendantes, ce qui explique cette double dénomination. L'HGF/SF a ainsi été identifié comme facteur de croissance des hépatocytes, mais également comme facteur favorisant la migration et la dispersion des cellules épithéliales (Nakamura, Nawa et Ichihara 1984 ; Stoker *et al.* 1987).

La similitude entre l'HGF et le SF, ainsi que le lien étroit avec le récepteur MET, ont été établis par diverses équipes quelques années plus tard. En 1990, Weider et ses collaborateurs ont, dans un premier temps, purifié les deux molécules (le SF issu de fibroblastes et l'HGF humain issu du placenta) révélant une similarité structurelle (Weidner et al. 1990). En 1991, l'équipe de Naldini a mis en évidence l'augmentation de l'activité kinase de MET après exposition à l'HGF de la lignée d'adénocarcinome gastrique portant une amplification du gène *MET* (GTL16) confirmant ainsi le lien étroit entre l'HGF et MET (Naldini, Weidner, Vigna, Gaudino, Bardelli, Ponzetto *et al.* 1991). La même année, ces auteurs, comparant les réponses biologiques de l'HGF et du SF, ont mis en évidence des réponses similaires de croissance cellulaire, de mobilité et d'invasion. L'interaction du récepteur MET avec l'HGF a également été confirmée par des expériences d'immunoprécipitation (Naldini, Weidner, Vigna, Gaudino, Bardelli, Ponzetto *et al.* 1991).

Le gène *HGF* se compose de 18 exons et de 17 introns et se situe sur le chromosome 7 en position 7q21 (Fukuyama et al. 1991). Synthétisé en une protéine immature (pro HGF), l'HGF est convertie par clivage protéolytique en une glycoprotéine hétérodimérique active de 90 kDa, composée d'une chaîne α et d'une chaîne β reliées par un pont disulfure (Naldini et al. 1992). Diverses protéines permettant la réalisation de ces clivages, telles que l'antithrombine, l'hepsine ou la kallikréine, ont été identifiées (Kirchhofer *et al.* 2005 ; Mukai *et al.* 2008 ; Chen *et al.* 2013). Sur le plan structurel, la chaîne α se compose d'un site de liaison à l'héparine situé sur le domaine N-terminal suivi de quatre domaines kringle (boucles reliées par trois liaisons disulfures intrachaines). La sous-unité β se compose d'un domaine présentant une homologie aux sérines protéases (SPH) mais dénué d'activité catalytique (Stamos et al. 2004) (**Figure 3**).

Figure 3 : Représentation schématique de la structure de l'HGF



2.3 Rôle physiologique du récepteur MET

De nombreuses fonctions physiologiques de MET ont été identifiées. Au cours de l'embryogénèse, l'expression de MET et de l'HGF fluctue au cours des étapes du développement. Durant la seconde phase du développement embryonnaire, au cours du processus de gastrulation, l'expression de MET et de son ligand est concomitante dans le mésoderme (feuillet cellulaire intermédiaire de l'embryon) et l'ectoderme (feuillet externe de l'embryon) témoignant d'un mode d'activation autocrine (Andermarcher, Surani et Gherardi 1996). Pendant l'organogénèse, l'expression de MET et de l'HGF est séparée. MET est exprimé dans les cellules épithéliales de nombreux organes (cœur, reins et poumons) tandis que l'HGF est principalement exprimé par le tissu mésenchymateux témoignant d'un mode d'activation paracrine.

De manière similaire, dans le modèle murin, l'inactivation des gènes *MET* et *HGF* mène à un trouble du développement placentaire conduisant au décès *in utero* précoce (Schmidt *et al.* 1995). Des troubles du développement au niveau du foie et des muscles ont également été observés en raison d'une perturbation dans la migration des myoblastes (Schmidt *et al.* 1995). La mise en place d'un système d'extinction conditionnelle de *MET* via un système CRE/LOX a permis la mise en évidence du rôle de MET dans la formation alvéolaire pulmonaire, des reins et des muscles (Prunotto *et al.* 2004 ; Ishibe *et al.* 2009 ; Calvi *et al.* 2013).

Chez l'adulte, l'expression de MET est retrouvée dans les cellules épithéliales, nerveuses, endothéliales et hématopoïétiques (Prat *et al.* 1991 ; Bussolino *et al.* 1992 ; Nishino *et al.* 1995), tandis que l'HGF est quasi exclusivement exprimé par les cellules du mésenchyme (Stoker *et al.* 1987).

La voie MET/HGF est impliquée dans la réparation, la régénération et l'homéostasie tissulaire. Ainsi, une augmentation de la quantité d'expression plasmatique de l'HGF a été décrite en cas de lésion tissulaire au niveau cutané, ainsi qu'au niveau du parenchyme hépatique, pulmonaire et rénal (Hamanoue *et al.* 1992 ; Igawa *et al.* 1993). Ces travaux ont été complétés par des expériences d'extinction conditionnelle montrant le rôle de MET dans la cicatrisation cutanée et dans la fibrose hépatique et rénale (Marquardt *et al.* 2012).

L'activation de la voie MET/HGF a également un rôle protecteur au niveau hépatique. Kosai et ses collaborateurs ont étudié l'impact de l'HGF dans la prévention de l'hépatite. Les auteurs ont ainsi démontré que l'injection intrapéritonéale d'HGF, préalablement à l'injection d'anticorps anti-FAS (*Fibroblast associated*), permettait de prévenir de manière drastique la survenue de l'hépatite fulminante (Kosai *et al.* 1998).

3 Activation, voies de signalisation et régulation du récepteur MET

3.1 Activation du récepteur MET

À l'instar de nombreux récepteurs à activité tyrosine kinase, la fixation de l'HGF sur MET entraîne la dimérisation et la stabilisation de ce dernier, ce qui conduit à une autophosphorylation sur les résidus des tyrosines Y1234 et Y1235 situés dans le domaine kinase du récepteur (Longati *et al.* 1994 ; Naldini, Weidner, Vigna, Gaudino, Bardelli, Ponzetto Narsimhan *et al.* 1991). La phosphorylation des résidus des Y1234 et Y1235 entraîne une modification conformationnelle de MET conduisant à la phosphorylation du résidu tyrosine 1003, situé dans le domaine de régulation juxtamembranaire, et des tyrosines Y1349 et Y1356, situées dans le domaine d'ancrage. Ces deux derniers résidus constituent, une fois phosphorylés, un site d'ancrage multisubstrats impliqué dans la transduction du signal au récepteur MET (Ponzetto *et al.* 1994).

Une fois activé, MET recrute des protéines d'aval directement ou indirectement *via* l'interaction avec des protéines adaptatrices. Les principales protéines adaptatrices de MET sont les GRB2 (*factor receptor bound protein 2*), SRC (*Sarcome proto-oncogene*), SHC (*sarcoma homology-2-containing*), GAB 1 (*GRB2-associated binding protein*) et CRK (*CT regulator kinase*) (Ponzetto *et al.* 1994 ; Pelicci *et al.* 1995 ; Garcia-Guzman *et al.* 1999).

MET exerce de nombreuses fonctions cellulaires à travers l'activation de maintes voies de signalisations.

3.2 Voies de signalisation du récepteur MET

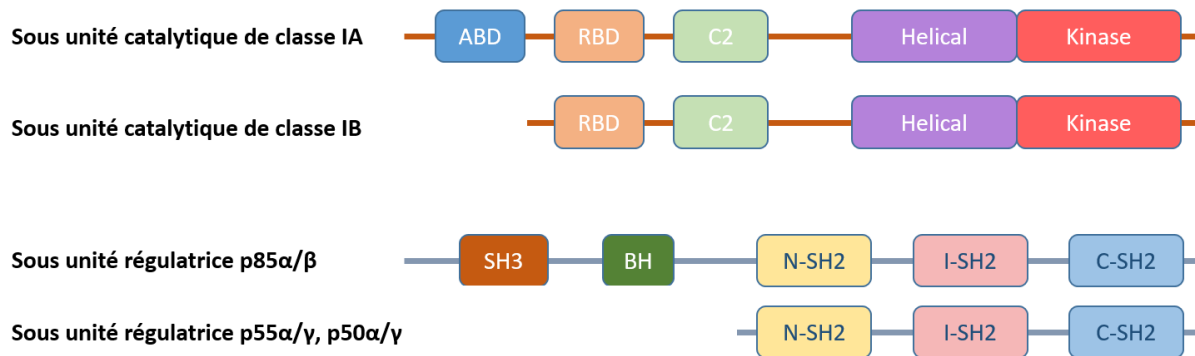
3.2.1 La voie MET-PI3K

3.2.1.1 Les PI3K kinases de classe I

Les PI3K kinases sont une famille d'enzymes réparties en trois classes (I, II, III) dont la classe I est la seule capable de catalyser le phosphatidylinositol (4,5)-biphosphate en phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphate. Les PI3K de classe I sont sous-divisées en deux classes IA et IB. Celles de classe IA sont activées par les récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK) tandis que celles de classe IB sont activées par des récepteurs couplés aux protéines (Goncalves, Hopkins et Cantley 2018). Les PI3K de classe I sont des hétérodimères composées d'une des quatre sous-unités catalytiques (p110 α , β , δ ou γ) codées par les gènes PIK3CA, PIK3CB, PIK3CG et d'une sous-unité régulatrice (p85 α et ses isoformes p55 α et p50 α , p85 β , p55 γ) codées par les gènes PIK3R1, PIK3R2, PIK3R3, PIK3R5 et PIK3R6. (Engelman, Luo et Cantley 2006 ; Jean et Kiger 2014 ; Goncalves, Hopkins et Cantley 2018). Les sous unités catalytiques se composent de 5 domaines (ABD [*adaptor-binding domain*], RBD [RAS binding domain], C2, Hélice, Kinase) excepté la sous unité p110 γ qui n'en possède que 4. Le domaine ABD, situé en position N terminal, est impliqué dans l'interaction avec la sous unité régulatrice (Fruman et al. 2017). Le domaine RBD, situé en position N terminale, permet l'interaction avec la protéine effectrice RAS. Le domaine C2 permettant la fixation à la membrane et impliqué dans la régulation de la kinase. Le domaine hélice participe à la régulation négative de l'enzyme enfin le domaine catalytique kinase permet la phosphorylation du substrat **(Figure 4)**.

Les sous-unités p110 α , β , δ interagissent spécifiquement avec les sous-unités régulatrices (p85 α , p55 α , p50 α , p85 β , p55 γ). Les sous-unités régulatrices se composent de domaines SH2 (N-SH2, C-SH2) entourant un domaine inter-SH2 interagissant avec le domaine ABD de la sous-unité catalytique **(Figure 4)**. D'autres interactions participent à la diminution de l'activité basale de la sous-unité catalytique à travers une interaction entre les domaines C2, hélice et kinase et le domaine N-SH2. Les sous-unités catalytiques (p110 α , β) sont ubiquitairement exprimées tandis que les sous-unités p110 δ ou γ sont majoritairement présentes dans les cellules immunitaires.

Figure 4: Représentation schématique des PI3K de classe I



3.2.1.2 Activation et régulation de la voie de signalisation PI3K

De multiples RTK tels que EGFR, PDGFR (*Platelet-derived growth factor receptors*), IR (*Insulin receptor*), GPCR (*G protein-coupled receptors*) ou kinases cytoplasmiques tels que ABL, SRC, JAK (Janus Kinase) et ZAP70 (*Zeta-chain-associated protein of 70 kDa*) sont capables de recruter le complexe p110 α / p85 α . Il existe trois voies d'activation du complexe p110 α / p85 α par les RTK. Toutes ces voies sont dépendantes de l'activation du RTK *via* un ligand. La première voie, directe, consiste au recrutement du complexe p110 α / p85 α *via* l'interaction entre un motif phospho-YXXM (X désignant un acide aminé) du RTK et le domaine N-SH2 de la sous-unité régulatrice p85 α (Mellor *et al.* 2012 ; Castellano et Downward 2011). La deuxième voie indirecte, consiste en l'interaction entre la p85 α et des protéines adaptatrices telles que les GRB2 se liant préférentiellement sur un motif YXN du RTK. Une fois recruté, GRB2 se liera à la protéine d'échafaudage GAB qui, à son tour, sera capable de se lier à la sous-unité p85 α . La troisième voie consiste en l'activation de PI3K *via* la protéine RAS. Elle s'effectue également par l'intermédiaire de GRB2 qui, une fois recrutée, est capable de se lier à la protéine SOS qui, à son tour, active RAS. Cette troisième voie interagira directement avec la sous-unité catalytique p110 α (**Figure 5**).

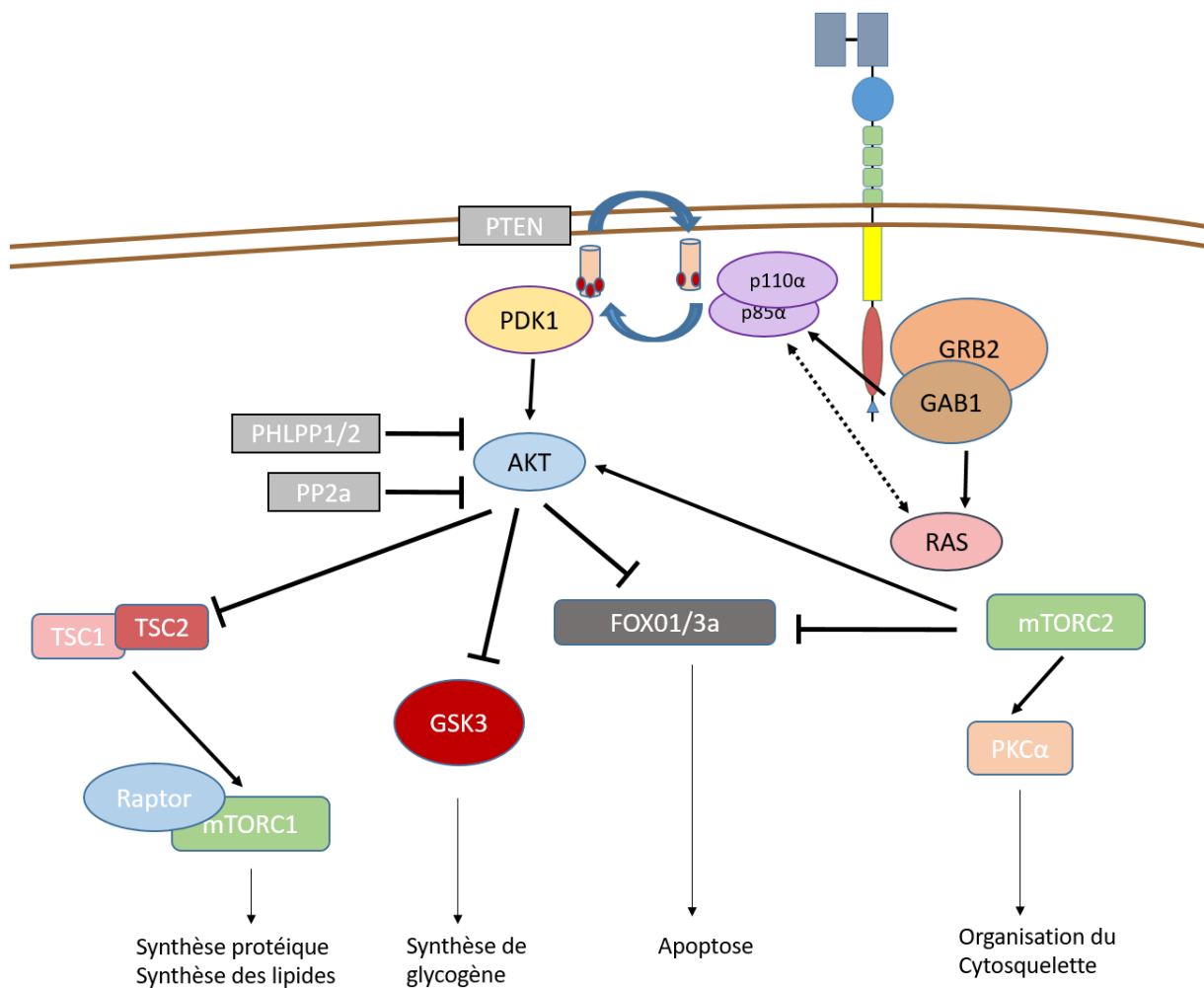
Cette interaction conduira au recrutement à la membrane du complexe p110 α / p85 α ainsi qu'à la levée de la répression de la sous-unité p110 α afin de permettre la phosphorylation du PIP2 (*Phosphatidyl Inositol (4, 5) biPhosphate*) en PIP3 (*Phosphatidyl Inositol (4, 5)*

triPhosphate) (Miled et al. 2007). Une fois formé, le PIP3 sera capable de recruter une variété d'effecteurs à la membrane plasmique à travers une interaction entre les domaines SH2 et les domaines PH (*Pleckstrin Homology domain*) de nombreuses tyrosines kinases telles que BTK (*tyrosine kinase de Bruton*), TEC ou AKT (*AKT8 virus oncogene cellular homolog*).

AKT appartient à la famille de serine/threonine kinases AGC (*cAMP-dependent, cGMP-dependent and protein kinase C*). AKT est composé de trois isoformes (AKT1, AKT2 et AKT3). Préalablement connu sous le nom de PKB, AKT joue un rôle majeur dans de nombreuses fonctions cellulaires tels que la progression du cycle cellulaire, la régulation du métabolisme, la stabilité du génome, la néo angiogénèse, la transcription et la synthèse protéique. (Bos, Rehmann, and Wittinghofer 2007). La liaison AKT sur le PIP3 permettra l'interaction avec d'autres protéines kinases telles que les PDK1 et mTORC2 phosphorylant AKT, respectivement sur la tyrosine 308 et la sérine 473 conduisant à son activation. Une fois activé, AKT contrôle de multiples voies de signalisation impliquées dans la survie cellulaire (FOXO), dans la croissance cellulaire (mTORC1, TSC2), dans l'absorption de glucose et la synthèse de glycogène (GSK3). Outre AKT, d'autres substrats de PIP3 ont été identifiés tels que les protéines RHO et RAC impliquées dans le remodelage du cytosquelette.

La régulation de la voie PI3K est essentiellement assurée par des phosphatases dont PTEN est la plus étudiée. Découverte en 1997 (Li *et al.* 1997), la protéine PTEN (codée par le gène *PTEN* sur le chromosome 10) est une phosphatase dont la fonction principale est de déphosphoryler le PIP3 en PIP2, ce qui en fait la principale protéine de régulation de la voie de signalisation PI3K-AKT (Song, Salmena et Pandolfi 2012). De par son activité régulatrice, *PTEN* est défini comme un gène suppresseur de tumeur (Li et Sun 1997). La protéine PTEN est retrouvée à la fois dans le cytoplasme et dans le noyau où elle exerce des fonctions distinctes (Bononi et Pinton 2015).

Figure 5 : Représentation schématique de la voie de signalisation PI3K



3.2.1.3 Description de la voie MET- PI3K

MET peut directement interagir avec les PI3K kinases de classe I *via* les domaines SH2 présents au niveau de la sous-unité régulatrice p85 (Ponzetto *et al.* 1993) . Des expériences de co-immunoprécipitations *in vitro* ont montré que PI3K de classe I immunoprécipite avec la forme phosphorylée de MET et peut se fixer sur diverses tyrosines : Y1307, Y1313, Y1349 et Y1356 (Graziani, Andrea, Danjela Gramaglia 1991).

Une voie d'interaction indirecte a également été identifiée par l'intermédiaire de différentes protéines partenaires telles que la GAB1 interagissant également avec la sous-unité régulatrice p85, la FAK (*Focal adhesion kinase*) et RAS (*Rat sarcoma*) (Liu *et al.* 2009 ; Ishibe *et*

al. 2004a ; Rodriguez-Viciana *et al.* 1994). À travers l'activation de la voie PI3K, MET participe à de nombreuses fonctions cellulaires. La voie MET-PI3K-AKT est, notamment, impliquée dans la survie cellulaire *via* l'interaction avec des partenaires pro- et anti-apoptotiques tels que MDM2 (*Murine Double Minute 2*), BAD (*Beclin Bcl-2 antagonist of cell death*), FLIP (*FLICE-like inhibitory protein*) et GSK3 β (*Glycogen synthase kinase 3 beta*) (Moumen *et al.* 2007 ; Liu 1999 ; Fan *et al.* 2001). La voie MET-PI3K est également impliquée dans la migration et l'invasion cellulaires *via* l'interaction avec les protéines RAC1 (*RAs-related C3 botulinum toxin substrate 1*) et FAK (Ishibe *et al.* 2004b) et la morphogénèse tissulaire (Niemann *et al.* 1998).

3.2.2 La voie MET-MAPKinase

L'activation de la voie MAPKinase s'effectue principalement par le recrutement de la protéine GRB2 menant au recrutement de la protéine SOS (*Son of sevenless*) puis à l'activation de la protéine membranaire RAS (**Figure 6**) (Graziani *et al.* 1993 ; Fixman *et al.* 1996). Une fois recrutée, la protéine RAS conduit ainsi au recrutement successif de RAF (*Rapidly accelerated fibrosarcoma*), MEK1/2 et ERK1/2 (*Extracellular signal-regulated kinases*), ce qui permet l'activation de facteurs de transcription appartenant à la famille ETS tels que ETS1 (*Avian erythroblastosis virus E26 homolog-1*) et PEA3 (*Polyoma enhancer activator 3*) (Paumelle *et al.* 2002 ; Kherrouche *et al.* 2015). Une autre voie d'activation s'effectue par l'interaction entre MET et le complexe GAB1 et SHP2 (Maroun, Naujokas et Park 2003). À travers l'activation de la voie MAPKinase, MET participe essentiellement à la prolifération cellulaire, la dispersion et la morphogénèse, la migration et l'invasion (Tulasne *et al.* 2002 ; Kherrouche *et al.* 2015).

3.2.3 La voie MET-STAT3

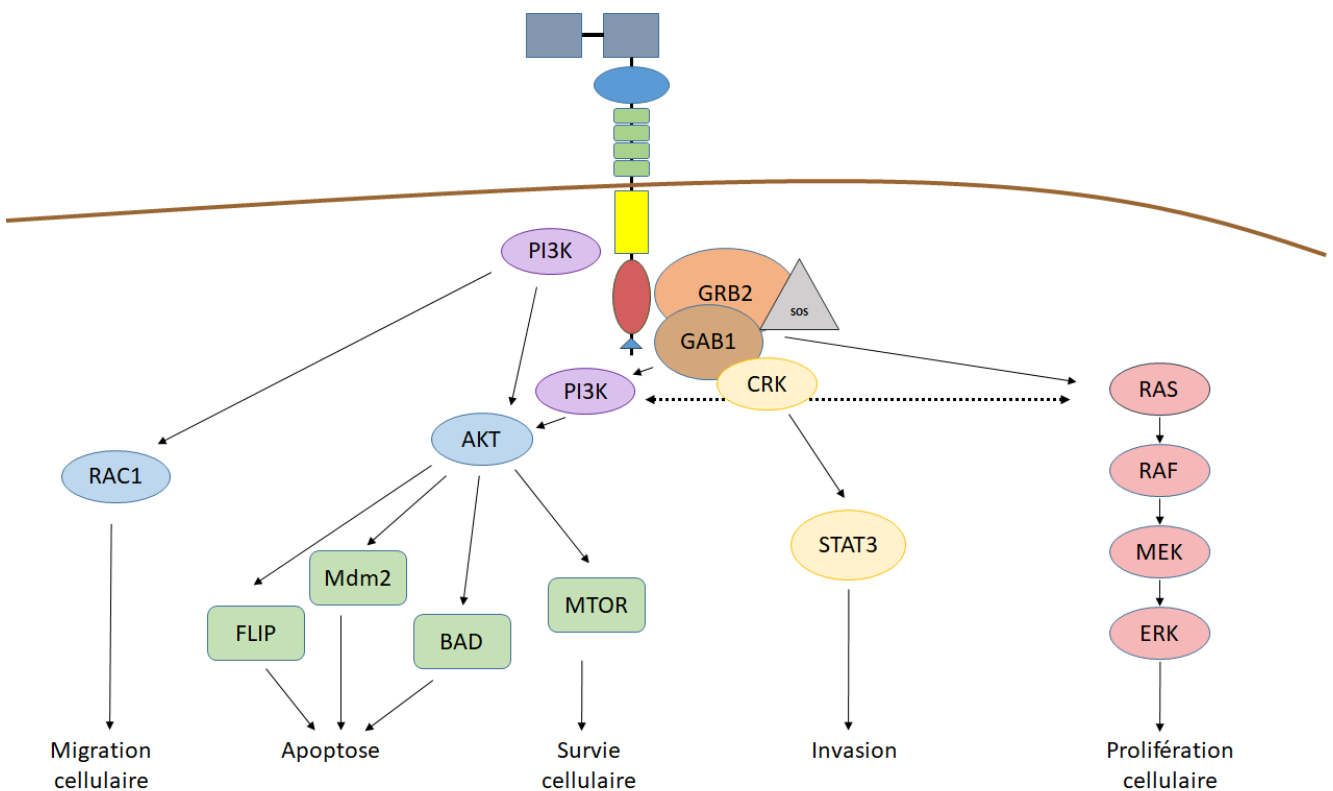
STAT3 (*Signal Transducer and Activator of Transcription 3*) est un facteur de transcription qui induit l'expression d'une variété de gènes impliqués, notamment, dans le phénomène d'inflammation. L'interaction avec MET s'effectue à travers le domaine SH2 de STAT3 (Boccaccio *et al.* 1998) (**Figure 6**). La phosphorylation de STAT3 sur la tyrosine Y705 conduit à son homodimérisation et sa translocation vers le noyau (Boccaccio *et al.* 1998). De manière intéressante, il a été observé que l'endocytose de MET est requise pour maintenir l'activation

de STAT3 après stimulation par l'HGF (Kermorgant et Parker 2008). La voie MET-STAT3 est impliquée dans l'invasion et la croissance sans ancrage (Zhang *et al.* 2002 ; Cramer *et al.* 2005).

3.2.4 La voie MET-CRK-RAC1

Via le recrutement de GAB1, MET est impliqué dans la migration cellulaire par le recrutement de CRK (CT regulator kinase like-*proto oncogene*) conduisant à l'activation de RAC1, une petite GTPase qui régule l'organisation du cytosquelette (Lamorte et al. 2002) (Figure 6).

Figure 6 : Représentation schématique des différentes voies de signalisation du récepteur MET



3.3 Régulation du récepteur MET

On distingue deux voies de régulation du récepteur MET. Une voie dite dépendante de la fixation de l'HGF et une voie indépendante de cette interaction (**Figure 5**).

3.3.1 Voie de régulation HGF-dépendante

Comme nous l'avons décrit précédemment, la fixation de l'HGF sur le récepteur MET conduit à sa dimérisation, suivie d'une cascade de phosphorylation dont la tyrosine 1003 située dans le domaine juxtamembranaire (Birchmeier et al. 2003).

La tyrosine 1003, une fois phosphorylée, participe au recrutement de la protéine CBL E3 (*castias B-lineage lymphoma*). Cette interaction s'effectue après reconnaissance du motif DpYR situé dans le domaine juxtamembranaire de MET (Mohapatra et al. 2013). Le récepteur est ensuite ubiquitinylé, internalisé puis transféré dans les endosomes tardifs afin de subir une dégradation lysosomale (Lefebvre *et al.* 2012).

La protéine CBL est une protéine adaptatrice. Une fois fixée à la tyrosine 1003, elle recrute différents partenaires protéiques dont la CIN85 et les endophilines afin de former un complexe nécessaire au processus d'endocytose de MET (Take et al. 2000). Les endophilines sont des acyltransférases capables de modifier les phospholipides membranaires afin d'induire une courbure négative et une invagination de la membrane plasmique (Petrelli et al. 2002). Les endophilines se lient à la CIN85 *via* le domaine SH3. Elle interagissent également avec la dynamine et la synaptojanine impliquées dans la voie de l'endocytose clathrine-dépendante (Verstreken et al. 2002; 2003). Une fois internalisé, MET emprunte la voie des endosomes précoces, pour être dégradé (endosome de tri) ou recyclé à la membrane (endosome de recyclage) (Teis et Huber 2003). Dans les endosomes, à l'instar des autres RTK, MET continue à interagir avec différents partenaires tels que les ERK, STAT3 et GRB2 (Joffre *et al.* 2011 ; Kermorgant et Parker 2008). De manière intéressante, il a été observé, en présence d'une mutation activatrice située dans le domaine kinase de MET (M1268T et D1246N), une accumulation intracellulaire du mutant MET, couplée à un important recyclage de ce dernier à la membrane. Il a également été démontré que l'endocytose du mutant MET est essentielle à la migration cellulaire et que l'utilisation d'un inhibiteur de la dynamine (dynasore) diminue

la prolifération tumorale des cellules exprimant la forme mutée de la protéine MET (Joffre et al. 2011).

Bien que la voie séparant le recyclage et la dégradation de MET ne soit pas complètement élucidée, il semblerait que l'ubiquitination de la protéine joue un rôle essentiel. Il a ainsi été prouvé que la mono-ubiquitination de MET participe au recrutement de la protéine HRS (*HGF-regulated tyrosine kinase substrate*) nécessaire au transfert de MET de la voie des endosomes précoces vers la voie des endosomes tardifs, appelé également complexe multivésiculaire (Raiborg, Rusten et Stenmark 2003).

Il a également été constaté que la présence d'une mutation au niveau de la tyrosine 1003 de MET conduit à un défaut de recrutement de la protéine CBL et à une diminution de la phosphorylation de l'HRS (Abella et al. 2005). Le protéasome semble également jouer un rôle dans la dégradation du récepteur MET. En effet l'utilisation d'un inhibiteur spécifique du protéasome (MG132) réduit la dégradation de MET après stimulation par l'HGF (Lee *et al.* 2018).

3.3.2 Voie de régulation HGF-indépendante

3.3.2.1 Rôle des métalloprotéases

Les métalloprotéases de la famille ADAM (*A Disintegrin And Metalloproteinase*), liées à la membrane, sont des enzymes impliquées dans la régulation de MET dont le membre le plus étudié est l'ADAM 10 (Foveau et al. 2009) (**Figure 7**). Par des expériences d'inactivation génique, il a été démontré que l'expression de l'ADAM 10 est corrélée à l'expression membranaire de MET (Schelter et al. 2010).

L'action des métalloprotéases conduit à la génération de deux fragments ; un fragment libéré dans le milieu extracellulaire appelé MET soluble (ou MET-NTF) et un fragment intra membranaire appelé MET-CTF. Le fragment MET-NTF se compose de la chaîne α et d'une partie tronquée de la chaîne β formant ainsi un fragment de 130 kDa. Le fragment MET-CTF de 55 kDa subit un second clivage au niveau du domaine transmembranaire par des γ -sécrétases libérant un fragment cytosolique qui sera par la suite dégradé dans le

protéasome (Ancot et al. 2012). Il a ainsi été remarqué que le clivage de MET par l'ADAM pouvait s'effectuer au niveau de la membrane plasmique mais également en intracellulaire.

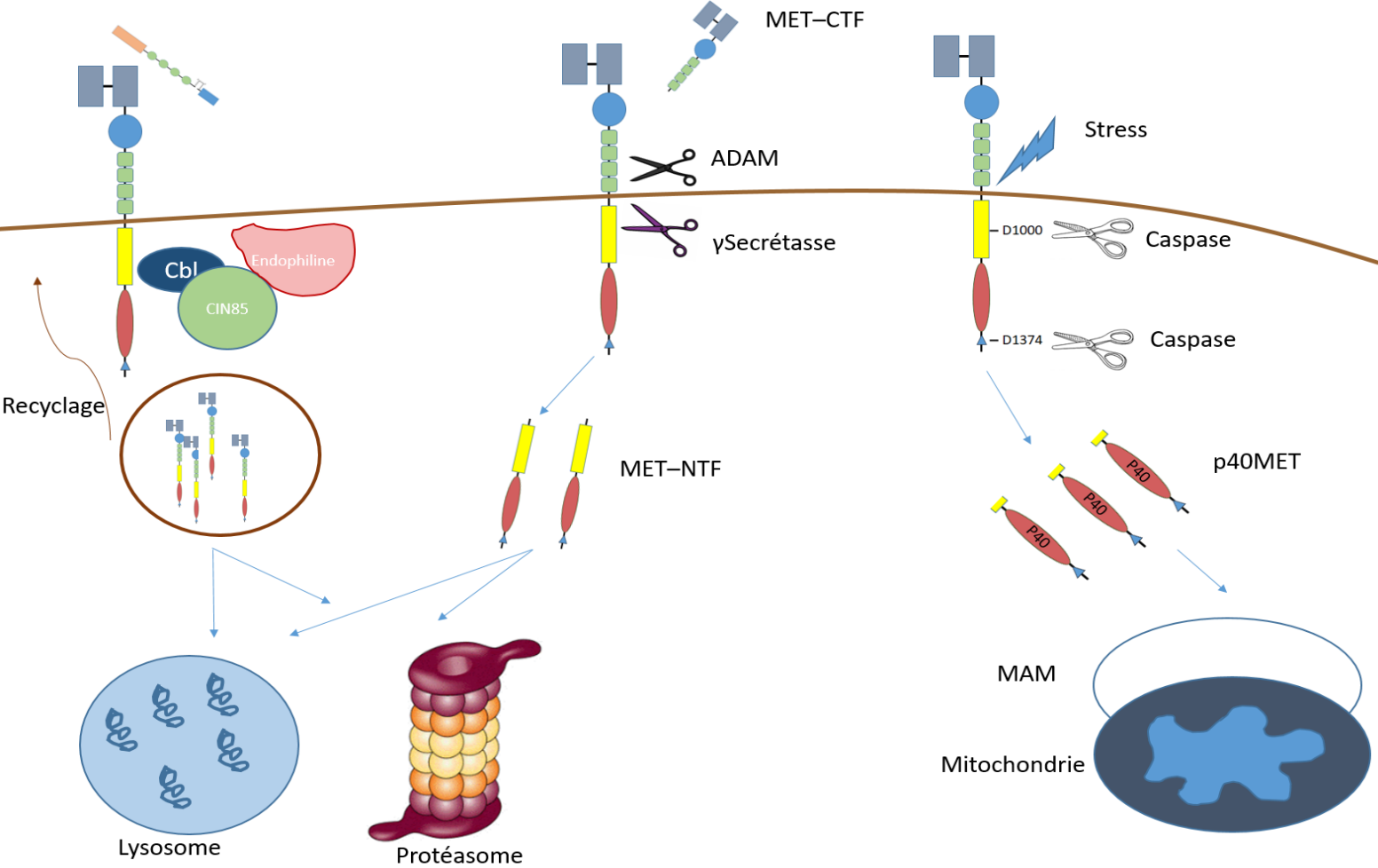
3.3.2.2 Rôle des caspases

En condition de stress apoptotique, MET peut être clivé et dégradé par les caspases au niveau des résidus D1002 et D1374 (**Figure 7**), ce qui entraîne la formation d'un fragment intracellulaire appelé p40MET (Lefebvre et al. 2013). Un fois libéré dans le cytosol, le fragment p40MET se localise dans la région de la membrane du réticulum endoplasmique associée à la mitochondrie (MAM). En favorisant le transfert de calcium entre le réticulum endoplasmique et les mitochondries, le fragment p40MET a un rôle proapoptique (Duplaquet et al. 2020).

3.3.2.3 Rôle de la sérine 985

En dépit de son implication dans la régulation du récepteur MET, le rôle de la sérine 985 dans la régulation est mal connu. En 1994, Gandino et al. ont observé qu'un stress oxydatif conduit à la phosphorylation de la sérine 985 entraînant ainsi une réduction de la phosphorylation des tyrosines du domaine kinase de MET, ce qui contribue à diminuer l'activité du récepteur (Gandino et al. 1994). Une étude menée par Hashigasako et al. a permis de constater que la phosphorylation de la sérine 985 est régulée de manière bidirectionnelle par la protéine kinase C (PKC), responsable de la phosphorylation du site, et la protéine phosphatase 2A (PP2A), responsable de la déphosphorylation (Hashigasako et al. 2004). Des données plus récentes ont suggéré que la sérine 985 phosphorylée participait à la diminution de l'expression membranaire de MET en favorisant l'endocytose de ce dernier (Nakayama et al. 2013). Les auteurs ont également démontré que la présence d'une sérine 985 phosphorylée diminuait la capacité de l'HGF à activer le récepteur MET et à induire le pouvoir mitogène de ce dernier.

Figure 7 : Représentation schématique des voies de régulation HGF-dépendantes et HGF-indépendantes du récepteur MET



4 Les altérations de MET dans le cancer

De nombreuses altérations du gène *MET*, conduisant à l'activation constitutive de la protéine MET, sont décrites dans les cancers humains. Il s'agit des mutations ponctuelles situées dans le domaine kinase de MET (MET/DK) et dans le domaine SEMA (MET/DS), des mutations responsables de l'épissage de l'exon 14 de *MET* (METex14), des fusions impliquant différents partenaires et des amplifications du gène *MET*.

4.1 Les mutations du domaine kinase de MET (MET/DK)

Les mutations du domaine kinase de MET (MET/DK) ont été décrites pour la première fois dans les formes sporadiques et héréditaires des carcinomes papillaires rénaux (HPRC) (Schmidt *et al.* 1997). Ces mutations sont maintenant repérées dans de nombreux cancers tels que les CBNPC, les gliomes de haut grade, les hépatocarcinomes, les cancers ORL et les cancers mammaires (Liu *et al.* 2015 ; Ghadjar *et al.* 2009 ; Lee *et al.* 2000 ; Di Renzo *et al.* 2000 ; Tovar et Graveel 2017).

À l'instar de celles des autres récepteurs à activité tyrosine kinase, ces mutations conduisent à une forme constitutivement active du récepteur MET, indépendante du ligand HGF.

Les mutations MET/DK impliquent différents sites, bien que les plus fréquentes se situent sur les valines 1092, 1188, 1200 et 1232, l'histidine 1094, les méthionines 1131 et 1250, les lysines 1228 et 1246 et les tyrosines 1230 et 1248 (Tovar et Graveel 2017) (**Figure 8**). En établissant par transfection stable plusieurs modèles de lignées NIH 3T3/METDK, Jeffers *et al.* ont démontré le potentiel tumorigène de ces mutations grâce à la formation de tumeurs sur modèle murins (Jeffers et al. 1997).

Afin de comprendre comment l'activation de MET par une mutation du domaine kinase affecte la tumorigenèse, des modèles de souris *knock-in* germinales ont été créés, portant des mutations MET D1226N, Y1228C, M1248T et M1248T/L1193V. Il est intéressant de noter que les différentes lignées de souris présentant une forme mutée de la protéine MET développent

différents types histologiques de cancer incluant des carcinomes, sarcomes et lymphomes (Graveel et al. 2004).

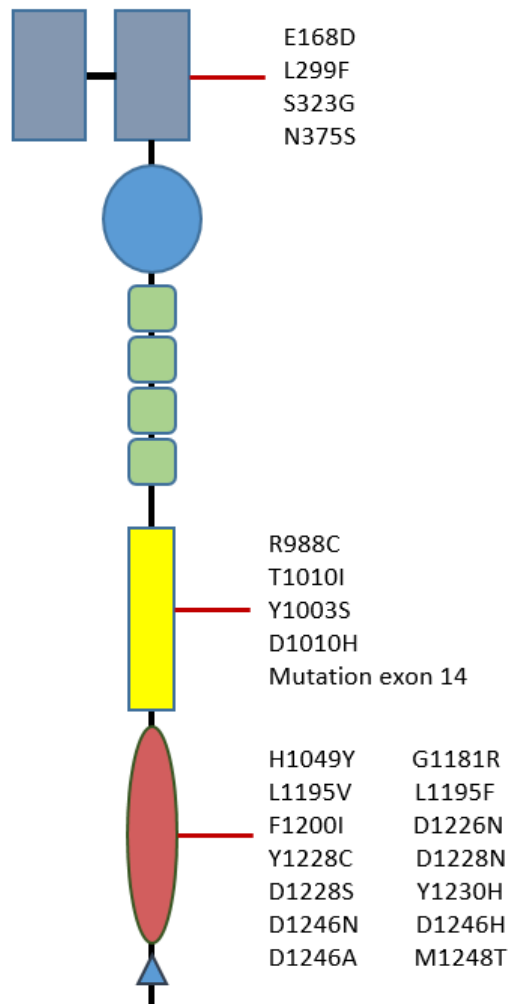
Dans les CBNPC avec mutation METex14, l'apparition d'une mutation dans le domaine kinase du récepteur est la principale cause de résistance aux inhibiteurs de MET. À ce jour, plus d'une quinzaine de mutations ont été décrites dans ce modèle (cf discussion « 7.1.2 Revue des mécanismes de résistance et des biomarqueurs de réponse aux ITK MET »).

4.2 Les mutations du domaine sémaphorine (MET/DS)

Les mutations MET/DS sont des altérations bien décrites dans les cancers bronchopulmonaires. Le domaine sémaphorine joue un rôle essentiel dans la fixation du ligand HGF et la dimérisation du récepteur (Kong-Beltran, Stamos et Wickramasinghe 2004). À l'instar des autres mutations du récepteur, les mutations MET/DS constituent un groupe hétérogène incluant les mutations MET E168D, L299F, S323G, N375S (Tovar et Graveel 2017) **(Figure 8)**.

La mutation MET N375S est la plus fréquente des mutations MET/DS observées dans les cancers gastriques et pulmonaires (Liu *et al.* 2012 ; Kong *et al.* 2017). Toutefois, à ce jour, nous disposons de peu de données clinicobiologiques concernant l'efficacité des ITK MET en présence de cette mutation. Dans une étude de phase I, a été traité sans succès une patiente porteuse d'un adénocarcinome gastrique avec mutation MET N375S (Jardim et al. 2014). En outre, des données cliniques suggèrent un pronostic défavorable des patients porteurs d'une mutation MET N375S (Xu *et al.* 2018).

Figure 8 : Représentation des mutations du domaine SEMA, du domaine juxtamembranaire et du domaine kinase de MET identifiées dans les CBNPC

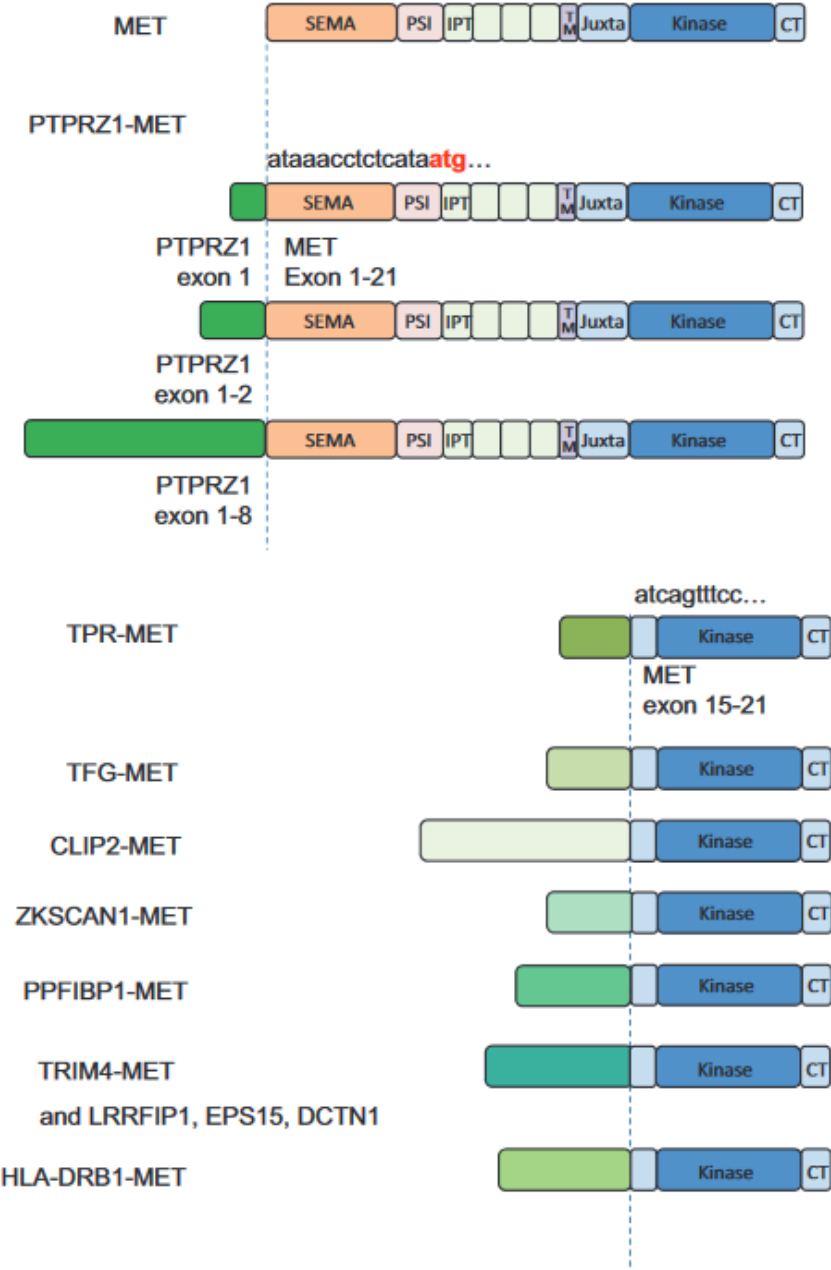


4.3 Les fusions du gène *MET*

Comme nous l'avons vu précédemment, la première fusion du gène *MET* a été décrite en 1984 (Cooper et al. 1984). Il s'agissait de la fusion entre l'oncogène *TPR* et le gène *MET*, découverte au sein d'une lignée cellulaire (NIH3T3) modifiée chimiquement par le MNNG. Depuis, plusieurs cas de fusions du gène *MET* ont été identifiées dans des cancers tels que les CBNPC, les carcinomes hépatocellulaires et les gliomes de haut grade (Wang et al. 2018 ; Gow et al. 2018 ; Zhu et al. 2019 ; Xu et al. 2018). Les fusions du gène *MET* peuvent être intra ou interchromosomiques. À ce jour, plus d'une dizaine de gènes partenaires ont été identifiés dont *TPR*, *TRIM4* (*Tripartite motif-containing protein 4*), *KIF5B* (*Kinesin-1 heavy chain*), *ZKSCAN1* (*Zinc finger protein with KRAB and SCAN domains*), *PPFIB1* (*Liprin-beta-1*), *LRRFIP1* (*Leucine-rich repeat flightless-interacting protein 1*), *EPS15* (*Epidermal Growth Factor Receptor Pathway Substrate 15*), *DCTN1* (*dynactin subunit 1*), *PTPRZ1* (*protein tyrosine phosphatase receptor type Z1*), *NTRK1*, *CLIP2* (*CAP-Gly Domain Containing Linker Protein 2*), *TFG* (*TRK-Fused Gene*), *HLA-DRB1* (*HLA class II histocompatibility antigen, DRB1 beta chain*) et *CAPZA2* (*F-actin-capping protein subunit alpha-2*) (Bao et al. 2014 ; Chowdhury et al. 2020 ; Nuga et al. 2018 ; Blanc-Durand et al. 2020 ; Yeh et al. 2015) (**Figure 9**). Les fusions du gène *MET* englobent généralement l'exon 15 du récepteur codant pour le domaine de kinase de *MET* et peuvent exclure l'exon 14 du gène et ainsi mimer les altérations METex14 (Yeh et al. 2015). Des données précliniques ont permis d'observer que la protéine chimérique issue d'une fusion de *MET* est associée à une phosphorylation constitutive du domaine kinase de *MET* et à des propriétés tumorigènes *in vivo* (Yeh et al. 2015). De manière intéressante, la fusion *PTPRZ1-MET*, englobant la quasi-totalité du gène *MET* (exon 2-21), est également associée à une phosphorylation constitutive du domaine kinase de *MET* et à une surexpression de la protéine (Chen et al. 2015).

Nous disposons de peu d'informations concernant l'efficacité des inhibiteurs de *MET* au sein de tumeurs arborant une fusion du gène *MET*. Quelques cas d'efficacité des ITK *MET* chez des patients porteurs de gliomes et de CBNPC ont été rapportés dont, notamment, une réponse partielle de huit mois obtenue chez un patient traité par crizotinib pour un CBNPC porteur de la fusion *HLA-DRB1-MET* (Davies et al. 2017).

Figure 9 : Représentation schématique des fusions du gène MET. Figure issue de la publication « The multiple paths towards MET receptor addiction in cancer » par Duplaquet et al.



4.4 Les amplifications du gène *MET*

Une amplification se définit par une augmentation du nombre de copies d'un gène. L'amplification se distingue d'une polysomie par un ratio gène/centromère supérieur à 1 (Liang et Wang 2020).

Les amplifications du gène *MET* sont décrites *de novo* dans 2 à 5 % des cas de CBNPC (Kawakami et al. 2014) et leur présence est associée à un mauvais pronostic (Finocchiaro et al. 2015).

Des études ont proposé une définition du niveau de l'amplification : (Alexander Drilon, Cappuzzo, et al. 2017; Noonan et al. 2016)

- faible, lorsque le ratio *MET/CEP7* (*Pericentromeric regions of chromosomes 7*) est compris entre $\geq 1,8$ et $\leq 2,2$;
- intermédiaire, lorsque ce ratio est compris entre $> 2,2$ et < 5 ;
- forte, lorsque ce ratio est ≥ 5 .

Le taux d'incidence des cancers bronchiques avec une amplification forte de *MET* est rare (0,34 %) (Liang et Wang 2020). Par ailleurs, contrairement aux amplifications faibles, aucun driver oncogénique n'est retrouvé dans les tumeurs arborant une amplification forte (*MET/CEP7* >5), ce qui témoigne du fait que cette altération peut agir comme un driver oncogénique (Noonan et al. 2016).

Les amplifications ont également été dépeintes comme un mécanisme de résistance aux thérapies ciblées avec des taux allant de 5 à 20 % des patients traités par ITK EGFR pour un CBNPC EGFR-muté (Cortot et Janne 2014a). Ce mécanisme a également été identifié chez des patients traités par inhibiteur de ALK et de RAF dans des fréquences plus faibles (Dagogo-Jack *et al.* 2020).

D'un point de vue thérapeutique, de nombreux essais ont été menés pour évaluer l'efficacité des inhibiteurs de MET chez des patients atteints de tumeurs avec amplification de *MET*. L'étude PROFILE 1001 a évalué le crizotinib chez des patients porteurs d'un CBNPC répartis en trois groupes selon le niveau d'amplification. Il a ainsi pu être observé un taux de réponse de 67 % dans le groupe avec un niveau fort d'amplification *versus* 17 % et 0 % dans les groupes

de niveaux intermédiaire et faible (Tsang Shaw *et al.* 2019). Une récente étude de phase II a également évalué le crizotinib chez des patients porteurs d'un CBNPC avec une amplification mesurée à six copies du gène *MET* et un ratio $MET/CEP7 > 2,2$ (Camidge *et al.* 2014). Le taux de réponse globale était de 31 %. Lors de l'ASCO (*American Society of Clinical Oncology*) 2020, les données de l'essai GEOMETRY évaluant le capmatinib chez les patients porteurs d'un CBNPC METex14 ou d'une amplification forte du gène *MET* (nombre de copies du gène ≥ 10) ont été présentées : le taux de réponse était de 40 % chez les patients n'ayant reçu aucun traitement précédent l'inclusion dans l'étude et de 29 % pour les patients prétraités (Wolf *et al.* 2020).

Dans les autres tumeurs solides, nous disposons à ce jour de données dans l'hépatocarcinome avec un taux de réponse du capmatinib de l'ordre de 10 % pour l'ensemble des patients et pouvant atteindre 30 % chez des patients avec un nombre de copie du gène *MET* ≥ 5 et une surexpression de *MET* d'au moins 50 % de la tumeur (Qin *et al.* 2019). Dans les cancers œsophagiens et gastriques présentant une amplification de *MET*, les taux de réponse étaient de 18 % avec l'AMG 337 (Van Cutsem *et al.* 2019).

En présence d'une amplification de *MET* acquise secondairement aux ITK EGFR, plusieurs essais ont évalué une combinaison de thérapie ciblée par un ITK *MET* et EGFR. Le tepotinib en association avec le géfitinib a été évalué dans une étude de phase II incluant des patients porteurs d'un CBNPC (T790M négatif) préalablement traités par un ITK EGFR de première ou deuxième génération et ayant développé une amplification de *MET* (Park *et al.* 2019). Le taux de réponse objective était de 67 % avec une PFS de 16,6 mois. Le savolitinib et le capmatinib ont également été examinés en association avec le géfitinib chez des patients porteurs d'un CBNPC EGFR muté, préalablement traités par un ITK EGFR et ayant développé une amplification de *MET* (Wu *et al.* 2018 ; Yang *et al.* 2017). Les taux de réponse étaient plus faibles, respectivement de 25 et 29 %. Il convient de noter que le taux de patients porteurs d'une mutation T790M n'était pas connu. Le savolitinib a également été évalué en combinaison avec l'osimertinib dans trois essais de phase I (Sequist *et al.* 2020 ; Oxnard *et al.* 2020 ; Oxnard *et al.* 2019). Ces derniers ont inclus des patients porteurs d'un CBNPC EGFR muté, préalablement traités par un ITK EGFR de première, deuxième ou troisième génération et ayant développé une amplification du gène *MET* avec ou sans mutation T790M. Les taux de réponse étaient compris entre 64 et 67 % chez les patients n'ayant jamais reçu d'inhibiteur

EGFR de troisième génération et de 23 % chez les patients prétraités par un ITK EGFR de troisième génération.

4.5 Les mutations METex14

4.5.1 Découverte des mutations METex14

L'existence d'altérations susceptibles d'induire à un épissage alternatif conduisant à un saut de l'exon 14 de *MET* a été décrite pour la première fois en 2003 (Ma, Kijima, et al. 2003). En 2005, l'analyse d'ADN complémentaire dans une cohorte de 127 patients atteints d'un CBPNC a permis d'identifier un patient (0,78 %) porteur d'un saut de l'exon 14 de *MET* (Ma et al. 2005). En 2006, Kong *et al.* se sont intéressés aux conséquences fonctionnelles des mutations METex14. Après avoir identifié une lignée cellulaire (lignée H596) et deux lignées issues de patients porteurs d'un saut d'exon 14 de *MET*, les auteurs ont mis en évidence une surexpression du récepteur MET couplée à une expression prolongée de la forme phosphorylée de MET en réponse à l'HGF ainsi qu'une perte de fixation de l'ubiquitine ligase CBL (Kong-Beltran 2006). L'ensemble de ces résultats témoignent de l'impact des mutations METex14 dans la régulation du récepteur MET. De manière intéressante, l'efficacité d'un anticorps monoclonal ciblant MET (OA-5D5) sur la viabilité de la lignée H596 en présence de l'HGF a également été démontrée pour la première fois, ouvrant la voie aux possibilités thérapeutiques. En 2015, Frampton *et al.* ont rapporté l'analyse génomique de tumeurs (tous types) issues de 38 028 patients (Frampton et al. 2015). 221 cas ont été identifiés comme porteurs d'un saut de l'exon 14 de *MET*. Les altérations METex14 ont principalement été repérées dans 3 % des adénocarcinomes pulmonaire, 2,3 % des autres CBNPC, 0,4 % des gliomes et 0,4 % des tumeurs sans primitifs retrouvés. Par ailleurs, contrairement à ce qui est observé dans les autres modèles d'addiction oncogénique, le nombre d'altérations susceptibles d'induire un saut de l'exon 14 de MET était important avec 126 variants recensés.

4.5.2 Caractéristiques cliniques histologiques et moléculaires des patients porteurs d'un CBNPC avec mutation METex14

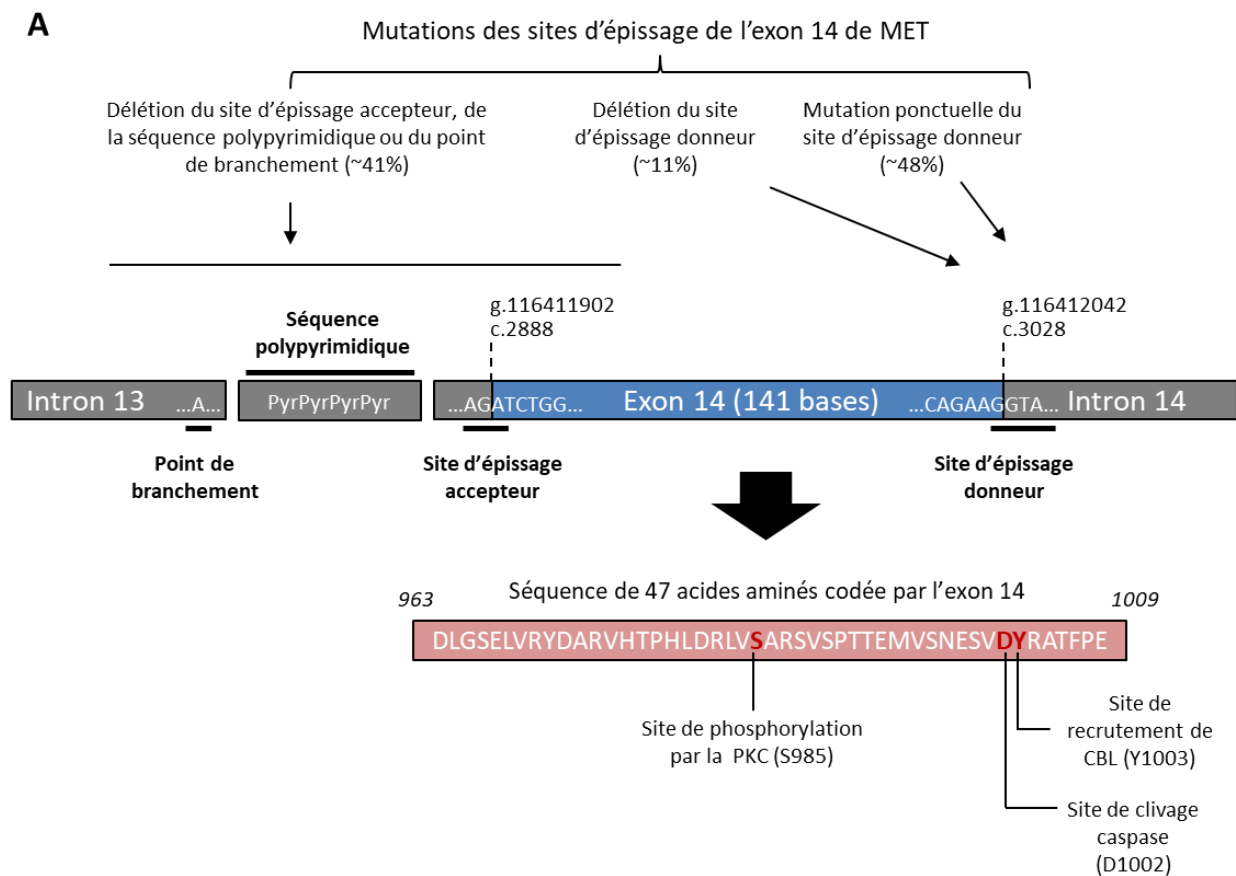
En 2016, une étude a analysé ces caractéristiques sur 298 patients atteints d'un CBNPC muté METex14 (Schrock et al. 2016). Il s'agissait principalement de femmes (60 %) d'âge médian élevé (73 ans). Le statut tabagique était réparti de manière homogène. Les altérations METex14 étaient plus communes dans le sous-type histologique adénoquameux (8,2 %), suivi du sous-type sarcomatoïde (7,7 %) puis adénocarcinome (2,9 %) et épidermoïde (2,1 %). Les altérations les plus fréquentes étaient des substitutions sur le site d'épissage donneur (49,1 %) des insertions et/ou délétions sur le site accepteur (32,9 %) et des insertions/délétions sur le site donneur (13,8 %) (**Figure 10**).

Plus récemment, Awad *et al.* ont présenté, lors de l'ASCO 2020, les résultats d'une étude portant sur 1 393 prélèvements issus de 1 387 patients porteurs d'un CBNPC METex14 (Awad et al. 2020). Ces patients ont été identifiés à partir d'une analyse génomique d'une cohorte de 60 495 patients portant ainsi le taux de mutation METex14 à 2,3 %. Les données cliniques n'étaient pas détaillées. Toutefois, sur le plan moléculaire, les mutations étaient réparties de manière hétérogène :

- sur le site donneur uniquement (42 % des cas) ;
- sur le site accepteur (4,7 %) ;
- sur le tractus polypyrimidine (15 %) ;
- à la fois sur l'accepteur et le tractus polypyrimidine (13 %) ;
- sur l'acide aspartique 1010 (23 %) ;
- sur la tyrosine 1003 (2,1 %).

Concernant les co-altérations, les amplifications *MDM2*, *CDK4* et *MET* ont été observées dans respectivement 32 %, 19 % et 12 % des cas. Dans 66 cas (4,8 %), une altération sur un autre oncogène driver a été identifiée incluant *KRAS* (68 %) et *EGFR* (14 %).

Figure 10 : Représentation schématique des mutations des sites d'épissage de l'exon 14 de MET. Schéma issu de l'article « MET exon 14 splicing sites mutations: a new therapeutic opportunity in lung cancer » de Baldacci et al.



4.5.3 Revue des ITK MET dans la prise en charge des CBNPC mutés METex14

À ce jour, l'ANSM (L'agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé) autorise l'utilisation des inhibiteurs de MET : ils sont disponibles en ATU (Autorisation temporaire d'utilisation) dans la prise en charge des CBNPC METex14 après échec d'une première ligne thérapeutique.

Les résultats de sept essais cliniques évaluant un ITK MET dans la prise en charge des CBNPC METex14 ont été communiqués (**Tableau 1**).

L'étude de phase I PROFILE 1001 a inclus 69 patients avec un CBNPC METex14 traité par crizotinib (Drilon *et al.* 2018). Le taux de réponse objective était de 32 % avec une médiane de survie sans progression de 7,2 mois (5,4-9,2 mois). L'étude ACSE a évalué le crizotinib chez 28

patients porteurs d'une mutation de *MET*, dont 24 d'une mutation METex14 (Moro-Sibilot et al. 2018a). Le taux de réponse objective était de 18 % (4-32) avec une médiane de survie sans progression de 8,1 mois (4,1-12,7 mois).

L'essai de phase II METROS a inclus 26 patients porteurs CBNPC avec une dérégulation de *MET* traités par crizotinib (Landi et al. 2019). Seize tumeurs portaient une amplification de *MET*, neuf une mutation et une tumeur présentait à la fois une mutation et une amplification. Le taux de réponse objective était de 27 % (IC 11-47 %) et le taux de contrôle de la maladie était de 69 %. La survie sans progression et la survie globale médiane étaient respectivement de 4,4 mois (95 % IC 3,0-5,8) et de 5,4 mois (95 % IC 4,2-6,5). Aucune différence de réponse selon le type d'altération de *MET* n'a été constatée.

GEOMETRY est une étude prospective, non randomisée et ouverte, évaluant le capmatinib, un inhibiteur de type I compétitif de l'ATP spécifique de *MET*, chez 97 patients adultes atteints d'un CBNPC METex14 localement avancé ou métastatique (Wolf et al. 2018). Le taux de réponse globale (ORR) était de 68 % chez les patients n'ayant jamais été traités et de 41 % chez les patients ayant au moins reçu une ligne de traitement. La durée médiane de la réponse était respectivement de 11,14 mois (IC à 95 % : [5,55-NE]) et de 9,72 mois (IC à 95 % : [5,55-12,98]). Le capmatinib a également été évalué, dans un essai de phase I, chez 55 patients atteints de CBNPC et de dérégulation de *MET* (Schuler et al. 2020). Bien que l'étude se soit particulièrement focalisée sur des patients présentant un CBNPC avec une amplification de *MET*, des patients porteurs d'un CBNPC avec un saut de l'exon 14 de *MET* ont également été inclus. Le taux de réponse objective était de 100 % (4 sur 4) dans les CBNPC présentant une mutation responsable d'un saut l'exon 14 de *MET*, de 16,6 % (2 sur 12) dans les CBNPC présentant une amplification mesurée entre quatre et six copies du gène et de 46,6 % (7 sur 15) dans les CBNPC présentant une amplification supérieure à six copies du gène (dont trois avec une mutation METex14). En l'absence d'amplification du gène, le taux de réponse était de 0 %.

VISION est un essai de phase II mono-bras qui a évalué le tepotinib, un inhibiteur de type I compétitif pour l'ATP, spécifique de *MET*, chez des patients atteints d'un CBNPC METex14, de stade IIIB/IV, ayant reçu une ou deux lignes de traitements systémiques (Paik et al. 2017 ; Felip et al. 2018 ; Paik et al. 2020). Deux cohortes ont été établies en fonction du type de

biopsie effectuée pour l'identification des mutations METex14 (biopsie liquide [LBx] ou biopsie tumorale [TBx]). Le taux de réponse était de 48 % (IC à 95 %, 36 à 61) chez les 66 patients du groupe LBx et de 50 % (IC à 95 %, 37 à 63) chez 60 patients du groupe TBx. Le taux de réponse évalué par l'investigateur était de 56 % (IC à 95 %, 45 à 66) et s'avérait similaire quel que soit le traitement antérieur reçu.

Le savolitinib, un inhibiteur de type I spécifique de MET est en cours d'évaluation dans le cadre d'un essai ouvert de phase II multicentrique, mono-bras, chez des patients atteints de CBNPC METex14 (Lu et al. 2020). Des résultats préliminaires après inclusion de 70 patients ont été récemment annoncés. Le taux de réponse globale (ORR) était de 47,5 % (34,6 %, 60,7 %) et la survie sans progression de 6,8 mois (4,2, 13,8).

Le telisotuzumab vedotin (ABBV-399) est un anticorps conjugué composé de l'anticorps monoclonal humanisé anti-MET (ABT-700) couplé à la monométhylauristatine E (MMAE) cytotoxique (Waqar et al. 2019). L'ABBV-399 a été évalué dans un essai de phase I chez des patients présentant des tumeurs solides avancées avec sur expression de MET (IHC H-score ≥ 150) ou une amplification de MET (Camidge et al. 2019). Un des 48 patients inclus était porteur d'un CBNPC avec une amplification de MET et une mutation METex14. Ce patient a présenté une progression de sa maladie.

Le cabozantinib, un inhibiteur de type II qui cible les récepteurs MET, VEGFR2, RET, KIT, FLT-1/3/4, TIE2, et AXL (Yakes et al. 2011), et le mérestinib, un inhibiteur de type II qui cible les protéines MET (2nM), MST1R, FLT3, AXL, MERTK, TEK, ROS1, NTRK1/2/3, DDR1/2 et MKNK1/2 (Yan *et al.* 2013). Ces deux molécules sont actuellement en cours d'évaluation dans deux études de phase II multicentriques, mono-bras, chez des patients porteurs d'un CBNPC METex14 (NCT03911193, NCT02920996).

Table 1 : Essais cliniques des ITK MET dans les CBNPC METex14

Molécule	Cible	Type	Essai	Phase	Résultats
Capmatinib	MET	ITK1b	GEOMETRY	II	METexon14 : 1L ORR : 67,9 % ; DOR : 11,1 mo 2L+ ORR : 40,6 % ; DOR : 9,7 mo
Tepotinib	MET	ITK1b	VISION	II	TBx ORR : 48 % ; LBx ORR : 50 %
Crizotinib	MET, ALK, ROS1	ITK1a	PROFILE1001	I	ORR : 32 %
Crizotinib	MET, ALK, ROS1	ITK1a	ACSE	II	ORR : 18 %
Crizotinib	MET, ALK, ROS1	ITK1a	METROS	II	ORR : 27 %
Savolitinib	MET	ITK1b	NCT02897479	II	ORR : 47,5 %

5 Objectif de la thèse

La détection d'altérations moléculaires susceptibles de répondre à des thérapies ciblées ainsi que l'identification des mécanismes de résistance à ces thérapies sont cruciaux pour l'amélioration de la prise en charge en oncologie.

Dans les CBNPC METex14, les taux de réponse aux ITK MET sont sensiblement inférieurs à ceux observés dans d'autres modèles d'addiction oncogénique ce qui suggère la présence de mécanismes de résistances primaires. De nombreux travaux ont mis en évidence un lien étroit entre la voie PI3K-AKT et le récepteur MET.

- Mon premier objectif a été d'évaluer l'impact des altérations de la voie PI3K-AKT dans la résistance aux ITK MET dans les CBNCP METex14.

L'arrivée des ITK MET offre de nouvelles perspectives thérapeutiques pour les patients porteurs d'une altération du récepteur MET responsable d'une addiction oncogénique.

- Mon deuxième objectif a été d'étudier de potentiels nouveaux biomarqueurs prédictifs de réponse aux ITK MET.

Enfin, l'identification des mécanismes de résistance en routine clinique s'avère un enjeu essentiel.

- Mon 3ème objectif est d'évaluer la faisabilité de la recherche de mécanismes de résistance aux ITK ainsi que d'étudier l'impact sur le choix thérapeutique. Pour ce 3ème objectif nous avons choisi d'étudier le modèle des CBNPC ALK+ traités par ITK ALK.

6 ARTICLE

Article n°1 : **Alterations in the PI3K pathway drive resistance to MET inhibitors in NSCLC harboring MET exon 14 skipping mutations** (1er auteur, Article publié en 2020 dans le Journal of Thoracic oncology)

Article n°2 : **Response to capmatinib in a MET fusion-positive cholangiocarcinoma** (Dernier auteur, soumission prévue en janvier 2021 dans JCO precision oncology)

Article n°3: **Relevance of detection of mechanisms of resistance to ALK inhibitors in ALK-rearranged NSCLC in routine practice** (1er auteur, article publié en 2019 dans clinical Lung Cancer)

Alterations in the PI3K Pathway Drive Resistance to MET Inhibitors in NSCLC Harboring MET Exon 14 Skipping Mutations



Philippe Jamme, MD, MSc,^a Marie Fernandes, MSc,^a
Marie-Christine Copin, MD, PhD,^{a,b} Clotilde Descarpentries, MD,^c
Fabienne Escande, MD, PhD,^c Angela Morabito, PhD,^a Valérie Grégoire, PhD,^b
Matthieu Jamme, MD,^d Simon Baldacci, MD, PhD,^e David Tulasne, PhD,^a
Zoulika Kherrouche, PhD,^a Alexis B. Cortot, MD, PhD^{a,e,*}

^aUniversity of Lille, CNRS, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, UMR9020 - UMR-S 1277 - Canther - Cancer Heterogeneity, Plasticity and Resistance to Therapies, Lille, France

^bPathology Department, CHU Lille, University of Lille, Lille, France

^cDepartment of Biochemistry and Molecular Biology, Hormonology Metabolism Nutrition Oncology, CHU Lille, University of Lille, Lille, France

^dINSERM U-1018, CESP, Team 5 (EpReC, Renal and Cardiovascular Epidemiology), UVSQ, Villejuif, France

^eThoracic Oncology Department, CHU Lille, University of Lille, Lille, France

Received 29 September 2019; revised 23 January 2020; accepted 26 January 2020

Available online - 10 March 2020

ABSTRACT

Hepatocyte growth factor receptor (MET) tyrosine kinase inhibitors (MET TKIs) have been found to have efficacy against advanced NSCLC with mutations causing MET exon 14 skipping (*METex14* mutations), but primary resistance seems frequent, as response rates are lower than those for targeted TKIs of other oncogene-addicted NSCLCs. Given the known interplay between MET and phosphoinositide 3-kinases (PI3K), we hypothesized that in *METex14* NSCLC, PI3K pathway alterations might contribute to primary resistance to MET TKIs. We reviewed clinical data from 65 patients with *METex14* NSCLC, assessing PI3K pathway alterations by targeted next-generation sequencing (mutations) and immunohistochemistry (loss of phosphatase and tensin homolog [PTEN]). Using a cell line derived from a patient with primary resistance to a MET TKI and cell lines harboring both a *METex14* mutation and a PI3K pathway alteration, we assessed sensitivity to MET TKIs used alone or with a PI3K inhibitor and investigated relevant signaling pathways. We found a phosphatidylinositol 3-kinase catalytic subunit alpha (*PIK3CA*) mutation in two of 65 samples (3%) and loss of PTEN in six of 26 samples (23%). All three of the MET TKI-treated patients with a PI3K pathway alteration had been found to have progressive disease at first assessment. Likewise, MET TKIs had no effect on the proliferation of *METex14*-mutated cell lines with a PI3K pathway alteration, including the PTEN-lacking patient-derived cell line. Treatment

combining a MET TKI with a PI3K inhibitor caused inhibition of both PI3K and MAPK signaling and restored sensitivity to MET TKIs. PI3K pathway alterations are common in *METex14* NSCLC and may confer primary resistance to MET TKIs. In preclinical models, PI3K inhibition restores sensitivity to MET TKIs.

© 2020 International Association for the Study of Lung Cancer. Published by Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: TKI; Resistance; MET; PI3K; NSCLC

*Corresponding author.

Disclosure: Pr. Cortot participated in advisory boards or received honoraria from AstraZeneca, Bristol-Myers Squibb, Merck & Co., Pfizer, Roche, Novartis, and Takeda, and received grants paid to his institution from Novartis and Merck. Dr. Jamme reports nonfinancial support from Chugai Pharma, Roche, and Bristol-Myers Squibb, and personal fees from Boehringer Ingelheim, outside of the submitted work. Dr. Baldacci reports personal fees and nonfinancial support from Lilly, GlaxoSmithKline, Roche, Pfizer, and a grant from the Intergrupe Francophone de Cancérologie Thoracique, outside of the submitted work. Pr. Copin participates in advisory boards for Pfizer and Roche. Dr. Descarpentries reports personal fees and nonfinancial support from AstraZeneca, Novartis Pharma S.A.S., Roche S.A.S., Boehringer Ingelheim France, and Pfizer, outside of the submitted work. The remaining authors declare no conflict of interest.

Address for correspondence: Alexis B. Cortot, MD, PhD, Hôpital Calmette, CHU Lille, Boulevard du Professeur Leclercq, 59037 Lille, France. E-mail: alexis.cortot@chru-lille.fr

© 2020 International Association for the Study of Lung Cancer. Published by Elsevier Inc. All rights reserved.

ISSN: 1556-0864

<https://doi.org/10.1016/j.jtho.2020.01.027>

Introduction

Splice site mutations located in the regions flanking exon 14 of the hepatocyte growth factor receptor (*MET*) oncogene (*METex14*) have been reported in 3% of patients with NSCLC.^{1,2} Elderly persons and smokers constitute a larger proportion of patients harboring these mutations than those with alterations affecting other key oncogene drivers, such as epidermal growth factor receptor (*EGFR*) or anaplastic lymphoma kinase (*ALK*).³ *MET* exon 14 skipping, which causes the absence of the *MET* juxtamembrane domain (containing several negative regulation sites), leads to increased *MET* receptor stability and activation.⁴ This activation results in recruitment of effector proteins, such as GRB2-associated-binding protein 1 (*GAB1*), growth factor receptor-bound protein 2 (*GRB2*), Src homology 2 domain-containing (*SHC*), signal transducer and activator of transcription (*STAT*), and phosphoinositide 3-kinase (*PI3K*), leading to activation of downstream signaling pathways, including the *PI3K*, mitogen-activated protein kinase (*MAPK*), and Janus kinase (*JAK*)-*STAT* pathways.^{4,5} As *METex14* mutations can confer sensitivity to *MET* inhibition, several clinical trials have evaluated *MET* tyrosine kinase inhibitors (*TKIs*) in *METex14* NSCLC. Reported objective response rates (*ORRs*) range from 32% to 67.9%.⁶⁻⁹ These results are somewhat lower than those observed with targeted therapies for other oncogene-addicted NSCLCs, such as *EGFR*-mutated or *ALK*-rearranged NSCLC. This may be due to a higher frequency of primary resistance mechanisms in *METex14* NSCLC, including concurrent molecular alterations.

The *PI3K* signaling pathway is involved in several cell functions induced by activation of the *MET* receptor, including cell migration and survival.¹⁰ The *MET* receptor interacts with class I *PI3K* isoforms directly through their *SH2* domain and indirectly through activation of *GAB1*, focal adhesion kinase (*FAK*), and *RAS*.¹⁰ *PI3K* promotes phosphorylation of phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate (*PIP2*) to phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate (*PIP3*), favoring plasma membrane recruitment of the *PDK1* kinase, leading notably to *AKT* phosphorylation. The phosphatase and tensin homolog (*PTEN*), in contrast, causes *PIP3* dephosphorylation and thus acts as the main regulator of the *PI3K* pathway. The *PI3K* pathway is frequently dysregulated in NSCLC. Phosphatidylinositol 3-kinase catalytic subunit alpha (*PIK3CA*) and *AKT1* mutations are found in 4.1% to 5.2%¹¹⁻¹³ and 0.2% to 1.9%¹⁴⁻¹⁶ of lung cancers, respectively, and loss of *PTEN* has been reported in 24% of NSCLC. Several articles report the role of *PI3K* pathway alterations in resistance to cancer therapy, including *TKI* treatment.^{17,18} Given the role of the *MET* receptor in direct activation of the *PI3K* pathway, we

hypothesized that alterations in this pathway might contribute to the resistance of *METex14* NSCLC to *MET* inhibitors.

Results

PI3K Pathway Alterations Are Common in METex14 NSCLC

Considering the involvement of the *PI3K* pathway in resistance to *TKIs* in several oncogene-addicted cancer models, we focused retrospectively on *PI3K* pathway alterations in a multicentric cohort of patients with NSCLC whose tumors displayed *METex14* mutations. All tumor samples were obtained at diagnosis, before any systemic treatment. Screening for mutations had been done using the *CLAPv1* optimized next-generation sequencing (*NGS*) panel combined with fragment length analysis, as previously described.² All these mutations were previously described or predicted to induce *MET* exon 14 skipping (Supplementary Table 1). The median age was 75.0 years (range 49-88 y); there were as many men as women (49%) and as many smokers as never smokers (55%). Most patients had been diagnosed at an advanced stage (67%). A total of 17 of them had received a *MET* *TKI*, either off-label or as part of a clinical trial (Fig. 1A).

The *METex14* mutations detected in this cohort were of the following types: deletions in 30 patients (46%), substitutions in 28 patients (42%), and indels in seven patients (12%). A total of 39 samples had been tested for *MET* gene amplification by fluorescence in situ hybridization, of which five (13%) were positive: one with low amplification (*MET/CEP7* ratio 1.8), one with intermediate amplification (*MET/CEP7* ratio 3.2), and three with high amplification (clusters in 53%-78% of tumor cells) (Supplementary Table 1).

Samples from all 65 patients had been tested for *PI3K* pathway alterations (*PIK3CA*, *AKT*, and *PTEN* mutations) by targeted *NGS*, revealing two *PIK3CA* mutations (3%) (Fig. 1B) but no *AKT* or *PTEN* mutation. We further evaluated *PTEN* expression by immunohistochemistry (*IHC*) performed on 26 available tumor samples (Supplementary Table 3). This revealed six samples (23%) with total loss of *PTEN* expression (Fig. 1C) (Supplementary Fig. 1).

In addition, the observed mutations included 15 tumor protein 53 (*TP53*) mutations (27%), two *KRAS* mutations (G13C), one *NRAS* mutation (Q61L), one *EGFR* mutation (V774M), and one *SMA*- and *MAD*-related protein 4 (*SMAD4*) mutation (D351N) (Supplementary Table 1). Overall, six of the 26 samples tested by both *NGS* and *PTEN* *IHC* (23%) displayed a *PI3K* pathway alteration. This makes the *PI3K* pathway one of the most altered pathways in *METex14* NSCLC.

Patients With METex14 With Concurrent Alterations in the PI3K Pathway Display Primary Resistance to MET TKIs

To determine whether PI3K pathway alterations might affect sensitivity to MET inhibition, we analyzed responses to treatment in 17 patients with METex14 NSCLC having received a MET TKI.

Tumor samples from three of these patients seemed, on the basis of either NGS or PTEN IHC, to have an impaired PI3K pathway (Fig. 1D).

In 14 patients, no alteration of the PI3K pathway was detected. This means that NGS revealed no PIK3CA, AKT, or PTEN mutation and that the corresponding tumor samples were either PTEN positive (four samples) or had not been analyzed by PTEN IHC (10 samples). Of these 14 patients, nine displayed an ORR (64%), one achieved disease stability for 6 months, and four had progressive disease at first assessment. Although none of these last four harbored a PIK3CA mutation, one of them, identified as PTEN positive, harbored an EGFR V774M mutation likely to explain primary resistance to MET TKI. The PTEN status of the other three was not available. The three patients positive for PTEN but with no EGFR, KRAS, or TP53 mutation all responded to MET TKI treatment.

In contrast, all three patients with an impaired PI3K pathway, including one with a PIK3CA mutation and two with total loss of PTEN expression, were found to have progressive disease at first radiological assessment (Fig. 1D and E). The clinical courses of these three patients are detailed in the subsequent texts.

Patient CHUL#11, who harbored a c.3082+1G>T MET mutation, was a 49-year-old former-smoker woman diagnosed with stage IV NSCLC. She received first-line platinum-based chemotherapy, but progression was observed after four cycles of treatment. The patient then received a MET TKI as part of a clinical trial. The treatment was stopped at first radiological assessment because of rapid disease progression (Fig. 1E). The patient further received an anti-programmed cell death protein 1 agent followed by a new course of chemotherapy with no efficacy. She died 9 months after the diagnosis. PTEN IHC performed on a right cervical lymph node obtained before treatment with the MET TKI revealed loss of PTEN expression (Fig. 1C).

Patient CHUL#18, who harbored a c.3067_3082+1delinsC MET mutation, was a 75-year-old woman diagnosed with advanced adenocarcinoma. She received six cycles of platinum-based chemotherapy with maintenance pemetrexed for 1 year. She then received a MET TKI as part of a clinical trial. The treatment was stopped at first radiological assessment because of new bone and adrenal gland metastases (Fig. 1E). The patient

died three months later. PTEN IHC performed on a pre-treatment bronchial biopsy specimen revealed loss of PTEN expression (Supplementary Fig. 1).

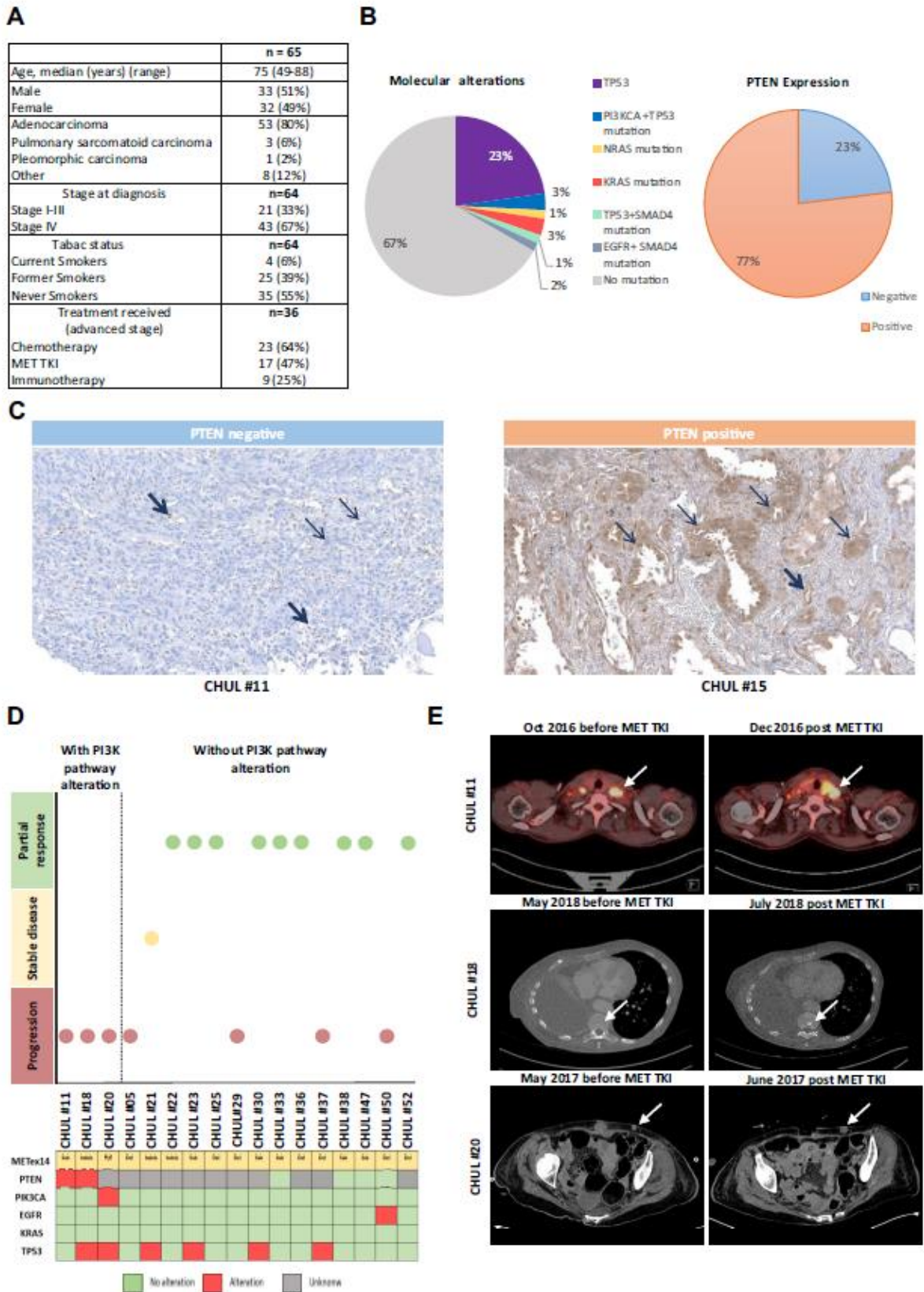
Patient CHUL#20, who harbored a c.3082+1G>A MET mutation, was a 75-year-old woman diagnosed with metastatic pulmonary sarcomatoid carcinoma. The patient was not eligible for chemotherapy and therefore received a MET TKI as first-line therapy. The treatment was stopped at first radiological assessment because of lymph node progression (Fig. 1E). The patient died within 2 weeks after discontinuing the treatment. Targeted NGS performed on the lung tumor revealed an activating PIK3CA mutation (N1044K).

These three cases suggest that in patients with METex14 NSCLC, alterations in the PI3K pathway are associated with primary resistance to MET TKIs.

PTEN Loss Is Associated With Sustained Activation of the PI3K Pathway and Resistance to MET TKIs in METex14 Cancer Cells

To decipher the role of PI3K pathway alterations in resistance to MET TKIs, we derived a cell line from a pleural effusion sample from patient CHUL#11, collected at progression on third-line therapy. The tumor sample from this patient harbored a METex14 mutation and displayed no PTEN expression detectable by IHC (Fig. 1C). Targeted NGS confirmed the presence of METex14 mutation c.3082+1G>T in this cell line (named ZORG), identical to that found in the patient tumor sample. As expected, the mutation leads to exon 14 skipping, as validated by fluorescence reverse-transcriptase polymerase chain reaction with primers located in MET exons 13 and 15. As shown in Figure 2A, the amplicon amplified from ZORG cells migrated as expected to 128 base pair, as observed with cell lines known to harbor METex14 mutations (Hs746T and H596). The amplicons from MET wild-type cell lines (A549, PC9, and GTL16) migrated to 286 base pair. In addition, the dissociation temperature of the amplicon from ZORG cells (74.8°C) was in agreement with that of MET lacking exon 14. Finally, Western blotting revealed a lack of PTEN in ZORG cells (Fig. 2B).

MET expression and downstream signaling in ZORG cells stimulated or not by the MET ligand hepatocyte growth factor (HGF) were investigated by Western blotting. As illustrated in Figure 2C, unstimulated METex14 and ERK displayed no phosphorylation, whereas HGF stimulation induced MET phosphorylation and subsequent activation of ERK. In contrast, as an expected consequence of PTEN loss, AKT was activated by its ligand even in the absence of MET activation. Stimulation by HGF led to overactivation of the PI3K



pathway. All further experiments were performed under HGF supplementation.

The sensitivity of ZORG cells to MET TKIs was then analyzed in viability assays using methyl-thiazolyl-tetrazolium (MTT). Four MET TKIs (type I inhibitors crizotinib, capmatinib, and tepotinib and type II inhibitor foretinib) were tested at increasing doses. The viability of ZORG cells was practically unaffected by capmatinib or tepotinib at doses as high as 10 μ M. Crizotinib (a multitarget inhibitor of MET, ROS, and ALK) and foretinib displayed low viability-reducing activity on ZORG cells, with a half-maximal inhibitory concentration (IC_{50}) above 1 μ M after a 72-hour exposure to the drug. By comparison, all four TKIs reduced the viability of Hs746T cells, known to harbor both *METex14* mutation and amplification, with an IC_{50} below 0.1 μ M (Fig. 2D).

Investigation of signaling pathways by Western blotting revealed that all four MET TKIs inhibit MET phosphorylation in both ZORG and Hs746T cells. MET TKIs nearly abolished both AKT and ERK phosphorylation in Hs746T cells, but they had little effect in the ZORG cells (Fig. 2E). Overall, these results suggest that PTEN loss is associated with resistance to type I and type II MET TKIs in *METex14* cells through sustained activation of the PI3K pathway.

Inhibition of PI3K Restores Sensitivity to MET TKIs in *METex14* Cells Exhibiting PTEN Loss

To further establish the role of PI3K pathway alterations in resistance to MET TKIs, we tested whether PI3K inhibition might restore sensitivity of ZORG cells to MET TKIs. Proliferation of ZORG cells was unaffected by treatment with capmatinib, one of the most selective and potent MET TKIs,¹⁹ and was only slightly slowed down by GDC0941, a specific inhibitor of PI3K α and δ (Fig. 3A). When these two inhibitors were combined, however, proliferation of ZORG cells was significantly reduced ($p < 0.0001$). The same inhibitor combination had no effect on cell lines with no MET alteration, such as A549 (*KRAS* G12S mutation) ($p = 0.33$; NS) and PC9 (EGFR E746-A750 deletion) ($p = 0.79$; NS). For the ZORG cells, the IC_{50} for capmatinib shifted from over 10 μ M, when

the inhibitor was used alone, to 0.034 μ M, when it was used in combination with GDC0941 (1 μ M) (Fig. 3B).

Analysis of the downstream signaling pathway revealed that addition of capmatinib or GDC0941 alone only slightly reduced the phosphorylation levels of ERK and AKT, whereas combination of both inhibitors fully abolished AKT activation and drastically inhibited ERK activation (Fig. 3C). Overall, these results reveal that the ZORG cells, which display both a *METex14* mutation and PTEN loss, rely on both the PI3K and MET pathways for cell growth, and that combining a MET inhibitor with a PI3K inhibitor is required to achieve cell growth arrest.

Inhibition of PI3K Restores Sensitivity to MET TKIs in *METex14* Cells Displaying a PI3KCA Mutation

Given the action of the PI3K-MET inhibitor combination on *METex14* cells with concurrent PTEN loss, we investigated whether the same is true when PI3K activation is due to a *PIK3CA* mutation. For this, we used the lung adenocarcinoma cell line H596, known to harbor the activating E545K *PIK3CA* mutation along with a *METex14* mutation.

We first confirmed in a viability assay that H596 cells are resistant to crizotinib, as previously revealed,⁵ and to the MET TKIs capmatinib, tepotinib, and foretinib (Fig. 4A). We then studied the effect of MET and PI3K inhibitors, added alone or in combination, on cell growth. Like that of the ZORG cells, H596 cell proliferation was unaffected by capmatinib alone. It was slowed down in the presence of GDC0941 alone. In the presence of combination of both inhibitors, full cell growth arrest was achieved (Fig. 4B).

Signaling pathway analysis revealed only a slight effect of capmatinib on AKT and ERK activation. When the MET and PI3K inhibitors were combined, both phospho-AKT and phospho-ERK levels decreased markedly (Fig. 4C). For the H596 cells, the IC_{50} for capmatinib shifted from over 10 μ M, when the inhibitor was used alone, to 0.06 μ M, when it was used in combination with GDC0941 (Fig. 4D). Taken together, these results

Figure 1. Alterations in the phosphoinositide 3-kinases (PI3K) pathway are common in *METex14* NSCLC. (A) Baseline characteristics of and treatments received by the patients with an advanced *METex14* NSCLC. (B) Pie charts displaying the frequencies (%) of alterations of the examined genes in the cohort ($n = 65$) and phosphatase and tensin homolog (PTEN) expression within each tumor sample tested by immunohistochemistry ($n = 19$). (C) Left panel (PTEN negative) displays undetectable PTEN in cancer cells of tumor specimen from patient CHUL#11. Right panel (PTEN positive) displays expression of PTEN in cancer cells of tumor specimen from patient CHUL#15. Thin arrows indicate cancer cells, and large arrows indicate endothelial or immune cells (internal positive control). (D) Schematic presentation of patients based on the response to hepatocyte growth factor receptor (MET) tyrosine kinase inhibitor (TKI) treatment and to the presence or absence of a PI3K pathway alteration ($n = 17$). Del, deletion; indel, insertion-deletion; sub, substitution (E) Computed tomography scans of CHUL#11, revealing multiple lymph node metastases at baseline (upper left) and progression after 2 months of MET TKI treatment (upper right). Scans of CHUL#18, revealing emergence of bone metastases after 2 months of MET TKI treatment (middle right panel). Lower abdomen scans of CHUL#20, revealing lymph node metastases at baseline (lower left), which significantly increased after 1 month of MET TKI treatment (lower right panel).

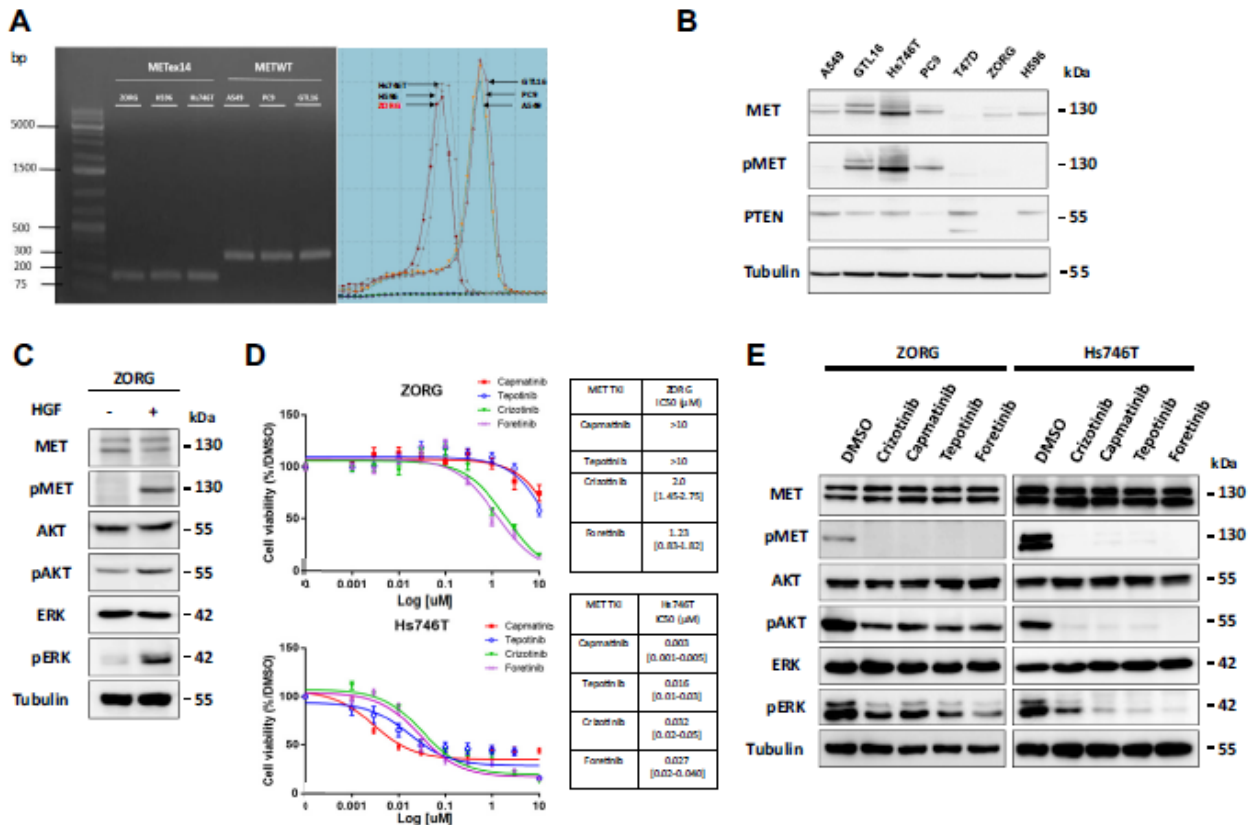


Figure 2. Patient CHUL#11-derived cell line with phosphatase and tensin homolog loss reveals sustained activation of the phosphoinositide 3-kinases (PI3K) pathway and resistance to hepatocyte growth factor receptor (MET) tyrosine kinase inhibitor (TKI). (A) Melting curve analysis of MET splicing isoforms and agarose gel electrophoresis of the amplicons generated by fluorescence reverse-transcription polymerase chain reaction. cDNA from cell lines expressing a characterized MET exon 14 skipping alteration (Hs746T, H596) or a wild-type MET (A549, PC9, GTL16) were used as controls. (B) Immunoblots for ZORG cells versus phosphatase and tensin homolog-expressing cell lines. Tubulin was used as a loading control. (C) ZORG cells were serum-starved for 24 hours and stimulated or not for 30 minutes with 50 ng/mL hepatocyte growth factor. Cells were harvested and subjected to Western blotting with the indicated antibodies. (D) The viability of ZORG cells in response to MET TKIs was assessed by methyl-thiazolyl-tetrazolium (MTT) assay after 72 hours of treatment. The sensitive Hs746T cell line was used as control. Results are presented as means \pm SEM of at least three independent experiments. (E) Serum-starved ZORG and Hs746T cells were treated for 30 minutes with each MET TKI or dimethylsulfoxide (DMSO) at 1 μ M in the presence of hepatocyte growth factor. Expression and activation of MET and its related signaling pathways were investigated by Western blotting. bp; base pair.

establish that the inhibition of both MET and PI3K is required to achieve full cell growth arrest and to suppress activation of the PI3K and MAPK pathways in *METex14* cells harboring a concurrent *PIK3CA* mutation.

METex14 Mutations Contribute to Resistance to PI3K Inhibition in *PIK3CA*-Mutated Cells

Because PI3K pathway alterations confer resistance to MET TKIs in *METex14* cells, we investigated whether *METex14* mutations might similarly confer resistance to a PI3K inhibitor in *PIK3CA*-mutated cells.

For this purpose, we chose the epithelial cell line T47D, harboring a H1047F-activating *PIK3CA* mutation and expressing low levels of endogenous MET. To

observe the specific effect of *METex14* on the biological responses of such cells, we created the T47DMETex14 cell line by stable transfection with a vector expressing a mutant MET (*METex14*, c. 2887_3028del).

First, we confirmed the presence of the exogenous *METex14* in the T47DMETex14 cells and its absence in the parental T47D cells (Supplementary Fig. 2A). We then evaluated the sensitivity of these cells to MET TKIs. We found both T47D and T47DMETex14 cells to be resistant to all tested MET TKIs (Supplementary Fig. 2B).

We further studied the effect of MET and PI3K inhibitors, alone and in combination, on cell proliferation. In T47D cells, we found GDC0941 alone to suppress cell growth. Adding capmatinib had no additional impact.

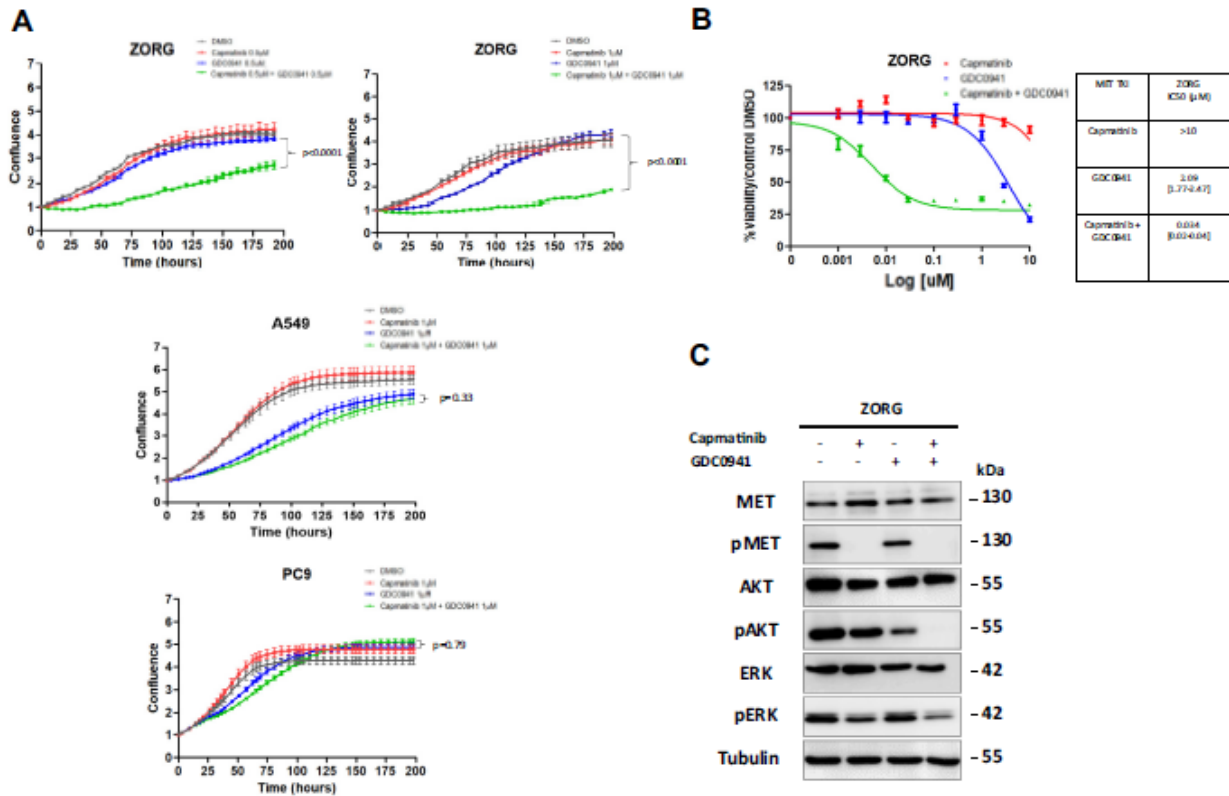


Figure 3. Phosphoinositide 3-kinases (PI3K) inhibition restores sensitivity to hepatocyte growth factor receptor (MET) tyrosine kinase inhibitors (TKIs) in ZORG, a *METex14* cell line with phosphatase and tensin homolog loss. (A) Proliferation of ZORG cells treated with a MET TKI (capmatinib) at 0.5 or 1 μM, a PI3Kα/δ inhibitor at 0.5 or 1 μM (GDC0941), or both (each at 0.5 or 1 μM) plus hepatocyte growth factor at 20 ng/ml. IncuCyte confluence measurements were performed every 4 hours for 196 hours. Results are presented as means ± SEM of three independent experiments. Statistical significance was calculated with the Wilcoxon test. (B) Dose-response curve of ZORG cells treated for 3 days with capmatinib, GDC0941, or both and assessed by methyl-thiazolyl-tetrazolium (MTT) assay. (C) ZORG cells were serum-starved for 24 hours and treated for 30 minutes with dimethylsulfoxide (DMSO), 1 μM capmatinib, 1 μM GDC0941, or capmatinib plus GDC0941 (at 1 μM each) and hepatocyte growth factor at 50 ng/mL. Western blot analyses with the indicated antibodies were performed on cell lysates. Tubulin was used as loading control.

Proliferation of these cells thus seems to depend strictly on the PI3K pathway (Fig. 5A). In contrast, treating T47DMETex14 cells with GDC0941 only slowed down cell growth. Capmatinib alone slightly increased cell growth. To achieve full cell growth arrest, combining GDC0941 with capmatinib was required. This suggests that proliferation of these cells relies on both the PI3K and MET pathways.

Analysis of the signaling pathways revealed that PI3K activation depends partly on MET activation in T47DMETex14 cells but not in T47D cells. ERK activation was found to depend strictly on MET activation. It proved necessary to combine MET and PI3K inhibitors to fully inhibit both AKT and ERK activation (Fig. 5B). For the T47DMETex14 cells, the IC₅₀ for capmatinib shifted from over 10 μM, when the inhibitor was used alone, to 0.007 μM, when it was used in combination with GDC0941 (Fig. 5C).

Taken together, these results reveal that *METex14* can induce MET addiction even in the presence of a concurrent oncogene mutation, such as a *PIK3CA* mutation, and that this leads to resistance to a MET or PI3K inhibitor used alone. Combined inhibition thus seems required in the case of concurrent alterations activating MET and a second signaling pathway.

Discussion

METex14 mutations define a new subgroup of patients with NSCLC who may benefit from targeted therapies against MET. Several MET TKIs have been found to have efficacy in ongoing clinical trials for patients with *METex14* NSCLC, with 32% to 67.9% ORR and a 7.3- to 10.8-month median progression-free survival.⁶⁻⁹ Yet, the observed ORR is lower than that for TKI treatment of EGFR-mutated or ALK-rearranged NSCLC, usually found to be 70% to 80%. Accordingly, the proportion of patients with *METex14*

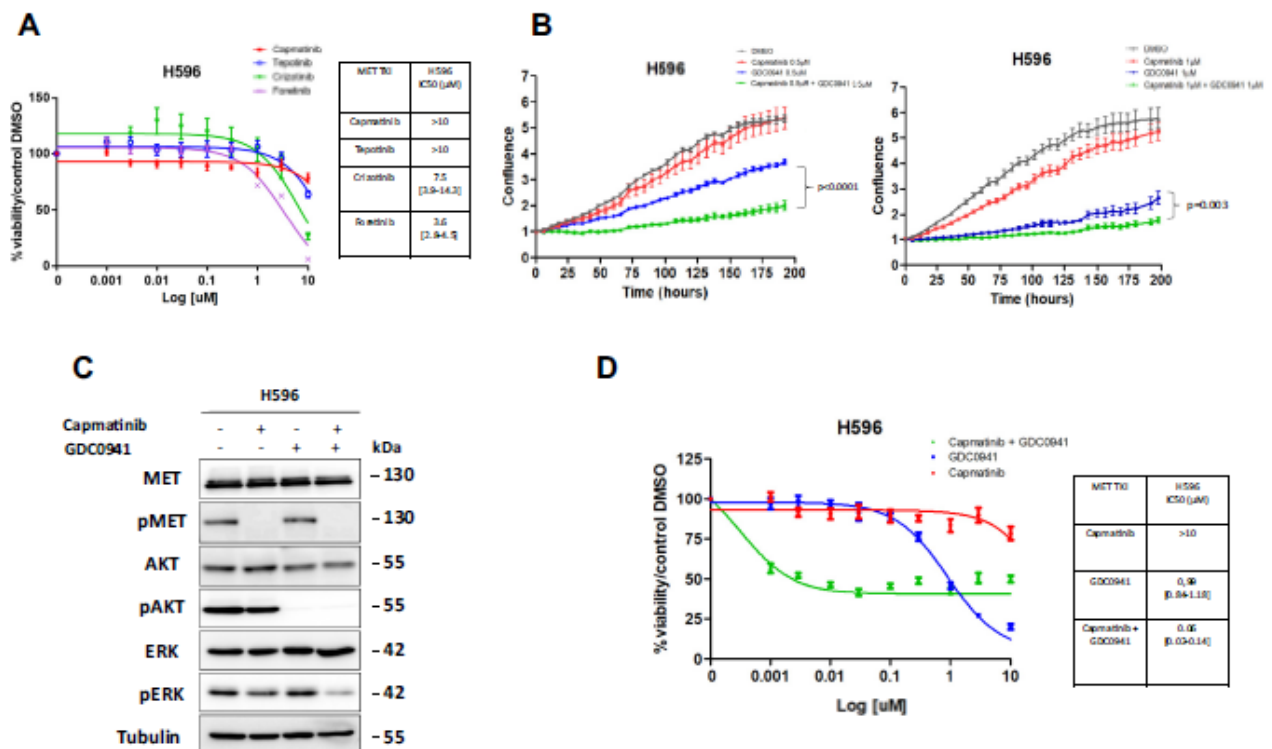


Figure 4. Inhibition of phosphoinositide 3-kinases (PI3K) restores sensitivity to a hepatocyte growth factor receptor (MET) tyrosine kinase inhibitor (TKI) in a *METex14* cell line with a *PIK3CA* mutation. (A) Viability curves of H596 cells treated with increasing doses of MET TKI. Viability was assessed by methyl-thiazolyl-tetrazolium (MTT) assay. IC₅₀ values were calculated with GraphPad Prism version 5.01, as the means of three independent experiments. (B) IncuCyte analysis of proliferation measured as confluence per well of H596 cells treated with dimethylsulfoxide (DMSO), capmatinib, GDC0941, or capmatinib plus GDC0941 (each at 0.5 or 1 µM) and hepatocyte growth factor at 20 ng/ml. Results are presented as means ± SEM of three independent experiments. Statistical significance was calculated with the Wilcoxon test. (C) MET expression and downstream signaling were investigated in H596 cell line by Western blotting. For 30 minutes before lysis, serum-starved cells were treated with each inhibitor alone and with both combined. (D) Dose-response curve of H596 cells treated for 3 days with capmatinib, GDC0941, or both and assessed by MTT assay.

NSCLC having progressive disease as best response to MET TKIs ranged up to 32%,⁶⁻⁹ suggesting that these cancers are not driven by MET-dependent mechanisms only.

Primary resistance of oncogene-addicted cancers to targeted therapies may have several causes, including concurrent genomic alterations.²⁰ In this study, based on a cohort of 65 patients with *METex14* NSCLC, we find that alterations in the PI3K pathway, including PTEN loss and *PIK3CA* mutations, are common and can be associated with resistance to MET TKIs. We confirm here, using a patient-derived cell line combining *METex14* mutation with PTEN loss, that PI3K pathway alterations confer resistance to type I and type II MET TKIs. Importantly, we found that adding a PI3K inhibitor to the treatment can restore the sensitivity of these cells to the MET TKI. Similar results are obtained with *METex14* cells harboring a concurrent *PIK3CA* mutation. Overall, our data suggest that alteration of the PI3K pathway is one of the main mechanisms of primary resistance to MET TKIs in *METex14* NSCLC.

The most common PI3K pathway alteration observed in our cohort was PTEN loss. PTEN loss has been reported in 8% to 42.4% of patients with NSCLC, but previous studies have included different populations and used various thresholds for PTEN expression (stained cells 0%,²¹ <10%,²² or <50% of all cancer cells²³). The frequency of PTEN loss in oncogene-addicted NSCLC is poorly known. PTEN mutations have been reported in 5% of EGFR-mutated NSCLC,²⁴ and homozygous deletion of PTEN has been reported in one of 24 patients with EGFR-mutated NSCLC.²⁵ The wide diversity of genetic and epigenetic alterations affecting PTEN makes it hard to get a comprehensive molecular profile of the *PTEN* gene. This explains why IHC has emerged as an attractive and reliable technique for detecting PTEN loss. Like Soria et al.,²¹ we have chosen to define PTEN loss as the total absence of PTEN expression (0% stained cells). Using this criterion, we found a 23% rate of PTEN loss. One should note that as IHC misses PTEN mutations leading to loss of function without loss of expression, the

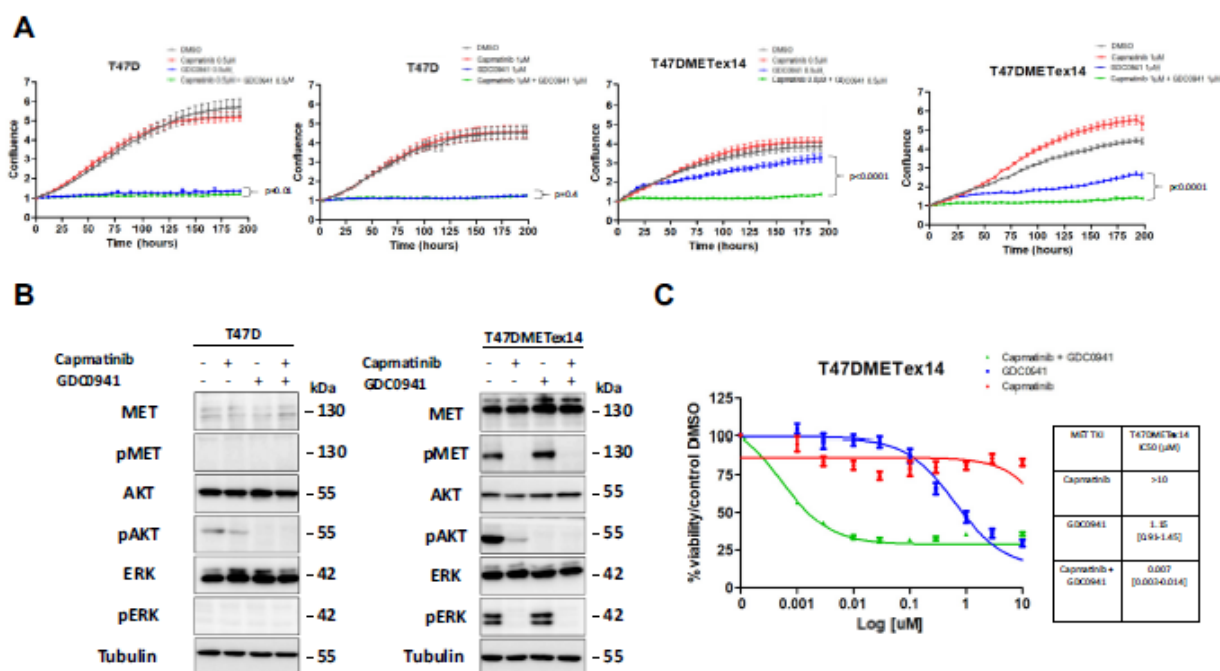


Figure 5. Phosphatidylinositol 3-kinase catalytic subunit alpha (*PIK3CA*) mutations contribute to hepatocyte growth factor receptor (MET) inhibitor resistance in *METex14* cells. (A) IncuCyte analysis of proliferation, measured as confluence per well, of T47D parental cells versus T47DMETex14 cells treated with imethylsulfoxide (DMSO), capmatinib, GDC0941, or capmatinib plus GDC0941 (at 0.5 or 1 μ M each) and hepatocyte growth factor at 20 ng/mL. Results are presented as means \pm SEM of three independent experiments. Statistical significance was calculated with the Wilcoxon test. (B) MET expression and downstream signaling were investigated in T47D and T47DMETex14 cell lines by Western blotting. For 30 minutes before lysis, serum-starved cells were treated with each inhibitor alone and with both combined. (C) Dose-response curve of T47DMETex14 cells treated for 3 days with capmatinib, GDC0941, or both and assessed by methyl-thiazolyl-tetrazolium (MTT) assay.

rate of true PTEN loss may be underestimated in our cohort. The functional consequences of PTEN loss on responses to TKIs in oncogene-addicted cancers are still largely unknown.²⁶ In patients with EGFR-mutated NSCLC, PTEN expression is associated with prolonged survival.²⁷ In *METex14* NSCLC, the impact of PTEN loss has never been addressed so far. Our results strongly suggest that PTEN loss contributes to resistance to MET TKIs in *METex14* cancer cells through sustained activation of the PI3K pathway.

PIK3CA mutations are found in 4% to 5% of NSCLCs¹¹⁻¹³ and can occur concurrently with other oncogenic drivers, such as EGFR and KRAS.²⁸ EGFR-mutated NSCLC is the only oncogene-addicted NSCLC in which the impact of *PIK3CA* mutations on responses to TKIs has been studied, and results remain controversial. Preclinical data suggest that the *PIK3CA* mutation E545K decreases sensitivity of EGFR-mutated cells to EGFR TKIs.²⁹ Moreover, *PIK3CA* mutations were initially proposed as an acquired mechanism of resistance to EGFR TKI in patients with EGFR-mutated NSCLC³⁰ and were recently found in 3% of patients showing disease progression after first-line osimertinib.³¹ Yet, recent

findings indicate that the *PIK3CA* mutation rate in patients with EGFR-mutated NSCLC is similar whether the patients have been treated with EGFR TKIs or not.³² This suggests a limited role of *PIK3CA* mutations in resistance to EGFR TKIs. For patients with EGFR-mutated NSCLC, Eng et al.³³ report worse overall survival in the presence than in the absence of a concurrent *PIK3CA* mutation, but these authors observed no significant difference in ORR or time to progression in patients on EGFR TKIs. Our present findings suggest that alterations in the PI3K pathway may be associated with resistance to MET TKIs, because all the patients with *METex14* NSCLC whose tumors harbored such an alteration displayed disease progression as best response on MET TKIs. The view that alterations of the PI3K pathway are involved in resistance to MET TKIs is further validated by our results obtained with cell lines, including a patient-derived cell line.

Besides the PI3K pathway alterations, other concurrent molecular alterations have been described in *METex14* NSCLC, including *KRAS* mutation and amplification, murine double minute 2 (*MDM2*) amplification, murine double minute 2 (*TP53*) mutation, and *EGFR*

mutation. Frampton et al.³⁴ and Awad et al.³ found a concurrent alteration in 100 of 114 (88%) and 26 of 28 (92%) *METex14* samples, respectively. This high frequency of concurrent molecular aberrations may reflect the higher rate of smokers and elderly among patients with *METex14* NSCLC than those with EGFR-mutated or ALK-rearranged NSCLC. Interestingly, concurrent alterations may also impair the response to MET TKIs. Recently, *KRAS* mutations were found in 4.4% of patients with *METex14* NSCLC, and most of these mutations were identified before any treatment with MET TKI.³⁵ Amplification of wild-type *KRAS* has also been described in patients with *METex14* NSCLC as a mechanism of primary and acquired resistance.^{35,36} Thus, extensive molecular profiling of *METex14* tumors seems important in identifying patients who may benefit from MET TKIs, and this profiling should include screening for PTEN loss and *PIK3CA* mutations.

We find here that a combination of MET and PI3K inhibitors can inhibit the proliferation of cells harboring a *METex14* mutation and a concurrent *PIK3CA* mutation or PTEN loss. As *PIK3CA* mutations and PTEN loss lead to activation of the PI3K pathway, these results suggest that PI3K pathway alterations cause resistance to MET TKIs. Interestingly, Bahcall et al.³⁶ have found that the same combination can inhibit tumor growth in *METex14* tumors with concurrent wild-type *KRAS* amplification. Taken together, these results strongly suggest that a combination of MET and PI3K inhibitors might overcome several mechanisms of resistance to MET TKIs in *METex14* NSCLC. So far, in the clinical setting, the use of panPI3K inhibitors, either alone or in combination, has been hindered by safety issues.³⁷ A phase I study evaluating a combination of capmatinib and buparlisib in adult patients with recurrent glioblastoma was discontinued because of poor tolerance.³⁸ Yet, more selective drugs have recently been developed and might offer a better safety profile with promising activity. This would pave the way for future combinations.

In conclusion, although *METex14* mutations are associated with efficacy of MET TKIs in a number of patients, concurrent alterations can frequently occur and may impair the response to MET inhibition. Our results suggest that the PI3K pathway alterations are common and should be screened to identify patients most likely to benefit from MET TKIs. Combining MET and PI3K inhibitors could overcome resistances owing to PI3K pathway alterations.

Acknowledgments

This work received French financial support from the Centre National de la Recherche Scientifique, the Institut Pasteur de Lille, the INSERM, the University of Lille, the

Cancéropôle Nord-Ouest, (n°54551) the Agence Nationale de la Recherche (ANR-17-CE17-0020-05), and the Groupe Pasteur Mutualité. The authors thank Laurence Stechly for assistance in the screening of tumor samples by next-generation sequencing. The authors thank the Microscopy-Imaging-Cytometry Facility of the Bio-Imaging Center Lille Nord-de-France for access to instruments and technical advice.

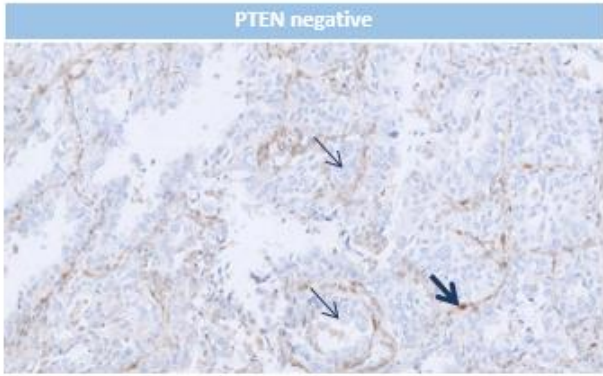
Supplementary Data

Note: To access the supplementary material accompanying this article, visit the online version of the *Journal of Thoracic Oncology* at www.jto.org and at <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2020.01.027>.

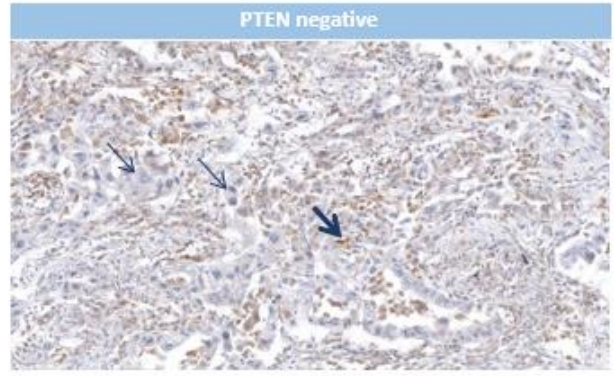
References

- Salgia R. MET in lung cancer: biomarker selection based on scientific rationale. *Mol Cancer Ther*. 2017;16:555-565.
- Descarpentries C, Leprêtre F, Escande F, et al. Optimization of routine testing for MET exon 14 splice site mutations in NSCLC patients. *J Thorac Oncol*. 2018;13:1873-1883.
- Awad MM, Oxnard GR, Jackman DM, 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*. 2016;34:721-730.
- Cortot AB, Kherrouche Z, Descarpentries C, et al. Exon 14 deleted MET receptor as a new biomarker and target in cancers. *J Natl Cancer Inst*. 2017;109:djw262.
- Liu X, Jia Y, Stoopler MB, et al. Next-generation sequencing of pulmonary sarcomatoid carcinoma reveals high frequency of actionable MET gene mutations. *J Clin Oncol*. 2016;34:794-802.
- Drilon A, Clark J, Weiss J, et al. OA12.02 updated anti-tumor activity of crizotinib in patients with MET exon 14-altered advanced non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol*. 2018;13(10 suppl):S348.
- Wolf J, Seto T, Han J-Y, et al. Results of the GEOMETRY mono-1 phase II study for evaluation of the MET inhibitor capmatinib (INC280) in patients (pts) with METΔex14 mutated advanced non-small cell lung cancer (NSCLC). *Ann Oncol*. 2018;29(suppl 8):viii741-viii742.
- Felip E, Horn L, Patel JD, et al. Tepotinib in patients with advanced non-small cell lung cancer (NSCLC) harboring MET exon 14-skipping mutations: phase II trial. *J Clin Oncol*. 2018;36(suppl 15):9016-9016.
- Moro-Sibilot D, Cozic N, Pérol M, et al. OA12.03 activity of crizotinib in MET or ROS1 positive (+) NSCLC: results of the AcSé trial. *J Thorac Oncol*. 2018;13(suppl):S348.
- Hervieu A, Kermorgant S. The role of PI3K in Met driven cancer: a recap. *Front Mol Biosci*. 2018;5:86.
- Yamamoto H, Shigematsu H, Nomura M, et al. PIK3CA mutations and copy number gains in human lung cancers. *Cancer Res*. 2008;68:6913-6921.
- Ludovini V, Bianconi F, Pistola L, et al. Phosphoinositide-3-kinase catalytic alpha and KRAS mutations are

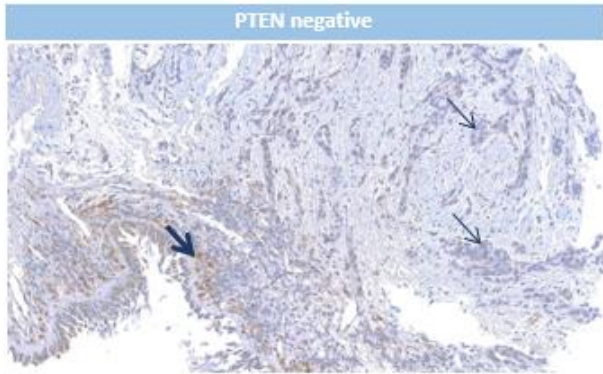
- important predictors of resistance to therapy with epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in patients with advanced non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol.* 2011;6:707-715.
13. Jing C, Mao X, Wang Z, et al. Next-generation sequencing-based detection of EGFR, KRAS, BRAF, NRAS, PIK3CA, Her-2 and TP53 mutations in patients with non-small cell lung cancer. *Mol Med Rep.* 2018;18:2191-2197.
 14. Malanga D, Scrima M, De Marco C, et al. Activating E17K mutation in the gene encoding the protein kinase AKT in a subset of squamous cell carcinoma of the lung. *Cell Cycle.* 2008;7:665-669.
 15. Do H, Solomon B, Mitchell PL, Fox SB, Dobrovic A. Detection of the transforming AKT1 mutation E17K in non-small cell lung cancer by high resolution melting. *BMC Res Notes.* 2008;1:14.
 16. Bleeker FE, Felicioni L, Buttitta F, et al. AKT1E17K in human solid tumours. *Oncogene.* 2008;27:5648-5650.
 17. Liu Q, Yu S, Zhao W, Qin S, Chu Q, Wu K. EGFR-TKIs resistance via EGFR-independent signaling pathways. *Mol Cancer.* 2018;17:53.
 18. Pons-Tostivint E, Thibault B, Guillermet-Guibert J. Targeting PI3K signaling in combination cancer therapy. *Trends Cancer.* 2017;3:454-469.
 19. Baltschukat S, Schacher Engstler B, Huang A, et al. Capmatinib (INC280) is active against models of non-small cell lung cancer and other cancer types with defined mechanisms of MET activation. *Clin Cancer Res.* 2019;25:3164-3175.
 20. Neel DS, Bivona TG. Resistance is futile: overcoming resistance to targeted therapies in lung adenocarcinoma. *NPJ Precis Oncol.* 2017;1:3.
 21. Soria JC, Lee HY, Lee JI, et al. Lack of PTEN expression in non-small cell lung cancer could be related to promoter methylation. *Clin Cancer Res.* 2002;8:1178-1184.
 22. Aisner DL, Sholl LM, Berry LD, et al. The impact of smoking and TP53 mutations in lung adenocarcinoma patients with targetable mutations—the Lung Cancer Mutation Consortium (LCMC2). *Clin Cancer Res.* 2018;24:1038-1047.
 23. Yoo SB, Xu X, Lee HJ, et al. Loss of PTEN expression is an independent poor prognostic factor in non-small cell lung cancer. *Korean J Pathol.* 2011;45:329-335.
 24. VanderLaan PA, Rangachari D, Mockus SM, et al. Mutations in TP53, PIK3CA, PTEN and other genes in EGFR mutated lung cancers: correlation with clinical outcomes. *Lung Cancer.* 2017;106:17-21.
 25. Sos ML, Koker M, Weir BA, et al. PTEN loss contributes to erlotinib resistance in EGFR-mutant lung cancer by activation of Akt and EGFR. *Cancer Res.* 2009;69:3256-3261.
 26. Takeda H, Takigawa N, Ohashi K, et al. Vandetanib is effective in EGFR-mutant lung cancer cells with PTEN deficiency. *Exp Cell Res.* 2013;319:417-423.
 27. Endoh H, Yatabe Y, Kosaka T, Kuwano H, Mitsudomi T. PTEN and PIK3CA expression is associated with prolonged survival after gefitinib treatment in EGFR-mutated lung cancer patients. *J Thorac Oncol.* 2006;1:629-634.
 28. Scheffler M, Bos M, Gardizi M, et al. PIK3CA mutations in non-small cell lung cancer (NSCLC): genetic heterogeneity, prognostic impact and incidence of prior malignancies. *Oncotarget.* 2015;6:1315-1326.
 29. Engelman JA, Mukohara T, Zejnullahu K, et al. Allelic dilution obscures detection of a biologically significant resistance mutation in EGFR-amplified lung cancer. *J Clin Invest.* 2006;116:2695-2706.
 30. Sequist LV, Waltman BA, Dias-Santagata D, et al. Genotypic and histological evolution of lung cancers acquiring resistance to EGFR inhibitors. *Sci Transl Med.* 2011;3:75ra26.
 31. Ramalingam SS, Cheng Y, Zhou C, et al. LBA50Mechanisms of acquired resistance to first-line osimertinib: preliminary data from the phase III FLAURA study. *Ann Oncol.* 2018;29(suppl 8):LBA50.
 32. Wu SG, Chang YL, Yu CJ, Yang PC, Shih JY. The role of PIK3CA mutations among lung adenocarcinoma patients with primary and acquired resistance to EGFR tyrosine kinase inhibition. *Sci Rep.* 2016;6:35249.
 33. Eng J, Woo KM, Sima CS, et al. Impact of concurrent PIK3CA mutations on response to EGFR tyrosine kinase inhibition in EGFR-mutant lung cancers and on prognosis in oncogene-driven lung adenocarcinomas. *J Thorac Oncol.* 2015;10:1713-1719.
 34. Frampton GM, Ali SM, Rosenzweig M, et al. Activation of MET via diverse exon 14 splicing alterations occurs in multiple tumor types and confers clinical sensitivity to MET inhibitors. *Cancer Discov.* 2015;5:850-859.
 35. Suzawa K, Offin M, Lu D, et al. Activation of KRAS mediates resistance to targeted therapy in MET exon 14 mutant non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2018;25:1248-1260.
 36. Bahcall M, Awad MM, Sholl LM, et al. Amplification of wild type KRAS imparts resistance to crizotinib in MET exon 14 mutant non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2018;24:5963-5976.
 37. Juric D, Rodon J, Tabernero J, et al. Phosphatidylinositol 3-kinase α -selective inhibition with alpelisib (BYL719) in PIK3CA-altered solid tumors: results from the first-in-human study. *J Clin Oncol.* 2018;36:1291-1299.
 38. van den Bent M, Azaro A, Vos F, et al. A phase Ib/II, open-label, multicenter study of INC280 (capmatinib) alone and in combination with buparlisib (BKM120) in adult patients with recurrent glioblastoma. *J Neurooncol.* 2020;146:79-89.



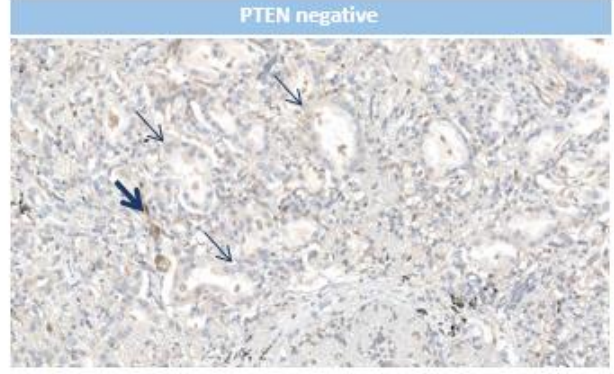
CHUL #9



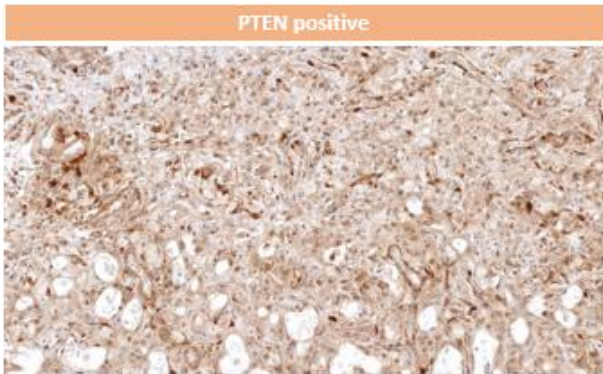
CHUL #14



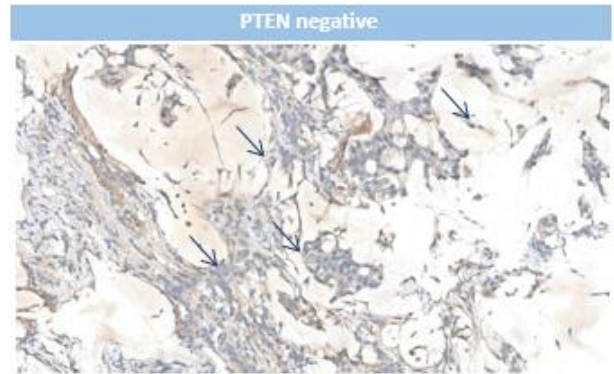
CHUL #18



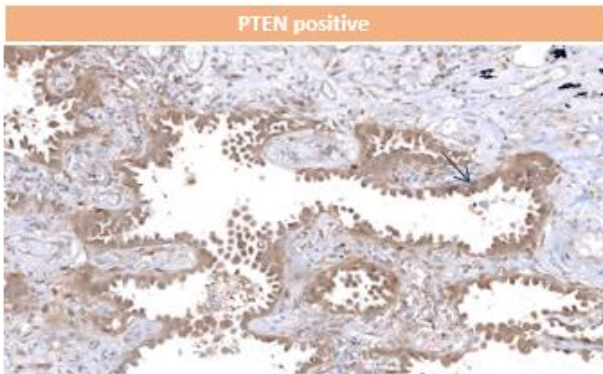
CHUL #54



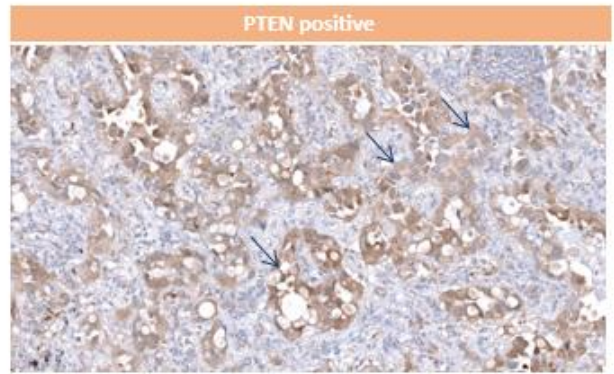
CHUL #7



CHUL #65



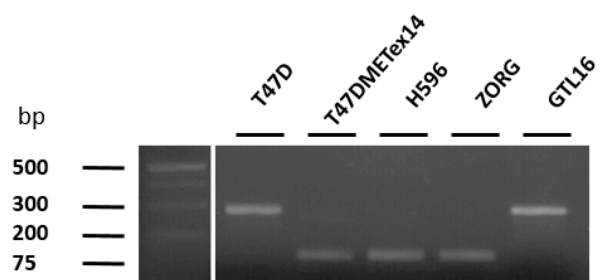
CHUL #31



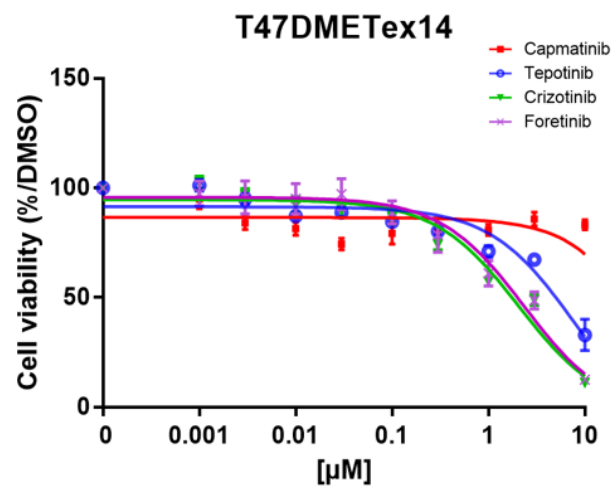
CHUL #33

Figure S2

A



B



MET TKI	T47DMETex14 IC50 (μM)
Capmatinib	>10
Tepotinib	7.6 [5.5-10]
Crizotinib	2.0 [1.59-2.67]
Foretinib	2.3 [1.51-3.68]

Table S1 Molecular characterization of the 65 NSCLC patients whose tumors harbored *METex14* mutations. Histological type was determined after hematin/eosin/safran staining. *METex14* mutations and other molecular alterations were diagnosed on FFPE tumor samples with the targeted CLAPv1 NGS Panel.. The PTEN expression status established by immunohistochemistry is indicated when determined.

Gene	Reference sequence	Exons analyzed
ACVR1	NM_001105.4	6-9
AKT1	NM_005163.2	3
ALK	NM_004304.4	22 23 24 25
BRAF	NM_004333.4	11 15
CTNNB1	NM_001904.3	3
EGFR	NM_005228.3	12 18 19 20 21
ERBB2	NM_004448.3	8 19 20 21
ERBB4	NM_005235.2	3
FGFR1	NM_023110.2	4 7 12 14
FGFR2	NM_000141.4	7 9 12 14
FGFR3	NM_000142.4	7 9 14 16 18
GNA11	NM_002067.4	4 5
GNAQ	NM_002072.4	4 5
GNAS	NM_000516.5	8
H3F3A	NM_002107.4	2
H3F3B	NM_005324.4	3
HIST1H3B	NM_003537.3	1
HIST1H3C	NM_003531	1
HRAS	NM_005343.2	2 3 4
IDH1	NM_005896.2	4
IDH2	NM_002168.3	4
KIT	NM_000222.2	8 9 11 13 14 17 18
KRAS	NM_033360.3	2 3 4
MAP2K1	NM_002755.3	2 3 6
MET	NM_001127500.1	2 14 15 16 17 18 19 20
NRAS	NM_002524.4	2 3 4
PDGFRA	NM_006206.4	12 14 18
PIK3CA	NM_006218.2	2 3 8 10 14 21
PTEN	NM_000314.6	1 3 5 6 7 8
PTPN11	NM_001330437.1	3 7 8
SMAD4	NM_005359.5	4 6 8 9 10 11 12 13
TP53	NM_000546.5	2 4 5 6 7 8 10

Table S2 Targeted NGS CLAPv1 panel genes.

Patient identification	PTEN expression	Topography
CHUL#1	Positive	Cytoplasmic and nuclear
CHUL#2	Positive	Cytoplasmic
CHUL#3	Positive	Nuclear and nucleolar
CHUL#7	Positive	Cytoplasmic and nuclear
CHUL#9	Negative	
CHUL#11	Negative	
CHUL#13	Positive	Cytoplasmic
CHUL#14	Negative	
CHUL#15	Positive	Cytoplasmic and nuclear
CHUL#18	Negative	
CHUL#31	Positive	Cytoplasmic and nuclear
CHUL#33	Positive	Cytoplasmic and nuclear
CHUL#34	Positive	Cytoplasmic
CHUL#35	Positive	Cytoplasmic
CHUL#38	Positive	Cytoplasmic and nucleolar
CHUL#40	Positive	Nucleolar
CHUL#43	Positive	Nucleolar
CHUL#44	Positive	Cytoplasmic
CHUL#47	Positive	Nucleolar
CHUL#48	Positive	Cytoplasmic and nuclear
CHUL#50	Positive	Cytoplasmic and nuclear
CHUL#54	Negative	
CHUL#55	Positive	Cytoplasmic and nucleolar
CHUL#56	Positive	Nucleolar
CHUL#57	Positive	Cytoplasmic, nucleolar and nuclear
CHUL#65	Negative	

Table S3 PTEN immunohistochemistry of patient tumor samples. The expression and distribution of PTEN expression were evaluated for 26 *METex14*-mutated NSCLC tumors.

Cell line	Site	Histology	Mutations
ZORG	Lung	Sarcomatoid carcinoma	<i>METex14</i> (c.3082+1G>T)/PTEN negative
H596	Lung	Adenocarcinoma	<i>METex14</i> (c.3251+1 G>T)/PIK3CA E544K
A549	Lung	Adenocarcinoma	KRAS G12S
PC9	Lung	Adenocarcinoma	EGFR E746-A750del
GTL16	Gastric	Adenocarcinoma	MET amplification
T47D	Breast	Ductal carcinoma	PIK3CA H1047F
Hs746T	Gastric	Adenocarcinoma	<i>METex14</i> (c.3082+1G>T)/MET amplification

Table S4 Cell lines characteristics. The site of derivation and histological subtype are indicated

Figure S1

PTEN negative panel indicate undetectable PTEN in FFPE sections from five patients; PTEN positive panel indicate expression of PTEN in tumor specimens from 1 representative *METex14* NSCLC patients.

Figure S2 (A) Agarose gel electrophoresis of amplicons generated by fluorescence reverse-transcription PCR. Amplicons from cell lines expressing a MET-exon-14-skipping alteration (T47DMETex14, H596, and ZORG) migrate to the expected position, corresponding to a size of 128 bp, whereas a wild-type MET amplicon (T47D or GTL16) migrates to 286 bp. **(B)** Viability curves of T47DMETex14 cells treated for three days with increasing doses of the MET TKI capmatinib, crizotinib, tepotinib, or foretinib before the MTT assay.

Response to capmatinib in a MET fusion-positive cholangiocarcinoma

Anthony Turpin¹, Clotilde Descarpentries², Valérie Grégoire³, Olivier Farchi², Alexis B Cortot^{4*}, Philippe Jamme^{5*}

1 Univ. Lille, CNRS, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, UMR9020 - UMR-S 1277 - Canther - Cancer Heterogeneity, Plasticity and Resistance to Therapies, Lille, France; Medical Oncology Department, CHU Lille, University of Lille, Lille, France.

2 Univ. Lille, CNRS, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, UMR9020 - UMR-S 1277 - Canther - Cancer Heterogeneity, Plasticity and Resistance to Therapies, Lille, France; Department of Biochemistry and Molecular Biology, Hormonology Metabolism Nutrition Oncology, CHU Lille, University of Lille, Lille, France.

3 Univ. Lille, CHU Lille, Pathology department, Lille, France.

4 Univ. Lille, CNRS, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, UMR9020 - UMR-S 1277 - Canther - Cancer Heterogeneity, Plasticity and Resistance to Therapies, Lille, France; Thoracic Oncology Department, CHU Lille, University of Lille, Lille, France.

5 Univ. Lille, CNRS, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, UMR9020 - UMR-S 1277 - Canther - Cancer Heterogeneity, Plasticity and Resistance to Therapies, Lille, France; Dermatology Department, CHU Lille, University of Lille, Lille, France.

Introduction

Cholangiocarcinoma is the second most common liver cancer after hepatocellular carcinoma. In case of metastatic or unresectable disease, the recommended first-line treatment is platinum-based chemotherapy. There is no standard treatment for further lines. The prognosis remains poor with a median survival of less than 12 months (1). Several targeted therapies are currently being evaluated including FGFR, IDH1, PARP, ROS1, ALK and BRAF inhibitors (2). MET inhibitors have also been tested in cholangiocarcinoma. Cabozantinib, a non-specific MET tyrosine kinase inhibitor (TKI), was evaluated as a single agent in a phase 2 trial in patients with chemotherapy-refractory cholangiocarcinoma, but showed poor efficacy (median PFS 1.7 months, median OS 5.2 month (3). Tivantinib, another non-specific MET TKI, was evaluated in a phase I trial in combination with gemcitabine in patients with solid tumor. Eight patients with cholangiocarcinoma were included and one partial response was observed (4). These disappointing results may be due to the lack of specificity of these MET TKIs on the one hand, and the absence of any biomarker-based selection of patients on the other hand.

Here, we present the case of a patient with chemotherapy-refractory metastatic cholangiocarcinoma harboring a CAPZA-2-MET fusion along with MET amplification who dramatically responded to capmatinib, a specific MET TKI.

Case presentation

In January 2019, a 49 years old male with no medical history was diagnosed with stage IV intrahepatic cholangiocarcinoma which was revealed by painful osteolytic metastases. MRI showed typical features of intrahepatic cholangiocarcinoma. He received radiation therapy on main bone metastases and a first-line chemotherapy cisplatin and gemcitabine (Gemcis protocol) which yielded an objective response that lasted 6 months. He then received a second-line chemotherapy with mFOLFOX but had disease progression at first radiological assessment.

A liver rebiopsy was performed to obtain tissue for molecular analysis. A comprehensive molecular analysis was performed using the OncoPrint Comprehensive Assay (OCA V3) which revealed a fusion between exon 1 of CAPZA2

and exon 6 of MET (Figure1). The CAPZA2-MET fusion was predicted to lead to a chimeric protein with an intact MET kinase domain. Molecular analysis also detected a TP53 mutation (c.991C>T) and a RB1 mutation (c.[2087G>C;2099T>C]). FISH analysis revealed an elevated MET gene copy number (GCN) of 6.3, with a low ratio of GCN between MET and centromere of chromosome 7 of 2.1. IHC analysis revealed a high MET expression (100%).

Following multidisciplinary discussion in a molecular tumor board, and taking into account the lack of any approved alternative treatment and the efficacy of MET TKIs in cancer patients harboring a MET fusion, it was decided to propose the patient for a compassionate use of capmatinib.

Treatment with capmatinib (400 mg bid) was started on January 2020 in the context of an expanded access program. The first radiological assessment performed 2 months later showed a partial response (-36%) (Figure 2). Tolerance was good. However, the following radiological assessment performed 4 months after starting capmatinib showed progression of the primary tumor with stable bone lesions. Radiation therapy on the primary tumor was performed. Capmatinib was withdrawn during radiation therapy and then resumed. At the same time, a new liver biopsy and a circulating free DNA analysis were performed. Analysis of the tumor biopsy did not reveal the MET fusion anymore, but the TP53 and RB1 mutations were still detected. Circulating free DNA revealed the presence of TP53 and RB1 mutations and an additional MET domain kinase mutation D1228N. A new CT scan performed 2 months after the end of radiation therapy showed stable disease.

Discussion

Here we describe for the first time a case of response to MET TKI in a cholangiocarcinoma patient with a CAPZA-2-MET fusion.

MET alterations are rare in cholangiocarcinoma. *MET* amplifications and mutations are found in 2% and 0.7% of all cases, respectively (5,6). *MET* fusion-positive cholangiocarcinoma has been described only once in a 41-year-old patient with a EHBP1-MET fusion (7). Clinical studies evaluating MET inhibitors have failed so far. However, none of these studies has selected patients according to their molecular

status. However, MET alterations have been associated with efficacy of MET TKI in other types of cancer. In non small cell lung cancer (NSCLC), MET mutations affecting the splice sites of exon 14 are predictive of efficacy of capmatinib or tepotinib, two new-generation specific MET TKIs (Paik et al. NEJM 2020; Wolf et al. NEJM 2020). MET amplifications have also been found to predict efficacy of capmatinib in NSCLC, only in case of high-level amplification (GCN ≥ 10). In the present case, although GCN was increased, the ratio between MET and CEP7 was only 2.1, indicating a low-level of MET amplification. Such levels of MET amplification are usually associated with the presence of other oncogenic driver mutations and are not predictive of activity of MET inhibitors, suggesting that this amplification had no role in the response to capmatinib in the present case (Noonan et al. JTO 2016; Wolf et al. NEJM 2020).

MET fusions have been described at a low frequency in various cancers such as NSCLC, glioma, melanoma, colorectal cancer, and hepatocellular carcinoma. To date, more than ten MET fusion partners have been identified. The most frequent *fusion gene* partners described are HLA-DRB1 (HLA class II histocompatibility antigen, DRB1 beta chain), CAPZA2 (F-actin-capping protein subunit alpha-2) and KIF5B (Kinesin-1 heavy chain). Clinical cases have reported clinical activity of MET TKI in MET fusion-positive tumors (8).

We have identified two potential mechanisms of resistance in this patient. First, we found the emergence of a MET D1228N kinase domain mutation on circulating free DNA. MET kinase mutations have already been described as a potential mechanism of resistance to MET TKIs in MET-driven cancers. Preclinical data have demonstrated a variable sensitivity to MET TKI according to the type of MET kinase mutation (9). The D1228X mutations are predicted to be resistant to Type I MET TKIs but sensitive to Type II MET TKIs. However, clinical data are still sparse which prevented us to use a type II TKI in this patient(9).

The second potential mechanism of resistance in this patient was the loss of MET fusion based on the biopsy performed at progression. Loss of the fusion has been previously proposed as a mechanism of resistance to targeted therapies but has never been reported with MET fusions. In this patient, MET fusion was initially detected at a

low frequency and was not detected at progression anymore, suggesting that the fusion could be present as a sub-clonal variant. This hypothesis could explain the short response observed on capmatinib.

Finally, we did not observe any adverse due to capmatinib in this patient, apart from a grade I asthenia. Contrary to multikinase inhibitors, capmatinib is usually well tolerated. The most common adverse events reported in METex14 NSCLC patients treated with capmatinib were peripheral edema, nausea, and vomiting. However, these patients were mostly elderly and had comorbidities, which may explain why tolerance was better in this patient.

Overall, these results support molecular testing in cholangiocarcinoma patients, as recently recommended (10). The low rate of MET alterations in this setting could justify a basket clinical trial.

References

1. Valle J, Wasan H, Palmer DH, Cunningham D, Anthony A, Maraveyas A, et al. Cisplatin plus Gemcitabine versus Gemcitabine for Biliary Tract Cancer. *N Engl J Med* [Internet]. 2010 Apr 8 [cited 2020 Sep 10];362(14):1273–81. Available from: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa0908721>
2. Rizvi S, Khan SA, Hallemeier CL, Kelley RK, Gores GJ. Cholangiocarcinoma-evolving concepts and therapeutic strategies [Internet]. Vol. 15, *Nature Reviews Clinical Oncology*. Nature Publishing Group; 2018 [cited 2020 Sep 10]. p. 95–111. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28994423/>
3. Goyal L, Yurgelun MB, Abrams TA, Kwak EL, Cleary JM, Knowles M, et al. A phase II trial of cabozantinib (XL-184) in patients with advanced cholangiocarcinoma. *J Clin Oncol*. 2015 Jan 20;33(3_suppl):800–800.
4. Pant S, Saleh M, Bendell J, Infante JR, Jones S, Kurkjian CD, et al. A phase I dose escalation study of oral c-MET inhibitor tivantinib (ARQ 197) in combination with gemcitabine in patients with solid tumors. *Ann Oncol* [Internet]. 2014 [cited 2020 Sep 10];25(7):1416–21. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24737778/>

5. Pellino A, Loupakis F, Cadamuro M, Dadduzio V, Fassan M, Guido M, et al. Precision medicine in cholangiocarcinoma [Internet]. Vol. 3, Translational Gastroenterology and Hepatology. AME Publishing Company; 2018 [cited 2020 Sep 10]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30148225/>
6. Simile MM, Bagella P, Vidili G, Spanu A, Manetti R, Seddaiu MA, et al. Targeted therapies in cholangiocarcinoma: Emerging evidence from clinical trials [Internet]. Vol. 55, Medicina (Lithuania). MDPI AG; 2019 [cited 2020 Sep 10]. Available from: </pmc/articles/PMC6409688/?report=abstract>
7. Yu Y, Liu Q, Li W, Qu Y, Zhang Y, Liu T. Identification of a novel EHBP1-MET fusion in an intrahepatic cholangiocarcinoma responding to crizotinib . Oncologist [Internet]. 2020 Sep 8 [cited 2020 Oct 21]; Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32897609/>
8. Plenker D, Bertrand M, de Langen AJ, Riedel R, Lorenz C, Scheel AH, et al. Structural alterations of MET trigger response to MET kinase inhibition in lung adenocarcinoma patients. Clin Cancer Res [Internet]. 2018 Mar 15 [cited 2020 Sep 10];24(6):1337–43. Available from: <http://clincancerres.aacrjournals.org/>
9. Fujino T, Kobayashi Y, Suda K, Koga T, Nishino M, Ohara S, et al. Sensitivity and Resistance of MET Exon 14 Mutations in Lung Cancer to Eight MET Tyrosine Kinase Inhibitors In Vitro. J Thorac Oncol [Internet]. 2019 Oct [cited 2019 Oct 11];14(10):1753–65. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1556086419305519>
10. Mosele F, Remon J, Mateo J, Westphalen CB, Barlesi F, Lolkema MP, et al. Recommendations for the use of next-generation sequencing (NGS) for patients with metastatic cancers: a report from the ESMO Precision Medicine Working Group. Vol. 31, Annals of Oncology. Elsevier Ltd; 2020. p. 1491–505.

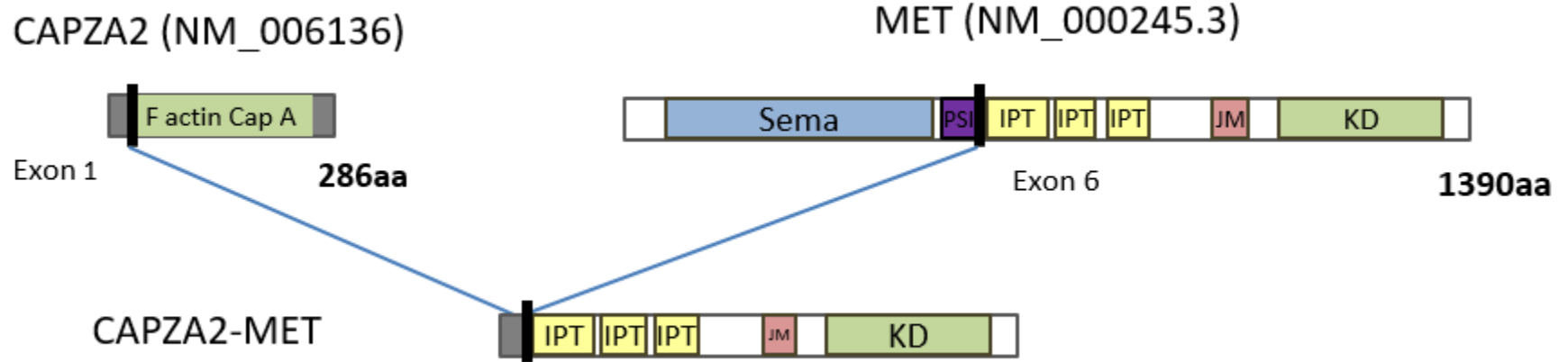


Figure 1: Schematic representation of CAPZA2- MET fusion.

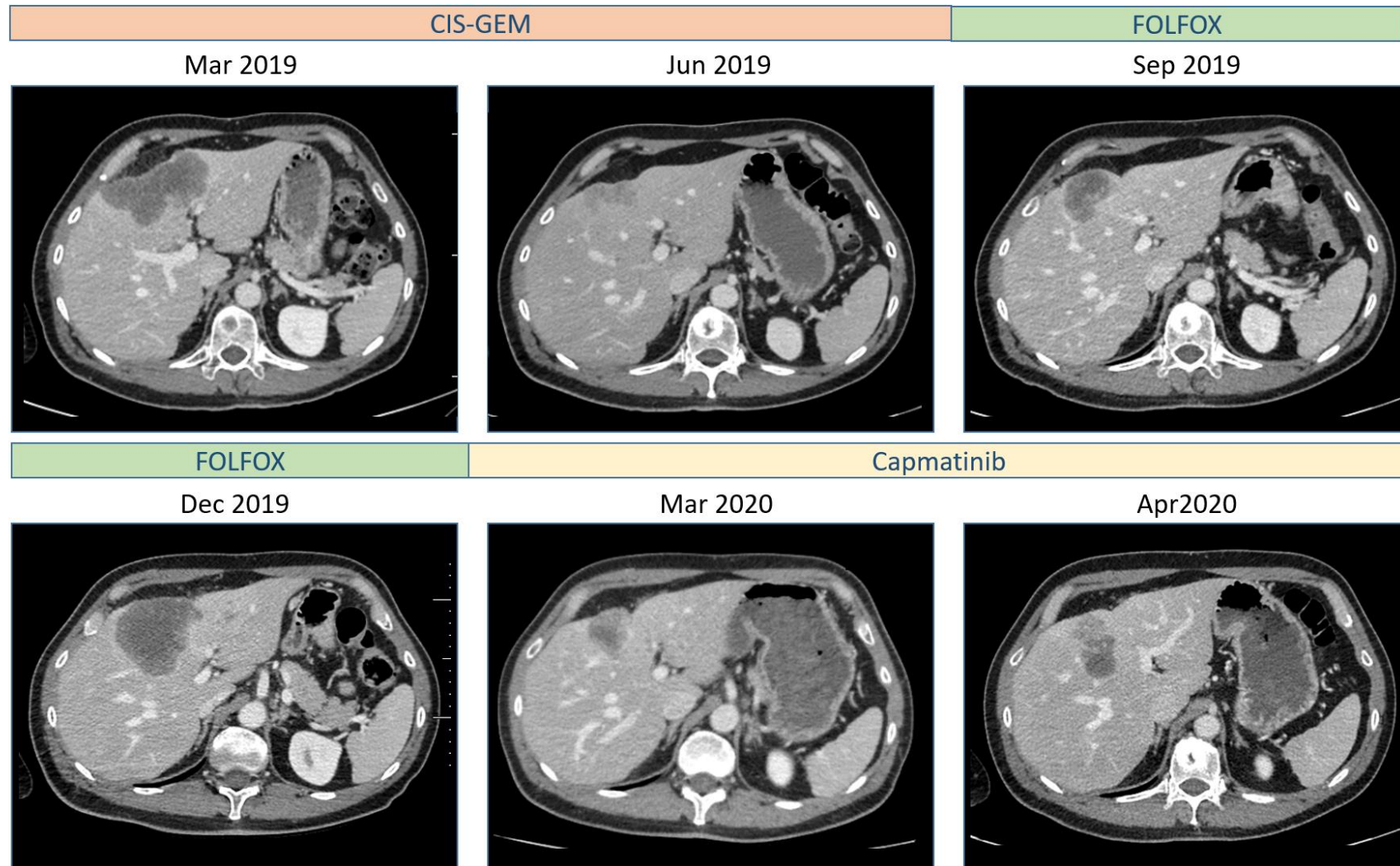


Figure 2: Computed tomography (CT) scan of the abdomen/pelvis performed between March 2019 and April 2020.



Relevance of Detection of Mechanisms of Resistance to ALK Inhibitors in ALK-Rearranged NSCLC in Routine Practice

Philippe Jamme,^{1,2} Clotilde Descarpentries,³ Radj Gervais,⁴ Eric Dansin,⁵ Marie Wislez,⁶ Valérie Grégoire,⁷ Nicolas Richard,⁸ Simon Baldacci,¹ Nathalie Rabbe,⁶ Maeva Kyheng,⁹ Zoulika Kherrouche,² Fabienne Escande,³ Marie Christine Copin,^{2,7} Alexis B. Cortot^{1,2}

Abstract

Anaplastic lymphoma kinase (ALK) mutations are responsible for resistance to ALK tyrosine kinase inhibitors (TKIs) in ALK-rearranged non–small-cell lung cancer but their frequency and relevance has not been assessed in routine practice. In this retrospective multicenter study, the ALK mutation rate was 15% and 33% after failure of treatment with 1 and 2 TKIs, respectively. Most of the patients harboring an ALK mutation achieved an objective response with subsequent ALK TKI treatment.

Background: Anaplastic lymphoma kinase (ALK) tyrosine kinase inhibitors (TKIs) have shown efficacy in the treatment of ALK-rearranged non–small-cell lung cancer (NSCLC), but the disease eventually progresses in all patients. In many cases, resistance to ALK TKIs arises through *ALK* mutations. Although clinical and biological data suggest variations in TKI efficacy according to the mechanism of resistance, *ALK* mutations are still rarely investigated in routine practice. **Materials and Methods:** We performed a retrospective multicentric study with an aim to determine the frequency and clinical relevance of ALK alterations detected using targeted next-generation sequencing in patients with advanced ALK-rearranged NSCLC after progression during an ALK TKI treatment. Data on clinical, pathological, and molecular characteristics and patient outcomes were collected. **Results:** We identified 23 patients with advanced ALK-rearranged NSCLC who, between January 2012 and May 2017, had undergone at least 1 repeat biopsy at progression during an ALK TKI treatment. A resistance mechanism was identified in 9 of the 23 patients (39%). The anomalies involved included 9 *ALK* mutations in 8 patients and one *ALK* amplification. The *ALK* mutation rate was 15% after failure of a first ALK TKI and 33% after failure of 2 ALK TKI treatments. Five of 7 patients who received a different ALK TKI after detection of an *ALK* mutation achieved an objective response. All of the patients who received a TKI presumed to act on the detected ALK mutant achieved disease control. **Conclusion:** Targeted next-generation sequencing is suitable for detecting ALK resistance mutations in ALK-rearranged NSCLC patients in routine practice. It might help select the best treatment at the time of disease progression during treatment with an ALK TKI.

Clinical Lung Cancer, Vol. 20, No. 4, 297-304 © 2019 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Anaplastic lymphoma kinase, Lung neoplasm, Mutation, Real-world evidence, Resistance

¹Thoracic Oncology Department, Univ. Lille CHU Lille, Lille, France
²UMR 8161 M3T Mechanisms of Tumorigenesis and Targeted Therapies, Univ. Lille CNRS Institut Pasteur de Lille, Lille, France
³Oncology and Molecular Genetics-Laboratory Division of Biochemistry and Molecular Biology, CHU Lille Univ. Lille, Lille, France
⁴Thoracic Oncology Department, Centre François Badesse, Caen, France
⁵Head and Neck and Thoracic Cancers Department, Centre Oscar Lambret, Lille, France
⁶Service de Pneumologie, AP-HP Hôpital Tenon Sorbonne Université- UPMC Univ Paris 06 -GRC n°04 Therasocan, Paris, France
⁷Institut de Pathologie, Univ. Lille CHU Lille, Lille, France

⁸Department of Genetics-Molecular Genetics Laboratory UNICAEN EA7450 Bio-TARGen, Caen Normandy University CHU de Caen, Caen, France
⁹EA 2694 Santé publique: épidémiologie et qualité des soins, Univ. Lille CHU Lille, Lille, France

Submitted: Sep 5, 2018; Revised: Jan 2, 2019; Accepted: Feb 16, 2019; Epub: Feb 26, 2019

Address for correspondence: Alexis B. Cortot, MD, PhD, Hôpital Calmette, CHRU Lille, Boulevard du Professeur Lederaq, 59037 Lille, France
 Fax: +33 3 20 44 56 111; e-mail contact: alexis.cortot@chru-lille.fr

Resistance to ALK Inhibitors in Routine Practice

Introduction

Anaplastic lymphoma kinase (*ALK*) rearrangements are found in approximately 4% of nonsquamous non-small-cell lung cancer (NSCLC).¹ The fusion protein resulting from *ALK* rearrangements has a constitutively activated *ALK* kinase leading to activation of downstream signaling pathways involved in cell proliferation and cell survival.^{2,3} The discovery of *ALK* rearrangements has led to the development of tyrosine kinase inhibitors (TKIs) targeting the *ALK* kinase. Crizotinib and ceritinib have shown superiority over chemotherapy in untreated advanced *ALK*-rearranged NSCLC patients, and alectinib has shown superiority over crizotinib in the same context.⁴⁻⁶ Several TKIs have proved active after failure of crizotinib treatment, including ceritinib, alectinib, brigatinib, and lorlatinib.⁷⁻¹⁰

Mechanisms of resistance to *ALK* TKIs in *ALK*-rearranged NSCLC patients are partly known and are of 2 main types: (1) on-target mechanisms, including mutation of the *ALK* kinase domain and amplification of the *ALK*-rearranged gene; and (2) off-target mechanisms, including activation of an alternative signaling pathway such as epidermal growth factor receptor (*EGFR*) or stem cell growth factor receptor (*SCFR/KIT*) and pathological transformation.¹¹

Anaplastic lymphoma kinase mutations are the main cause of resistance to *ALK* TKIs. With high-throughput methods of detection,¹¹ they are found in 20% to 50% of tumor samples obtained at the time of progression during treatment with an *ALK* TKI. Numerous *ALK* kinase mutations can confer resistance to *ALK* TKIs in *ALK*-rearranged NSCLC,¹²⁻¹⁹ and the frequency and type of *ALK* mutations detected at the time of progression depend on the type of *ALK* TKI received.¹¹ Thus, each *ALK* TKI has its own spectrum of activity against *ALK* kinase mutants,²⁰ and a given *ALK* kinase mutant is not resistant to all *ALK* TKIs. For example, the L1196M mutation is reported to confer resistance only to crizotinib, the C1156Y mutation is associated with resistance to crizotinib and ceritinib but remains sensitive to alectinib and brigatinib, and the G1202R mutation leads to resistance to most *ALK* TKIs but not to lorlatinib.²¹⁻²⁴

Thus, identifying the mechanism of resistance to an *ALK* TKI might help in choosing the most appropriate treatment after disease progression during treatment with that *ALK* TKI, particularly because several *ALK* inhibitors are now available for use in this context. Herein we show that targeted next-generation sequencing (NGS) performed in routine practice is suitable and relevant for detecting *ALK* mutations in tumor tissue samples or circulating tumor DNA from *ALK*-positive NSCLC patients whose disease has progressed after treatment with an *ALK* TKI.

Materials and Methods

Study Design and Patients

In this observational, multicentric, retrospective study, we identified patients with advanced *ALK*-positive NSCLC from whom tumor samples had been obtained at the time of disease progression during treatment with an *ALK* TKI as part of the routine procedure. Tissue biopsies and circulating tumor DNA samples were considered. Clinical and molecular data were collected retrospectively at each center. The investigators used Response Evaluation Criteria In Solid Tumors 1.1 to evaluate responses to *ALK* TKIs. The objective

response rate was defined as the rate of complete or partial response. The disease control rate was defined as the rate of complete or partial response or stable disease. Overall survival was calculated from the start of the first *ALK* TKI treatment received.

All of the data reported in this study were extracted from a database approved by the French National Data Protection Authority. This noninterventional study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and Good Clinical Practice guidelines. It was approved by a national ethics committee and by the French Advisory Committee on Information Processing Related to Research in the Field of Health. All included patients received information from their referring physician.

Detection of *ALK* Mutations

Targeted NGS analysis was conducted using the NGS commercial panel "Ion AmpliSeq Colon and Lung Research Panel V2" (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) at 2 molecular centers certified by the French National Cancer Institute. In the case of tissue samples, genomic DNA was extracted from formalin-fixed paraffin embedded (FFPE) samples received in the 2 laboratories between February 2012 and February 2017. DNA was extracted using the QIAamp FFPE tissue kit (Qiagen, Duesseldorf, Germany) according to the manufacturer's instructions. In the case of blood samples, cell-free DNA was extracted from plasma with the QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. Extracted DNA was quantified with the Quant-it PicoGreen dsDNA Assay Kit (ThermoFisher Scientific) using a Xenius XCSpectrofluorometer (Safas Monaco, Monaco). AmpliSeq libraries were prepared with the Ion AmpliSeq Library Kit 2.0 Ion Xpress barcode adapters kit, primers (Ion AmpliSeq custom panel or Colon and Lung V2; ThermoFisher Scientific), and 10 ng or less of each DNA sample according to the manufacturer's instructions (see Supplemental Table 1 in the online version). Emulsion polymerase chain reaction, enrichment, and chip loading were performed using an Ion Chef instrument with the Ion PI Hi-Q Chef Kit or the Ion 540 Chef Kit (ThermoFisher Scientific). Samples were sequenced with Ion PI chips using an Ion Proton System or Ion 540 chips on the Ion S5XL system (ThermoFisher Scientific). Data were analyzed using the Torrent suite software version 5.2.2 (ThermoFisher Scientific). For the *ALK*, *EGFR*, and Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog (*KRAS*) genes, manual inspection of sequences was done using an integrative genomic viewer.

Statistical Analysis

Quantitative variables are expressed as mean (SD) in the case of a normal distribution or as median (interquartile range) otherwise. Categorical variables are expressed as numbers (percentages). The normality of distributions was assessed using histograms and the Shapiro-Wilk test. Survival rates were calculated from the date of introduction of the first *ALK* TKI until the date of death or last news and derived from Kaplan-Meier survival curves. Medians of survival were calculated with confidence intervals. Statistical testing was conducted at a 2-tailed α level of .05. Data were analyzed using SAS software version 9.4 (SAS Institute, Cary, NC).

Results

The study included 23 patients with advanced *ALK*-positive NSCLC who had undergone at least 1 biopsy at the time of disease

Table 1 Baseline Characteristics (n = 23)	
Characteristic	Value
Median Age (Range), Years	57 (17-70)
Sex, n (%)	
Male	12 (52)
Female	11 (48)
Adenocarcinoma, n (%)	23 (100)
Stage at Diagnosis, n (%)	
III	2 (9)
IV	21 (91)
Never Smoker, n (%)	19 (83)
Number of Lines of Treatment Before First ALK TKI, n (%)	
0	7 (30)
1	13 (57)
2 or more	3 (13)
Type of ALK TKI Received, n (%)	
First generation	22 (96)
Second generation	17 (74)
Third generation	3 (13)

Abbreviations: ALK = anaplastic lymphoma kinase; TKI = tyrosine kinase inhibitor.

progression during treatment with an ALK TKI between January 2012 and May 2017 (Table 1). The patients were mostly never smokers (n = 19; 83%) and the median age was 57.0 years (range, 17-70 years). Sixteen patients (n = 16; 70%) had received platinum-based chemotherapy before ALK TKI treatment. Twenty-two patients (n = 22; 96%) had received crizotinib as the first ALK TKI. A second-generation ALK TKI (alectinib, ceritinib, or brigatinib) had been given to 1 patient (4%) as first-line treatment and to 17 patients (74%)

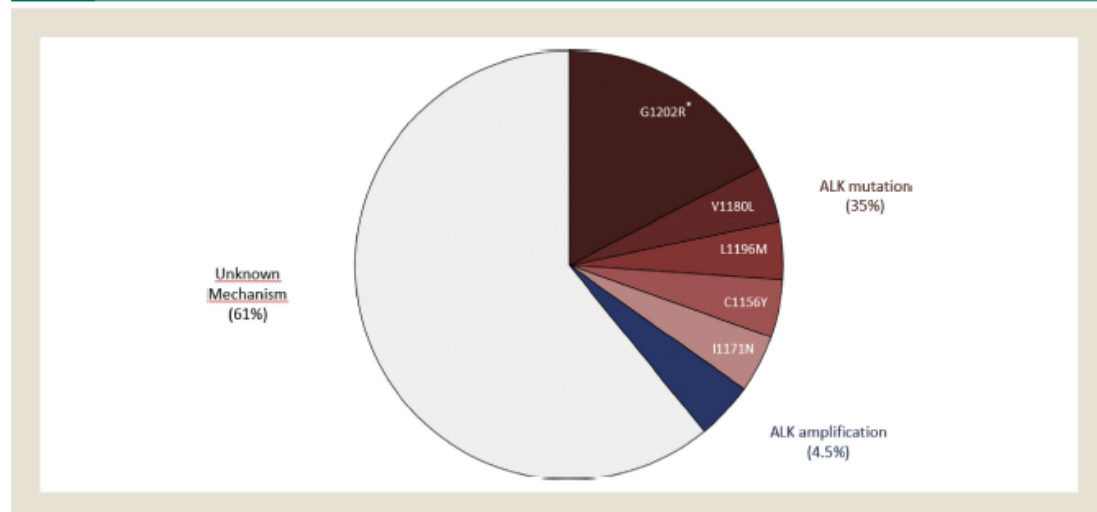
after failure of crizotinib treatment. Three patients who had first received crizotinib and then a second-generation ALK TKI had subsequently received a third-generation ALK TKI (lorlatinib).

The number of biopsies performed on the 23 patients totaled 42, including 26 tissue biopsies and 16 liquid biopsies (cell-free DNA samples). This corresponds to a mean of 1.83 biopsies per patient (range, 1-7). Main biopsy sites were lungs in 8 patients, pleural effusion in 5 patients, and liver in 4 patients (see Supplemental Table 2 in the online version). The samples studied were from 13 of the 23 patients (57%) who had disease progression during treatment with a first TKI, 12 of the 15 patients (80%) who had disease progression during treatment with a second TKI, and 3 of the 7 patients (43%) who had disease progression during treatment with a TKI given as a third TKI or further. The studied samples also included 5 biopsies performed at the time of disease progression during therapies other than ALK TKIs.

The results of targeted NGS applied to these samples are as follows. ALK mutations were detected in 8 patients (35%). They included 4 G1202R mutations and 1 C1156Y, 1 V1180L, 1 I1171N, and 1 L1196M mutation. In one of the patients in whom a G1202R mutation was detected initially, a G1202R/G1269A compound mutation was found in a later biopsy. Seven ALK mutations were detected in tissue biopsies and 3 in circulating free DNA. For 3 patients, liquid and tissue biopsies were performed at the same time. The results were consistent in 1 patient.

An ALK amplification with no concomitant ALK mutation was detected using fluorescence in situ hybridization in 1 biopsy (4.34%; Figure 1). In addition to an ALK mutation, 7 patients had a TP53 mutation (A138P, R175H, C238R, C277G, R248Q, R337C, R337P) and 1 had a N-methyl-N'-nitroso-guanidine human osteosarcoma transforming gene mutation in exon 18 (c.3686_3686 + 3del). No mutation was identified in any other oncogene tested with this NGS panel.

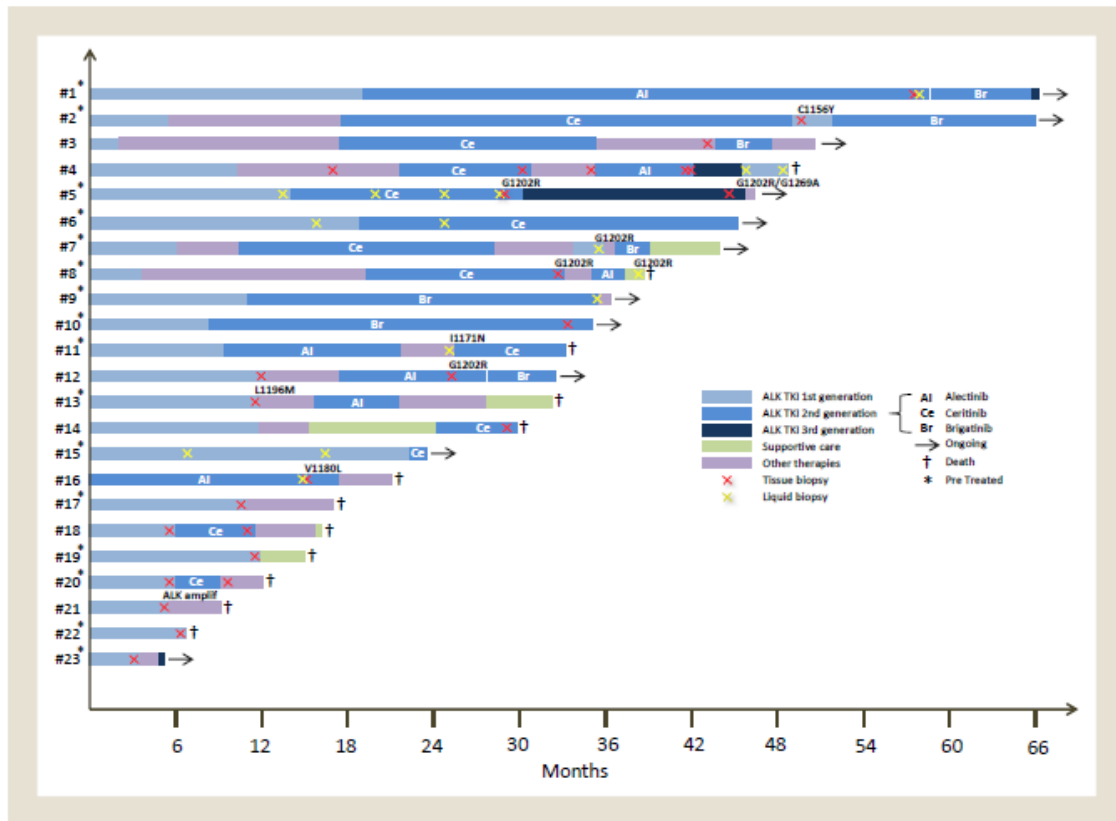
Figure 1 Distribution of Mechanisms of Resistance to ALK TKIs



Abbreviations: ALK = anaplastic lymphoma kinase; TKI = tyrosine kinase inhibitor. * One patient with a G1202R mutation was found, after treatment with lorlatinib, to harbor a G1202R/G1269A compound mutation.

Resistance to ALK Inhibitors in Routine Practice

Figure 2 Treatment of ALK-Positive NSCLC Patients. Swimming Plot Showing, for Each Patient, the Treatments Received and the Number, Type(s), and Time of Completion of the Biopsies Performed. Each Bar Represents 1 Patient. Treatments Received Before the First ALK TKI are Not Represented



Abbreviations: ALK = anaplastic lymphoma kinase; NSCLC = non-small-cell lung cancer; TKI = tyrosine kinase inhibitor.

Among the 9 *ALK* mutations detected, one was found in a sample taken at the time of disease progression during crizotinib treatment as the first TKI. The 8 remaining mutations were identified in samples from patients exposed to a second- or third-generation TKI. The rate of detection of *ALK* mutations at the time of disease progression was 15% after a first TKI (2 of 13 patients tested), 33% after a second TKI (4 of 12 patients tested), and 66% after a third TKI or more (2 of 3 patients tested; Figure 2).

Among patients during treatment with the first ALK TKI, the objective response rate was 74% (17/23) and the disease control rate was 91% (21/23). By the end of data collection, 12 patients (52%) had died. Median overall survival (OS) from the start of the first ALK TKI treatment was 37.28 months (95% confidence interval, 19.58-not reached). We did not observe any difference in OS between patients with or without TP53 mutations. Among the 8 patients in whom an *ALK* mutation was identified, 7 (87%) received a new ALK TKI after the mutation was found (Figure 3).¹¹ In these 7 patients the objective response rate (ORR) with the new TKI was 71% (5/7). Among the patients in whom no *ALK* mutation was found, the ORR with the third ALK TKI was 33% (1/3).

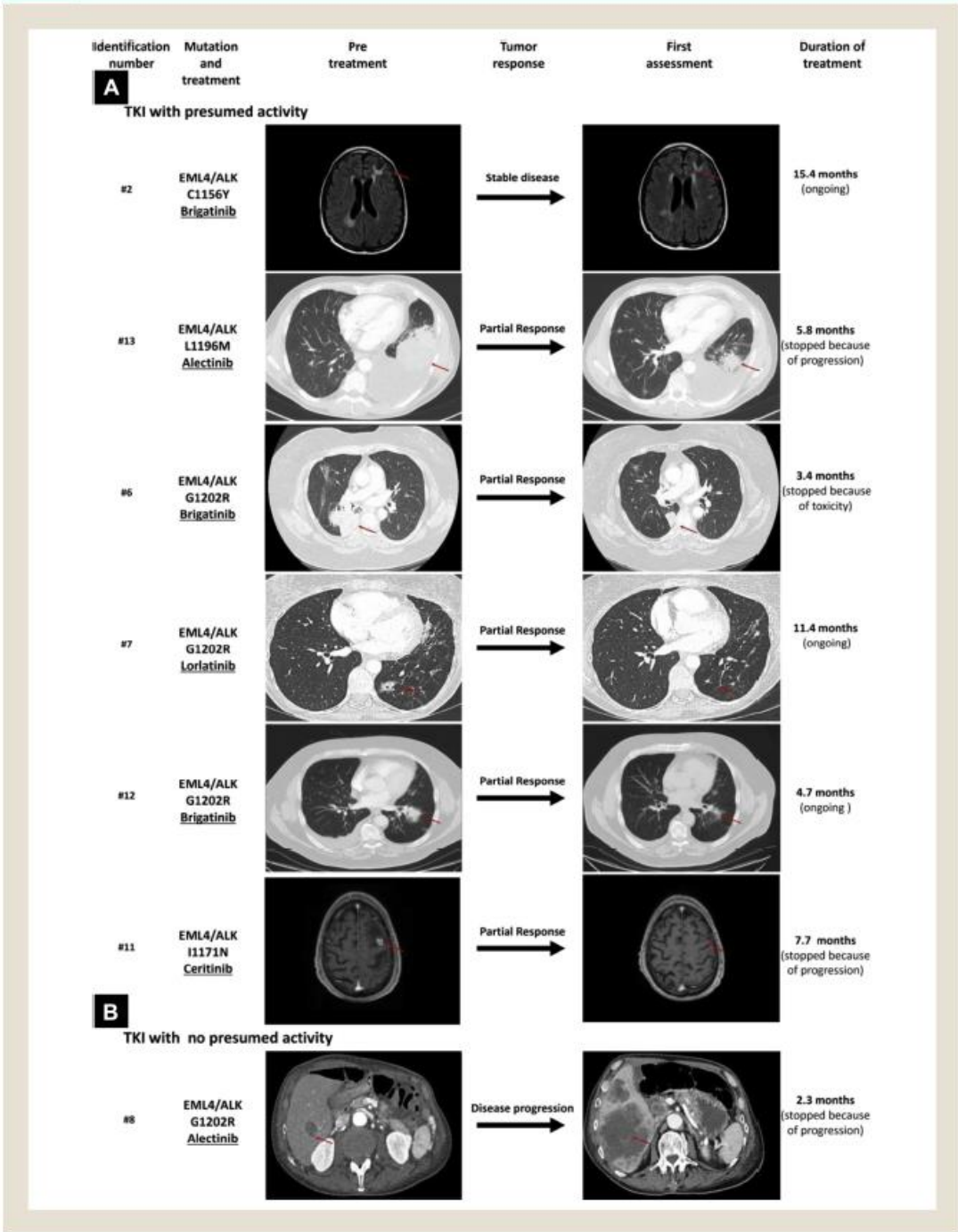
Among the 7 patients with an *ALK* mutation who received a subsequent ALK TKI, 6 received a TKI presumed on the basis of in vitro data to act against the identified mutant.¹¹ Among these 6 patients, 5 achieved an objective response and 1 showed stable disease. To the remaining patient alectinib was given despite detection of a G1202R mutation, because at the time alectinib was the only available next-generation TKI and data were still sparse regarding the activity of different ALK TKIs according to the *ALK* mutation present. This patient showed progressive disease at first assessment (Figure 3).

Discussion

The present study focused on targeted NGS, a technique now widely used in daily molecular testing. We show that its use in routine practice allowed identifying an ALK TKI resistance mechanism in 9 of 23 patients (39%) with advanced ALK-positive NSCLC. Gainor et al reported a similar rate of *ALK* mutations for other NGS panels.¹¹ Thus, targeted NGS appears suitable for detecting *ALK* mutations in routine practice.

It is anticipated that *ALK* mutations will be detected more frequently in the near future; Gainor et al have shown that they arise

Figure 3 Clinical Review of Patients Treated With a TKI After Identification of an ALK Mutation. Presumed Activity Was Defined by Sensitive or Intermediate IC50 on the Basis of in Vitro Data by Gainor et al



Abbreviations: ALK = anaplastic lymphoma kinase; IC50 = half maximal inhibitory concentration; TKI = tyrosine kinase inhibitor.

Resistance to ALK Inhibitors in Routine Practice

more frequently after second- or third-generation TKI treatment (54%-71%) than after crizotinib (20% of patients).¹¹ Meanwhile 2 second-generation TKIs, ceritinib and alectinib, have shown efficacy as first-line treatment,^{4,25} and ongoing clinical trials are currently evaluating next-generation TKIs (NCT03052608, NCT02737501, NCT02767804) in this context. Although no report so far has provided rates of *ALK* mutations after disease progression during treatment with second-generation TKIs given as first-line therapy, it is reasonable to speculate that they will exceed the 20% observed after failure of crizotinib treatment. Data further suggest that the *ALK* mutation rate also increases when several ALK TKIs are given sequentially. Solomon et al reported *ALK* mutation rates of 16.6% (14/84) after first-line ALK TKI treatment and 29.2% (31/106) after treatment with at least 2 ALK TKIs.²⁶ We have likewise observed a 15% *ALK* mutation rate after treatment failure of a first ALK TKI and a 33% *ALK* mutation rate after failure of 2 ALK TKI treatments. Whether this is because of the number of ALK TKIs administered or to the use of next-generation TKIs remains to be determined.

All of these findings, and because ALK-positive patients have been shown to benefit from receiving multiple TKIs,^{8,27,28} suggest that the future will see an increase in the proportion of patients exposed to next-generation ALK TKIs, along with an increase in the rate of *ALK* mutations.

Detection of *ALK* mutations in patients with disease progression after ALK TKI treatment is becoming crucial to determining the optimal therapeutic strategy. In vitro, different *ALK* mutations have been reported to predict different sensitivities to a single ALK TKI, and ALK TKIs do not all share the same spectrum of activity against *ALK* mutants.^{11,29} Similar findings have been reported in patients, although extrapolating from in vitro data to patients requires caution. In 2 patients, for example, the I1171N mutation was reported to drive resistance to alectinib and sensitivity to ceritinib.^{30,31} In another patient, the L1152R mutation has on the contrary been reported to confer resistance to ceritinib and to predict a response to alectinib.³² Consistently, we have found that all 6 patients who were treated with an ALK TKI presumed to act against the detected mutation achieved disease control, whereas the only patient who was treated with an ALK TKI not presumed to act effectively against the detected mutation showed progressive disease at first assessment. Interestingly, 2 patients harboring a G1202R mutation achieved a partial response during treatment with brigatinib, which is reported to exert intermediate activity on G1202R mutants in vitro.

To date, no clinical trial has assessed the clinical relevance of identifying *ALK* mutations at the time of disease progression during treatment with an ALK TKI. Besides the previously mentioned case reports, data from prospective trials suggest that patients harboring an *ALK* mutation are more likely to respond to subsequent treatments with ALK TKIs. In patients who receive the third-generation TKI lorlatinib after failure of treatment with 2 or 3 previous ALK TKIs, Shaw et al reported objective response rates of 26% in patients with no *ALK* mutation and 61% in patients with at least 1 *ALK* mutation.³³ Interestingly, we have found a similar trend in our set of patients treated in routine practice: we observed a 71% ORR with subsequent TKI treatment in patients known to have an *ALK* mutation and a 33% ORR in patients with no *ALK* mutation, after treatment with a third TKI; the presence of an *ALK* mutation might reveal sustained dependence on the ALK pathway and thus predict sensitivity to ALK

inhibition,²⁶ and the type of *ALK* mutation should guide the choice of the ALK TKI to be used. Inversely, the absence of any *ALK* mutation suggests that resistance might be because of an ALK pathway-independent mechanism that is not sensitive to ALK inhibition. Various ALK-independent resistance mechanisms have been described, including activation of EGFR, insulin growth factor 1 receptor, and viral oncogene homolog, mutation of *KRAS* or phosphatidylinositol 3-kinase, amplification of stem cell growth factor receptor (*SCFR/cKIT*) and gene fusions.^{12,13,18,34-37} In in vitro studies, cells having acquired resistance to an ALK TKI via an ALK-independent mechanism showed cross-resistance to other ALK TKIs, but sensitivity to ALK TKIs could be restored by combined treatment with another TKI.^{34,37,38} Efficacy of ALK TKI in patients having acquired resistance to a given ALK TKI via an ALK-independent mechanism is still poorly known.³⁷ Patients having progressed during crizotinib treatment with no evidence of an *ALK* mutation have been shown to benefit from second-generation ALK TKIs,³⁹ but whether their resistance was because of an ALK-independent mechanism, an ALK-dependent mechanism not involving an *ALK* mutation, or an *ALK* mutation that escaped detection because of sensitivity issues remains unknown.

Sequential treatment with several ALK TKIs might select resistant clones harboring multiple (ie, compound) *ALK* mutations. In a recent study, Yoda et al reported a 35% compound mutation rate in patients treated with lorlatinib⁴⁰; in our set, 2 patients had disease progression with lorlatinib treatment and a compound mutation was detected at the time of disease progression in a patient known to harbor a G1202R mutation. In vitro, compound mutations have been reported to confer resistance to most ALK TKIs, including lorlatinib.⁴⁰ However, a patient having acquired resistance to crizotinib, ceritinib, and lorlatinib successively and who was found to harbor a C1156Y/L1196M compound mutation achieved an objective response with crizotinib treatment. It is necessary to further determine the sensitivity of compound mutants to ALK TKIs.¹⁶

Finally, other molecular alterations might affect patient outcomes. Recent findings have shown that TP53 mutations or ALK variants might be associated with shorter progression-free survival and OS in ALK-positive NSCLC patients.^{41,42} In our study, no difference in OS was found between patients with or without TP53 mutations, but the number of patients in each subgroup was too low to draw any conclusion from this result. ALK variants were not assessed in our study.

Conclusion

Our findings show that mechanisms of resistance to ALK TKIs can be detected in routine practice in a third of ALK-positive NSCLC patients. Identifying ALK resistance mutations might help in selecting the best subsequent treatment.

Clinical Practice Points

- Anaplastic lymphoma kinase (*ALK*) mutations confer resistance to ALK TKIs in ALK-rearranged NSCLC. The frequency and type of *ALK* mutations that occur at progression depends on the type of ALK TKI received. These mutations are still rarely investigated in routine practice.
- Using targeted NGS, we identified 8 patients harboring an *ALK* mutation among 23 ALK-rearranged NSCLC patients whose

disease progressed during ALK TKI treatment. Our results suggest that targeted NGS is suitable for detecting ALK resistance mutations in ALK-rearranged NSCLC patients in routine practice.

- The *ALK* mutation rate was 15% after failure of the first ALK TKI and 33% after failure of treatment with 2 ALK TKIs. Furthermore, all of the patients who received a TKI presumed to act on the detected ALK mutant achieved disease control, suggesting that the identification of *ALK* mutation could help to select the best treatment at progression.

Disclosure

A.B.C. participated in advisory boards or received honoraria from Astra-Zeneca, Bristol-Myers Squibb, Merck & Co, Pfizer, Roche, Novartis, and Takeda, and received grants paid to A.B.C.'s institution from Novartis and Merck. P.J. reports nonfinancial support from Chugai Pharma, and personal fees from Boehringer Ingelheim, outside the submitted work. E.D. reports personal fees from Bristol-Myers Squibb, Merck & Co, Astra-Zeneca, Lilly oncology, and grants from Roche, outside the submitted work. S.B. reports personal fees and nonfinancial support from Lilly, GSK, Roche, and Pfizer, and a grant from the Intergroup Francophone de Cancérologie Thoracique outside the submitted work. M.W. received honorarium or personal fees from Astra-Zeneca, Bristol-Myers Squibb, Merck & Co, Roche, Boehringer Ingelheim, and Amgen. R.G. participated in advisory boards or received honorarium from Astra-Zeneca, BMS, MSD, Pfizer, Roche, Novartis, and Boehringer, and received grants paid to R.G.'s institution from Roche. N.Ri. reports personal fees from AstraZeneca, and personal fees from Boehringer Ingelheim, outside the submitted work. M.C.C. participates in advisory boards for Pfizer and Roche. C.D. reports personal fees and nonfinancial support from AstraZeneca, Novartis Pharma SAS, Roche SAS, Boehringer Ingelheim France, and Pfizer, outside the submitted work. The remaining authors have stated that they have no conflicts of interest.

Supplemental Data

Supplemental tables accompanying this article can be found in the online version at <https://doi.org/10.1016/j.clcc.2019.02.013>.

References

- Solomon B, Varella-Garcia M, Camidge DR. ALK gene rearrangements: a new therapeutic target in a molecularly defined subset of non-small-cell lung cancer. *J Thorac Oncol* 2009; 4:1450-4.
- Chiarle R, Voena C, Ambrogio C, Piva R, Inghirani G. The anaplastic lymphoma kinase in the pathogenesis of cancer. *Nat Rev Cancer* 2008; 8:11-23.
- Lin JJ, Rieley GJ, Shaw AT. Targeting ALK: precision medicine takes on drug resistance. *Cancer Discov* 2017; 7:137-55.
- Soria JC, Tan DS, Chiari R, et al. First-line ceritinib versus platinum-based chemotherapy in advanced ALK-rearranged non-small-cell lung cancer (ASCEND-4): a randomised, open-label, phase 3 study. *Lancet* 2017; 389:917-29.
- Shaw AT, Kim DW, Nakagawa K, et al. Crizotinib versus chemotherapy in advanced ALK-positive lung cancer. *N Engl J Med* 2013; 368:2385-94.
- Hida T, Nohhara H, Kondo M, et al. Alectinib versus crizotinib in patients with ALK-positive non-small-cell lung cancer (J-ALEX): an open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet* 2017; 390:29-39.
- Friboulet L, Li N, Katayama R, et al. The ALK inhibitor ceritinib overcomes crizotinib resistance in non-small cell lung cancer. *Cancer Discov* 2014; 4: 662-73.
- Shaw AT, Gandhi L, Gadge S, et al. Alectinib in ALK-positive, crizotinib-resistant, non-small-cell lung cancer: a single-group, multicentre, phase 2 trial. *Lancet Oncol* 2016; 17:234-42.
- Mezquita L, Planchard D. The role of brigatinib in crizotinib-resistant non-small-cell lung cancer. *Cancer Manag Res* 2018; 10:123-30.
- Shaw AT, Felip E, Bauer TM, et al. Lorlatinib in non-small-cell lung cancer with ALK or ROS1 rearrangement: an international, multicentre, open-label, single-arm first-in-man phase 1 trial. *Lancet Oncol* 2017; 18:1590-9.
- Gainor JF, Dardai L, Yoda S, et al. Molecular mechanisms of resistance to first- and second-generation ALK inhibitors in ALK-rearranged lung cancer. *Cancer Discov* 2016; 6:1118-33.
- Katayama R, Shaw AT, Khan TM, et al. Mechanisms of acquired crizotinib resistance in ALK-rearranged lung cancers. *Sci Transl Med* 2012; 4:120ra17.
- Sasaki T, Koivunen J, Ogino A, et al. A novel ALK secondary mutation and EGFR signaling cause resistance to ALK kinase inhibitors. *Cancer Res* 2011; 71:6051-60.
- Choi YL, Soda M, Yamashita Y, et al. EML4-ALK mutations in lung cancer that confer resistance to ALK inhibitors. *N Engl J Med* 2010; 363:1734-9.
- Sasaki T, Okuda K, Zheng W, et al. The neuroblastoma-associated F1174L ALK mutation causes resistance to an ALK kinase inhibitor in ALK-translocated cancers. *Cancer Res* 2010; 70:10038-43.
- Shaw AT, Friboulet L, Leshchiner I, et al. Resensitization to crizotinib by the lorlatinib ALK resistance mutation L1198F. *N Engl J Med* 2016; 374:54-61.
- Kim S, Kim TM, Kim DW, et al. Heterogeneity of genetic changes associated with acquired crizotinib resistance in ALK-rearranged lung cancer. *J Thorac Oncol* 2013; 8:415-22.
- Doebbele RC, Pilling AB, Aisner DL, et al. Mechanisms of resistance to crizotinib in patients with ALK gene rearranged non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2012; 18:1472-82.
- Toyokawa G, Inamasu E, Shimamatsu S, et al. Identification of a novel ALK G123S mutation in a patient with ALK-rearranged non-small-cell lung cancer exhibiting resistance to crizotinib. *J Thorac Oncol* 2015; 10:e55-7.
- Qiao H, Lowly CM. Cracking the code of resistance across multiple lines of ALK inhibitor therapy in lung cancer. *Cancer Discov* 2016; 6:1084-6.
- Ou SH, Asada M, Hsiang DJ, et al. Next-generation sequencing reveals a novel NSCLC ALK F1174V mutation and confirms ALK G1202R mutation confers high-level resistance to alectinib (CH5424802/RO5424802) in ALK-rearranged NSCLC patients who progressed on crizotinib. *J Thorac Oncol* 2014; 9:549-53.
- Zou HY, Friboulet L, Kodack DP, et al. PF-06463922, an ALK/ROS1 inhibitor, overcomes resistance to first and second generation ALK inhibitors in preclinical models. *Cancer Cell* 2015; 28:70-81.
- Infinatino NR, Park JH, Krytska K, et al. The ALK/ROS1 inhibitor PF-06463922 overcomes primary resistance to crizotinib in ALK-driven neuroblastoma. *Cancer Discov* 2016; 6:96-107.
- Passaro A, Preľaj A, Pochesi A, et al. Brigatinib for the treatment of ALK-positive advanced non-small-cell lung cancer patients. *Drug Today (Barc)* 2017; 53:435-46.
- Peters S, Camidge DR, Shaw AT, et al. Alectinib versus crizotinib in untreated ALK-positive non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2017; 377:829-38.
- Solomon BJ, Besse B, Bauer TM, et al. Lorlatinib in patients with ALK-positive non-small-cell lung cancer: results from a global phase 2 study. *Lancet Oncol* 2018; 19:1654-67.
- Duruissaux M, Besse B, Cadranet J, et al. Overall survival with crizotinib and next-generation ALK inhibitors in ALK-positive non-small-cell lung cancer (IFCT-1302 CLINALK): a French nationwide cohort retrospective study. *Oncotarget* 2017; 8:21903-17.
- Mok T, Spigel D, Felip E, et al. ASCEND-2: a single-arm, open-label, multicenter phase II study of ceritinib in adult patients (pts) with ALK-rearranged (ALK+) non-small-cell lung cancer (NSCLC) previously treated with chemotherapy and crizotinib (CRZ). *J Clin Oncol* 2015; 33:8059.
- Zhang S, Anjum R, Squillace R, et al. The potent ALK inhibitor brigatinib (AP26113) overcomes mechanisms of resistance to first- and second-generation ALK inhibitors in preclinical models. *Clin Cancer Res* 2016; 22:5527-38.
- Johnson AC, D6 P, Richard N, et al. Identification of I1171N resistance mutation in ALK-positive non-small-cell lung cancer tumor sample and circulating tumor DNA. *Lung Cancer* 2016; 99:38-40.
- Ou SH, Greenbowe J, Khan ZU, et al. I1171N missense mutation (particularly I1171N) is a common resistance mutation in ALK-positive NSCLC patients who have progressive disease while on alectinib and is sensitive to ceritinib. *Lung Cancer* 2015; 88:231-4.
- Tchekmedyian N, Ali SM, Miller VA, Haura EB. Acquired ALK L1152R mutation confers resistance to ceritinib and predicts response to alectinib. *J Thorac Oncol* 2016; 11:e87-8.
- Shaw AT, Martini J-F, Besse B, et al. Abstract CT044: Efficacy of lorlatinib in patients (pts) with advanced ALK-positive non-small cell lung cancer (NSCLC) and ALK kinase domain mutations. *Cancer Res* 2018; 78(suppl 13), CT044.
- Miyazaki M, Yasuda H, Tani T, et al. Overcoming EGFR bypass signal-induced acquired resistance to ALK tyrosine kinase inhibitors in ALK-translocated lung cancer. *Mol Cancer Res* 2017; 15:106-14.
- Crystal AS, Shaw AT, Sequist LV, et al. Patient-derived models of acquired resistance can identify effective drug combinations for cancer. *Science* 2014; 346: 1480-6.

Resistance to ALK Inhibitors in Routine Practice

36. Lowly CM, McDonald NT, Chen H, et al. Rationale for co-targeting IGF-1R and ALK in ALK fusion-positive lung cancer. *Nat Med* 2014; 20:1027-34.
37. McCoach CE, Le AT, Gowan K, et al. Resistance mechanisms to targeted therapies in *ROS1*⁺ and *ALK*⁺ non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2018; 24:3334-47.
38. Tani T, Yasuda H, Hamamoto J, et al. Activation of EGFR bypass signaling by *TGF α* overexpression induces acquired resistance to alectinib in ALK-translocated lung cancer cells. *Mol Cancer Ther* 2016; 15:162-71.
39. Shaw AT, Kim DW, Mehra D, et al. Ceritinib in ALK-rearranged non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2014; 370:1189-97.
40. Yoda S, Lin JJ, Lawrence MS, et al. Sequential ALK inhibitors can select for lorlatinib-resistant compound ALK mutations in ALK-positive lung cancer. *Cancer Discov* 2018; 8:714-29.
41. Kron A, Aldousty C, Scheffler M, et al. Impact of TP53 mutation status on systemic treatment outcome in ALK-rearranged non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol* 2018; 29:2068-75.
42. Lin JJ, Zhu VW, Yoda S, et al. Impact of *EMIA-ALK* variant on resistance mechanisms and clinical outcomes in ALK-positive lung cancer. *J Clin Oncol* 2018; 36:1199-206.

Supplemental Data

Supplemental Table 1 List of Genes and Exons Tested in the Colon & Lung V2 (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA) Panel	
Gene	Exon
AKT1	3
ALK	22, 23
BRAF	11
CTNNB1	3
DDR2	6, 9, 13-16, 18
EGFR	12, 18-21
ERBB2	19-21
ERBB4	3-4, 6-9, 15, 23
FBXW7	5, 8-11
FGFR1	4, 7
FGFR2	7, 9, 12
FGFR3	7, 9, 14, 16, 18
KRAS	2-4
MAP2K1	2
MET	2, 16
NOTCH1	1, 3, 6, 7, 8
SMAD4	3, 5-6, 8-12
STK11	1, 4-6, 8
TP53	2, 4-8, 10

Supplemental Table 2 Sites of Tissue Biopsy (n = 26)	
Biopsy Site	n (%)
Lung	8 (30.8)
Pleural Effusion	5 (19.2)
Liver	4 (15.4)
Breast	2 (7.7)
Lymph Node	2 (7.7)
Brain	1 (3.8)
Cerebrospinal Fluid	1 (3.8)
Bone	1 (3.8)
Peritoneal	1 (3.8)
Pericardial Effusion	1 (3.8)

7 DISCUSSION

La médecine de précision a pour but de proposer un traitement adapté aux caractéristiques moléculaires des tumeurs. La détection d'altérations moléculaires susceptibles de répondre à des thérapies ciblées ainsi que l'identification des mécanismes de résistance à ces thérapies représentent deux aspects majeurs de la médecine de précision qui ont été étudiés dans mes travaux de thèse.

Nous nous sommes d'abord intéressés aux mécanismes de résistance primaire aux ITK MET dans les CBNPC avec mutations METex14 (représentant entre 2 et 3 % des CBNPC) (article n°1). Dans les CBNPC METex14, l'efficacité des ITK MET est plus faible que dans les autres modèles d'addiction oncogénique, ce qui suggère la présence de mécanismes de résistance primaires. Compte tenu des interactions entre la voie PI3K et le récepteur MET (Hervieu et Kermorgant 2018), nous nous sommes focalisés sur l'étude des altérations de la voie PI3K-AKT comme potentiel mécanisme de résistance aux ITK MET. En constituant une cohorte de 65 patients, nous avons étudié les anomalies de la voie PI3K et mis en évidence deux patients porteurs d'une mutation PIK3CA et six porteurs d'une perte totale d'expression de PTEN (*Phosphatase and TENsin homolog*). En corrélant les données cliniques avec les données histologiques et moléculaires, nous avons observé que le taux de réponse à un ITK MET des patients porteurs d'une co-altération MET/PI3K était sensiblement inférieur (0 %) à celui de ceux ne présentant pas d'altération de la voie PI3K (63 %). L'étude *in vitro* de trois lignées cellulaires porteuses de co-altération MET/PI3K a permis de confirmer l'implication de ces altérations dans la résistance aux ITK MET. L'utilisation d'un inhibiteur PI3K en combinaison avec un ITK MET a permis de bloquer la prolifération de ces lignées. Ces résultats peuvent permettre d'envisager, à terme, un essai thérapeutique pour les patients porteurs d'un CBNPC METex14 avec altération de la voie PI3K.

Par la suite, nous nous sommes intéressés aux mutations rares susceptibles de répondre aux ITK MET (article n°2). Nous avons identifié un patient porteur d'un cholangiocarcinome avec fusion et amplification de *MET*. Ce patient, initialement réfractaire à la chimiothérapie, a reçu un ITK MET permettant l'obtention d'une réponse objective. Après plusieurs mois de traitement, une progression tumorale nous a conduit à rechercher un mécanisme de

résistance acquis. Nous avons mis en évidence l'émergence d'une mutation du domaine kinase de MET connue pour induire une résistance aux ITK MET de type 1.

Enfin, nous nous sommes intéressés à la faisabilité de la recherche des mutations de résistance *ALK* par NGS ciblé chez les patients porteurs d'un CBNPC *ALK+*, traités par un ITK *ALK* (article n°3). Les mécanismes de résistance aux ITK *ALK* sont majoritairement des secondes mutations *ALK* affectant le domaine kinase. Les ITK *ALK* de deuxième et troisième génération ont été développés afin de surmonter ces mécanismes. Dans ce travail, nous avons établi une cohorte rétrospective de 23 patients ayant reçu un ITK *ALK* et pour lesquels une biopsie à progression était disponible. Une analyse par NGS des tumeurs à progression a été réalisée. Nous avons identifié neuf patients porteurs d'une altération *ALK* (neuf mutations du domaine kinase *ALK* et une amplification *ALK*) conférant une résistance aux ITK *ALK*. Parmi ces patients, sept ont reçu un ITK *ALK* de nouvelle génération à progression. Parmi les six patients ayant reçu un ITK *ALK* présumé actif contre la mutation *ALK* de résistance, cinq ont présenté une réponse partielle et une stabilité prolongée. Le patient ayant reçu un ITK présumé non actif sur la mutation de résistance a progressé à la première évaluation. Ces données semblent confirmer l'utilité de rechercher les mécanismes de résistance afin d'orienter les choix thérapeutiques.

Dans cette discussion, nous aborderons, tout d'abord, l'étude des mécanismes de résistance aux ITK, en proposant une revue des mécanismes identifiés aux ITK MET. Ensuite, nous nous intéresserons à la voie PI3K-AKT et aux enjeux soulevés par la découverte de ces co-altérations. Enfin, nous évoquerons le challenge de la détection des anomalies moléculaires.

7.1 Médecine de précision et mécanisme de résistance

7.1.1 Définition d'un mécanisme de résistance

Nous avons vu, précédemment, que l'identification des mécanismes conduisant à la résistance aux thérapies ciblées a permis le développement de stratégies thérapeutiques innovantes afin de surmonter cette résistance. Dès lors, la recherche des mécanismes de résistance est essentielle si l'on souhaite améliorer la prise en charge des patients. Il existe deux notions

importantes afin de définir un mécanisme de résistance : sa temporalité par rapport à la thérapie reçue et sa position par rapport à la cible thérapeutique.

Concernant la temporalité, les altérations responsables d'une résistance peuvent être présentes initialement dans la tumeur (mécanisme primaire) ou émerger après un traitement (mécanisme acquis) (Lin et Shaw, n. d.). Les mécanismes de résistance acquis sont définis comme l'apparition d'une progression sous traitement après une réponse initiale (Westover et al. 2018). Plusieurs critères doivent être respectés : la thérapie reçue par le patient doit être délivrée en monothérapie et la progression doit survenir après une première réponse documentée partielle ou complète ou après une période de six mois de stabilité. Toutefois, il est intéressant de noter que l'amélioration des techniques de détection a permis d'observer que certains mécanismes de résistance acquis, émergeant sous la pression sélective des thérapies, peuvent être présents initialement dans la tumeur. Dans le cadre de nos travaux de thèse, nous avons identifié les altérations de la voie PI3K comme un mécanisme primaire de résistance conduisant à une progression sous ITK MET (article n°1). Nous avons également identifié les mutations du domaine kinase de MET et ALK comme des mécanismes acquis ayant émergé sous ITK MET et ALK (articles n°2 et n°3).

S'agissant de la position par rapport à la cible thérapeutique, les mécanismes de résistance peuvent survenir sur la cible (mécanisme *on-target*) ou survenir en dehors de la cible (mécanisme *off-target*). Les mécanismes *on-target* correspondent généralement à des mutations du domaine kinase pouvant augmenter l'affinité du récepteur à l'ATP et induisant un blocage stérique du site de fixation. En prenant pour exemple les CBNPC EGFR mutés et ALK+, la mutation EGFR T790M représente 50 à 60 % des résistances aux ITK EGFR de première et deuxième génération tandis que la mutation du domaine kinase ALK représente entre 20 et 40 % des résistances aux ITK ALK (Lin et Shaw, n. d.). D'autres mécanismes *on target* ont par ailleurs été identifiés comme l'amplification du gène cible retrouvé dans 8 à 10 % des CBNPC EGFR mutés traités par ITK EGFR et 7 à 18 % des CBNPC ALK+ traités par ITK ALK (Sequist *et al.* 2011 ; Katayama *et al.* 2012 ; Doebele *et al.* 2012). Les mécanismes de résistance *off target* sont plus hétérogènes, regroupant l'activation de voies de signalisation parallèles et les transformations phénotypiques. Les voies de signalisation parallèles peuvent être activées *via* la présence d'altérations sur d'autres RTK, comme, par exemple, les amplifications de *MET* dans les CBNPC EGFR-mutés et les CBNPC ALK+ (Baldacci *et al.* 2018 ; Gouji *et al.* 2014), mais

également par la présence de mutations en aval, comme les mutations de *MEK* et de *PIK3CA* (Crystal et al. 2014). Les transformations phénotypiques, quant à elles, correspondent le plus souvent dans les CBNPC EGFR mutés et ALK+ à de modifications histologiques en carcinome à petites cellules (CPC) (Lin et Shaw n. d. ; Miyamoto *et al.* 2016 ; Sequist *et al.* 2011). Les mécanismes conduisant à la transformation des CBNPC en CPC sont inconnus. La présence au sein de la tumeur initiale d'un contingent cellulaire de CPC qui aurait été sélectionné sous ITK EGFR est une hypothèse proposée (Cortot et Janne 2014b).

Dans le cadre de mes travaux de thèse, les altérations de la voie PI3K sont des mécanismes de résistance *off target* car activant une voie de signalisation parallèle (article n°1) alors que les mutations du domaine kinase de MET et ALK ainsi que l'amplification du gène *ALK* sont des mécanismes *on target* (articles n°2 et 3).

7.1.2 Revue des mécanismes de résistance et des biomarqueurs de réponse aux ITK MET

À ce jour, différents mécanismes de résistance (acquis et primaires) aux ITK MET ont été observés en clinique. Dans mes travaux de thèse, nous avons identifié les altérations de la voie PI3K comme mécanismes de résistance primaires (article n°1) et les mutations du domaine kinase de MET comme mécanisme de résistance acquis (article n°2). Dans la pratique clinique, les ITK MET sont uniquement recommandés chez les patients porteurs d'un CBNPC METex14. Dès lors, l'essentiel des mécanismes de résistance ayant été identifiés concerne les patients porteurs d'un CBNPC METex14.

7.1.2.1 Les mécanismes de résistance primaires aux ITK MET

À ce jour, aucun mécanisme de résistance *on target* responsable d'une résistance primaire aux ITK MET n'a été observé dans les CBNPC METex14.

Concernant les mécanismes *off target*, deux principaux mécanismes de résistance primaires ont été décrits : les mutations de *KRAS* et les altérations de la voie de signalisation PI3K. Des mutations du gène *KRAS* ont été identifiées *de novo* chez respectivement 4,4 % et 5,2 % des patients atteints de CBNPC METex14 (Rotow *et al.* 2018 ; Suzawa *et al.* 2019). Il s'agit

majoritairement de substitutions impliquant la guanine en position 12 (G12 C/D/S/V) et, plus rarement, des mutations KRAS G13C, Q22K et Q61H. Les données précliniques suggèrent que la présence d'une mutation de *KRAS* entraîne une résistance aux ITK MET dans le CBNPC METex14 et que la combinaison des ITK MET et d'un inhibiteur MEK pourrait surmonter cette résistance (Rotow *et al.* 2018). En pratique clinique, la sensibilité aux ITK MET reste mal connue. Suzawa *et al.* ont décrit cinq patients présentant un CBNPC avec une co-altération METex14 et *KRAS*. Dans quatre cas, la mutation a été identifiée dans la tumeur initiale. Le traitement par un ITK MET a pu être initié dans deux cas et a entraîné une stabilisation transitoire de la maladie. Dans l'étude METROS, l'utilisation du crizotinib chez deux patients atteints d'un CBNPC METex14 avec une mutation de *KRAS* a conduit à une absence de réponse objective (Landi *et al.* 2019). L'amplification du gène *KRAS* a également été décrite *de novo* chez 2,6 % des patients, mais l'impact sur l'efficacité d'un TKI MET n'est pas connu (Suzawa *et al.* 2019).

Concernant les altérations de la voie PI3K, nous avons observé que les mutations du gène *PI3K* et les pertes d'expression de la protéine PTEN étaient fréquentes dans les CBNPC METex14. Nous avons également rapporté, après une analyse d'une cohorte de 65 patients porteurs d'un CBNPC METex14, un taux de réponse aux ITK MET plus faible chez les patients porteurs d'une altération de la voie PI3K. De récentes données semblent confirmer nos observations. L'analyse d'une cohorte de 75 patients ayant reçu un ITK MET pour un CBNPC METex14 a mis en évidence un taux de réponse objective ainsi qu'une survie plus faible pour les patients porteurs d'une altération de la voie PI3K par rapport aux patients non porteurs de ces altérations (13 % *versus* 41 %) (Guo *et al.* 2020). Toutefois, nous notons des différences par rapport à nos travaux. Concernant la fréquence des altérations, Guo *et al.* ont retrouvé une altération de la voie PI3K dans 11 % des cas. Bien que nous ayons identifié une altération de la voie PI3K dans 12 % des cas, cette fréquence est probablement sous-estimée compte tenu du fait que l'analyse de l'expression de PTEN (principale altération identifiée) n'a pu être réalisée que sur 40 % des tumeurs. Concernant les altérations de PTEN, Guo *et al.* se sont intéressés aux mutations survenant sur le gène *PTEN*, alors que nous nous sommes focalisés sur l'expression de la protéine PTEN. Il existe de nombreuses altérations post-transcriptionnelles pouvant moduler l'expression de la protéine PTEN, ce qui peut expliquer la différence de fréquence observée dans nos deux études (Lee, Chen *et Pandolfi* 2018).

7.1.2.2 Les mécanismes de résistance acquis aux ITK MET

À ce jour, nous disposons des résultats d'analyse de deux cohortes de patients porteurs d'un CBNPC METex14, traités par ITK MET et pour lesquels une biopsie à progression a été réalisée. Une première cohorte de 20 patients a mis en évidence un mécanisme *on target* dans 35 % des tumeurs et un mécanisme *off target* dans 45 % d'entre elles (Recondo et al. 2020). Une seconde cohorte de quinze patients a permis de retrouver un mécanisme *on target* dans 20 % des cas et un mécanisme *off target* dans 33 % des cas (Guo et al. 2020).

7.1.2.2.1 Les mécanismes de résistance acquis et *on target*

L'un des mécanismes de résistance acquis et *on target* aux ITK MET le plus décrit chez les patients atteints d'un CBNPC METex14 est la survenue d'une mutation secondaire du gène *MET* (le plus souvent dans le domaine kinase). Nous avons également observé un cas similaire d'émergence d'une mutation du domaine kinase de MET après un traitement par capmatinib (article n°2). Les mutations de *MET* sont responsables d'une modification de la conformation du domaine kinase de la protéine MET interférant avec la liaison à l'ITK MET (Fujino et al. 2019). À ce jour, plus de dix mutations différentes ont été rapportées. Les plus fréquentes se situent sur la leucine 1195, la lysine 1228, 1246 et la tyrosine 1230 (Heist et al. 2016 ; Guo et al. 2019a ; Li et al. 2017 ; Jin et al. 2019 ; Dong et al. 2016 ; Rotow et al. 2018 ; Zhang, Yin et Peng 2017 ; Ou et al. 2017 ; Awad et al. 2018 ; 2020). Par ailleurs, la présence de mutations kinases composites a également été observée. En effet, Awad et al. ont rapporté trois cas de mutations composites : un après un traitement au crizotinib (MET Y1230H ; D1228N ; D1228S) et deux (MET D1228N ; G1163R ; L1195V et H1049Y ; L1195V ; L1195F) après un traitement au glesatinib.

Parmi les autres mécanismes *on target* décrits, on retrouve une amplification du gène *MET* (17 copies), survenue chez un patient traité par glesatinib ainsi qu'un cas d'amplification du gène *HGF* après traitement par crizotinib (Guo et al. 2019b ; Recondo et al. 2020).

Il est intéressant de noter que la sécrétion autocrine d'HGF et l'amplification *EGFR* ont été décrits comme des mécanismes de résistance potentiels aux ITK EGFR (Yano et al. 2008).

7.1.2.2.2 Les mécanismes de résistance acquise et *off target*

L'amplification du gène *KRAS* est le mécanisme de résistance acquis et *off target* le plus fréquemment mis en évidence. En 2018, Bahcall *et al.* ont identifié trois patients atteints d'un CBNPC METex14 ayant acquis, après une réponse initiale au crizotinib, une amplification du gène sauvage de *KRAS* ((Bahcall et al. 2018). En 2019, Rotow *et al.* ont décrit un cas d'amplification du gène *KRAS* (22 copies du gène) après une réponse initiale au crizotinib (Rotow et al. 2018). La même année, Han *et al.* ont rapporté un cas d'amplification de *KRAS* après neuf mois de traitement par savolitinib chez un patient atteint d'un CBNPC METex14 (Han et al. 2019). Plus récemment Awad *et al.* ont observé l'émergence d'une amplification de *KRAS* chez deux patients préalablement traités par crizotinib. Il est intéressant de noter que chez ces deux patients une amplification *EGFR* était également retrouvée (Recondo et al. 2020). Parmi les autres mécanismes identifiés, la mutation *KRASG12D* a été retrouvée chez un patient traité par crizotinib et une co-amplification de *ERBB3* et *EGFR* a été identifiée chez deux patients traités par capmatinib (Recondo et al. 2020).

7.1.2.3 Les biomarqueurs prédictifs de réponse aux ITK MET

Il existe des données significatives concernant des marqueurs prédictifs de réponse. En 2020, Guo *et al.* se sont intéressés à l'impact de l'expression du récepteur MET, analysé par spectrométrie de masse (SM) et par immunohistochimie (IHC), sur la réponse aux ITK MET dans les CBNPC METex14. Les auteurs ont ainsi observé que les tumeurs n'exprimant pas le récepteur MET étaient résistantes aux ITK MET (0 % *versus* 60 %). De plus, le taux de réponse était dépendant du H-score (proportion de cellules positives) avec un taux de 62 % si le H score était > 200 *versus* 28 % pour un H-score compris entre 1 et 199. La survie était également impactée, avec une survie sans progression à 10,4 mois pour les H-scores > 200 contre 5,5 mois pour les H-score < 200 (Guo et al. 2020).

Concernant la recherche de biomarqueurs de réponse, au sein du laboratoire nous travaillons actuellement sur l'évaluation du rôle de l'HGF dans les CBNPC METex14 (cf. annexe article 1). Dans un premier temps, nous avons évalué le rôle de l'HGF dans le potentiel oncogénique des mutations METex14. Pour cela, nous avons inséré (*via* une technique de CRISPR-Cas9) une

mutation ponctuelle de *MET* responsable d'un saut de l'exon 14 de *MET* dans une lignée épithéliale bronchique immortalisée mais non transformée (16HBE14o-). Ainsi, nous avons obtenu la lignée 16HBE-Ex14. Nous avons également établi une lignée 16HBE14o- exprimant le récepteur MET sauvage, 16HBE-WT. Plusieurs expérimentations ont été menées dont des expériences de tumorigenèse *in vivo* pour lesquelles des xénogreffes de cellules 16HBE-Ex14 et 16HBE-WT ont été réalisées dans deux modèles de souris SCID. Nous avons utilisé un modèle de souris SCID exprimant l'HGF humain (hHGFki-SCID) et un modèle de souris SCID contrôle (NSG). Nous avons, dans un premier temps, observé que les cellules 16HBE-Ex14 injectées dans des souris hHGFki-SCID, formaient plus de tumeurs comparées aux cellules 16HBE-WT (100% versus 14%) (**Annexe n°1 A**). Par la suite, nous avons pu observer que le pourcentage de souris présentant des tumeurs était nettement supérieur lorsque les cellules 16HBE-ex14 étaient injectées dans les souris hHGFki-SCID que dans les souris NSG (86 % *versus* 35 %) (**Annexe n°1 B**). Nous avons également démontré, que l'ajout d'un inhibiteur de MET, permettait de bloquer la prolifération des cellules 16HBE-ex14 dans les souris hHGFki-SCID (**Annexe n°1 C**). Ces résultats témoignent de l'impact de l'HGF dans le potentiel oncogénique des altérations METex14. Par la suite, nous nous sommes intéressés au rôle de l'HGF comme potentiel biomarqueur de réponse prédictif aux ITK MET dans les CBNPC METex14. Nous avons constaté que 33 % des tumeurs expriment l'HGF, ce qui confirme la faisabilité de cette recherche. Toutefois, aucune donnée clinique d'efficacité des ITK MET n'est disponible pour ces patients, ce qui ne permet pas, à ce jour, d'évaluer l'HGF comme un éventuel biomarqueur de réponse.

7.1.2.4 Stratégies proposées afin de surmonter les résistances acquises on target aux ITK MET

Nos travaux de recherche sur les CBNPC ALK+ (article n°3) nous ont permis de montrer que l'utilisation d'un ITK ALK, choisi en fonction du mécanisme de résistance identifié, était associée à un taux de réponse important. Concernant les mécanismes de résistance aux ITK MET, à l'instar d'autres modèles d'addiction oncogénique, la survenue de mutations dans les exons codant pour le domaine kinase du récepteur MET est le mécanisme de résistance acquis et *on target* le plus fréquemment observé. S'agissant de la prise en charge des patients présentant ces mutations de résistance, des données précliniques, obtenues dans le modèle

cellulaire Ba/F3 exprimant la mutation METex14, ont permis de classer les différentes sensibilités aux ITK MET selon le type de mutation kinase de MET (Fujino et al. 2019). Ainsi, il a été observé que les mutations impliquant la lysine 1228 et la tyrosine 1230 sont toutes résistantes aux ITK de type Ia et Ib et pourraient être surmontées, pour la majorité d'entre elles, par un ITK de type II, à l'exception des mutations D1228A et D1228Y. En revanche, les mutations impliquant la leucine 1195 et la phénylalanine 1120 sont principalement sensibles aux ITK MET de type 1 et résistantes aux ITK de type 2. Des données cliniques semblent confirmer ces observations.

Le cas d'un patient suivi pour un CBNPC METex14 et ayant présenté l'émergence d'une mutation de résistance du domaine kinase de MET (Y1230H) après un traitement par crizotinib a été rapporté. Un traitement par glesatinib, un ITK MET de type II, a pu être initié, ce qui a permis l'obtention d'une réponse partielle (Engstrom et al. 2017). Recondo *et al.* ont également rapporté plusieurs cas de patients porteurs d'un CBNPC METex14 et ayant développé un ou plusieurs mécanismes de résistance *on target*. Un premier cas concernait un patient ayant développé une mutation MET Y1230H après un traitement de quinze mois de crizotinib, un traitement par mérestinib, un inhibiteur de type II, a été introduit et a permis l'obtention d'une réponse. Un deuxième cas rapportait l'émergence d'une amplification de *MET* (17 copies) sous glesatinib, un traitement par crizotinib a été initié conduisant à une réponse partielle pendant dix mois. Enfin, un troisième cas était celui d'un patient traité par crizotinib et pour lequel six mutations ont été identifiées (les mutations MET D1228N/H, Y1230S/H et G1163R, connues pour induire une résistance aux ITK MET de type 1, et la mutation MET L1195V, responsable d'une résistance aux ITK MET de type II), le glesatinib a été introduit et a conduit à une progression après un mois de traitement (Recondo et al. 2020).

Ces données offrent des perspectives intéressantes pour les patients porteurs d'un cancer avec une addiction oncogénique à *MET* et développant une mutation du domaine kinase de *MET* sous ITK. En effet, nous avons observé chez les patients porteurs d'un CBNPC ALK+ avec une mutation du domaine kinase ALK que l'utilisation d'une stratégie thérapeutique visant à surmonter la résistance est associée à un taux de réponse (86 %) (article n°3).

Il est également intéressant d'explorer d'autres stratégies en cas de mécanismes *on target*, comme l'inhibition de voies de signalisation parallèles pouvant être suractivées, et ce, en

l'absence d'altération spécifique de ces voies. Par exemple, des données précliniques suggèrent que la voie NOTCH est suractivée en présence de la mutation de résistance aux ITK EGFR de première génération (EGFR T790M) et également en présence de la mutation de résistance à l'osimertinib (EGFR C797S). Il a aussi été observé que l'utilisation d'un inhibiteur de la voie NOTCH permet de restaurer la sensibilité aux ITK EGFR (Mur et al. 2020).

7.2 Voie PI3K et résistance aux thérapies anticancéreuses

Durant mes travaux de thèses, nous nous sommes spécifiquement focalisés sur les altérations de la voie PI3K comme mécanismes de résistance aux ITK. Ce choix tient à l'existence d'une forte interaction entre MET et la voie PI3K.

L'impact réel des altérations de PI3K dans la survenue de résistances aux thérapies anticancéreuses est peu connu. Toutefois, les altérations de PI3K ont été décrites comme un mécanisme de résistance aux thérapies ciblées, à la chimiothérapie, à l'hormonothérapie et l'immunothérapie témoignant, ainsi, d'un rôle prépondérant des acteurs de cette voie dans l'échec thérapeutique (Huang et Fu 2015 ; Mills, Rutkovsky et Giordano 2018 ; Wang *et al.* 2016 ; Hwu et Davies n. d. ; Barreto *et al.* 2020).

Dans les CBNPC avec addiction oncogénique, les altérations de PI3K (tout particulièrement les mutations *PIK3CA*) ont été décrites comme des mécanismes de résistances aux ITK. Engelman *et al.* ont démontré qu'insérer une mutation *PIK3CA* (E545K) dans une lignée cellulaire de CBNPC (HCC827) sensible aux ITK EGFR conduit à une résistance à ces derniers (Engelman *et al.* 2006). Dans les adénocarcinomes pulmonaires, la présence d'une co-altération EGFR-PI3K est détectée dans 13 % des cas. Ce taux est ailleurs enrichi après exposition à un ITK EGFR (Yu et al. 2018). La présence d'une co-altération EGFR-PI3K est associée à un plus mauvais pronostic (survie globale de 18 mois *versus* 33, $p = 0,006$) sans pour autant modifier le taux de réponse aux ITK EGFR (83 % *versus* 62 %, $p = 0,80$) (Engelman *et al.* 2015).

Des données issues de 324 patients ayant progressé sous ITK EGFR de première génération ont montré que 14,9 % des tumeurs étaient porteuses d'une altération de PI3K (mutation de *PIK3CA*, mutation de *AKT* ou mutation de *PTEN*), suggérant que cette dernière est un potentiel mécanisme de résistance acquis (Fang et al. 2020).

Les résultats récents obtenus avec les inhibiteurs de la voie PI3K dans les cancers du sein offrent l'espoir d'utiliser ces thérapeutiques dans les années à venir dans différents cancers

(Verret et al. 2019). Toutefois, de nombreux essais ayant évalué les inhibiteurs PI3K en combinaison avec la chimiothérapie ou des thérapies ciblées ont échoué à démontrer la supériorité de l'ajout de ce traitement (Rodon et al. 2018).

La dérégulation conjointe de MET et de PI3K a été identifiée dans de nombreux cancers (Hervieu et Kermorgant 2018). Il s'agit principalement d'études précliniques ayant relevé la présence d'une activation conjointe de MET et de PI3K dans des lignées cellulaires résistantes à la chimiothérapie et à la radiothérapie (Jung, Choi et Kwak 2015 ; Ettl *et al.* 2015).

Les stratégies visant à combiner des ITK de PI3K et des inhibiteurs de MET ont été évaluées à plusieurs reprises. Nous avons pu montrer que l'utilisation d'un inhibiteur de la voie PI3K permettait de restaurer la sensibilité aux ITK MET en cas de co-altération MET/PI3K (article n°1). Une observation similaire a également été effectuée en cas d'amplification de *KRAS*. En effet, dans ce modèle, la voie PI3K-AKT (médiée par la sécrétion autocrine du ligand EGF) était activée. L'ajout d'un inhibiteur de la voie PI3K couplé à une inhibition de MET a permis de surmonter la résistance. Sur le plan clinique, à ce jour, nous disposons d'une seule étude ayant évalué la possibilité d'une co-inhibition de MET et de PI3K. Cette étude s'est intéressée aux patients porteurs d'un glioblastome avec altération de PTEN. Il s'agit d'un essai de phase Ib/II, ayant évalué le capmatinib en combinaison avec le buparlisib. En raison d'un manque d'efficacité clinique notable, caractérisé par l'absence de réponse objective et un taux de stabilité de 30 %, cet essai a été interrompu. Toutefois, il est intéressant de noter un profil de tolérance acceptable avec un taux d'évènement indésirable de grade III de 36,4 %, suggérant, à terme, la possibilité d'évaluer cette combinaison chez des patients porteurs d'un CBNPC METex14 avec une altération de la voie PI3K.

7.3 Détection des biomarqueurs : enjeux et problématiques

Durant mes travaux de thèses, la détection des biomarqueurs de réponse aux thérapies ciblées était centrale. Dans un premier temps, nous avons cherché à optimiser nos outils de détection afin de mieux identifier les patients porteurs d'un CBNPC METex14 (Descarpentries *et al.* 2018). Afin de mieux identifier les altérations de PTEN, nous avons proposé une analyse par IHC de l'expression de PTEN (article n°1). Nous avons travaillé à la détection d'un nouveau driver oncogénique, la fusion de *MET* (article n°2). Nous avons essayé d'étudier la faisabilité de la recherche des mécanismes de résistance en routine clinique par NGS ciblé réalisé sur

biopsie solide et liquide (article n°3). Enfin, nous travaillons actuellement sur le rôle de l'HGF en tant que biomarqueur de réponse aux ITK MET et proposons une analyse par IHC de l'HGF sur tumeur (Fernandes *et al.*).

7.3.1 Place des différents outils de biologie cellulaire et moléculaire dans la détection des altérations moléculaires en oncologie

Nos travaux sur les mutations METex14 et les fusions de MET soulignent la difficulté d'identifier certaines cibles thérapeutiques. La première étape indispensable précédant la mise en place d'une thérapie ciblée consiste à identifier les patients porteurs d'une altération moléculaire actionnable. Historiquement, la détection de ces altérations était effectuée selon une stratégie de test d'un gène unique. Plusieurs outils sont disponibles (dont certains encore largement utilisés) tels que la technique de Sanger, la RT-PCR (réaction de polymérisation en chaîne par transcription inverse) ou la FISH (Sabari *et al.* 2017). La technique de Sanger a été l'une des premières méthodes de détection des mutations dans le cancer du poumon, dont, notamment, les mutations des gènes *EGFR* et *KRAS*. La RT-PCR et la FISH sont utilisées afin de détecter des fusions de gènes.

L'arrivée des ITK en oncologie coïncide avec une révolution en biologie moléculaire : le séquençage à haut débit ou de nouvelle génération (NGS). Contrairement à la technique de Sanger, le NGS permet la lecture en parallèle de milliers de brins d'ADN. Ce progrès technologique a, notamment, réduit la vitesse de séquençage du génome humain initialement de quinze ans à une journée (Sabari *et al.* 2017). Il existe trois techniques différentes : le séquençage ciblé, le séquençage des régions codantes (*Whole exome sequencing*) et le séquençage du génome entier (*Whole genome sequencing*). À ce jour, le séquençage d'un panel de gènes est la technique la plus couramment employée en routine clinique pour des raisons de coût et de rapidité d'interprétation.

En cancérologie pulmonaire, le NGS a révolutionné la détection des mutations. En 2014, le TCGA (*the cancer genome atlas*) a publié les profils moléculaires de 230 adénocarcinomes pulmonaires obtenus par *Whole exome sequencing*. Le NGS a permis de détecter des mutations qui n'étaient pas retrouvées par les techniques anciennes. En 2015, une étude rétrospective effectuée sur des patients porteurs d'un adénocarcinome, peu ou non fumeurs

et ne présentant pas d'altération actionnable après analyse par les techniques antérieures au NGS, a permis d'observer que le séquençage à haut débit d'un panel conduisait à identifier 65 % des patients avec des altérations moléculaires actionnables (Drilon *et al.* 2015).

Comme toute technique, le NGS présente des limites. Le WES et le WGS sont des techniques coûteuses et difficiles d'interprétation compte tenu des données produites et du nombre de variants identifiés (Kamps *et al.* 2017). Le séquençage d'un panel de gènes, quant à lui, est limité par rapport aux cibles que l'on souhaite analyser. Dans le cas de nos travaux de recherche, nous avons été confronté à la problématique que pose la détection des mutations METex14 car, contrairement aux mutations *EGFR*, ces dernières sont nombreuses (plus d'une centaine ont été décrites) et hétérogènes (délétions, insertions et substitutions). De plus, elles surviennent dans les introns, qui sont des régions habituellement non couvertes par les panels de NGS classiques. L'utilisation du panel *Colon and Lung* (largement utilisé en routine clinique), ne permettait d'identifier que 0,2 % des cas nécessitant d'optimiser la technique. En développant un panel spécifique, couplé à une analyse des fragments longs, nous avons pu obtenir un taux de détection des mutations METex14 dans les CBNPC de 2,2 % (**Annexe 2**) (Descarpentries *et al.* 2018).

Une autre problématique repose sur les fusions de gènes. Au cours des dernières décennies, le nombre de fusions impliquant des oncogènes identifiés n'a cessé de croître. L'arrivée de thérapies efficaces contre ces altérations a rendu indispensable leur recherche en routine clinique. Au-delà des fusions bien connues comme celles impliquant ALK ou ROS1, on peut par exemple citer les fusions NTRK, NRG1, RET. Concernant le récepteur MET, le nombre de fusions de *MET* détectées augmente dans de nombreux cancers et l'utilisation d'un ITK MET semble efficace en présence de cette altération (article n°2). Néanmoins, les techniques actuelles de détection des fusions utilisées en routine clinique reposent essentiellement sur la FISH. La recherche de l'ensemble des fusions par FISH est chronophage, car cette technique permet l'analyse d'un seul gène. Afin de pallier cette problématique, de nouvelles techniques de NGS basées sur la détection d'ARN ont été développées et sont disponibles commercialement (Schram *et al.* 2017). Ces techniques, sensibles et permettant de tester plusieurs échantillons en même temps, se heurtent néanmoins aux problèmes liés à la qualité des échantillons et au coût.

7.3.2 Enjeu et défi de la détection des mécanismes de résistances en routine clinique

La détection des mécanismes de résistance est un enjeu majeur de la médecine de précision. Toutefois, cette détection est délicate car elle impose de disposer de matériel tumoral suffisant et dépend du mécanisme recherché.

L'accessibilité du matériel tumoral concerne essentiellement la recherche de mécanismes acquis. Elle suppose que le site de progression soit accessible à une biopsie et que le patient présente un état général compatible avec la réalisation de ce geste invasif. En effet, une étude menée par le groupe français de pneumo-cancérologie (GFPC) a montré que sur 100 patients pour lesquels une biopsie était proposée, 18 % n'étaient pas éligibles à sa réalisation. De plus, sur l'ensemble des biopsies effectuées, 34 % n'étaient pas contributives (Chouaid et al. 2014). Une alternative, que nous présentons dans les articles n°2 et n°3, consiste à utiliser de la biopsie liquide. Cette dernière regroupe les analyses des cellules tumorales circulantes (CTC), de l'ADN tumoral circulant (ADNc), des miARN circulants et des exosomes (petites vésicules extracellulaires). La biopsie liquide offre plusieurs avantages : peu invasive, ce qui implique une notion de répétabilité, elle peut être utilisée pour suivre une réponse sous traitement (Lianidou et Pantel 2019) et permet, enfin, de mieux refléter l'hétérogénéité tumorale et de mieux identifier le mécanisme de résistance. Par ailleurs, cette technique est recommandée dans la détection des mutations *EGFR*. Néanmoins, l'utilisation de la biopsie liquide comporte une limite importante : une sensibilité plus faible que celle de la biopsie tissulaire dans la détection des mutations, généralement entre 40 et 70 % selon les techniques. En outre, les biopsies liquides ne permettent pas de détecter l'ensemble des mécanismes de résistance, comme les amplifications et les transformations histologiques (Chang et al. 2020).

L'autre point important concerne le type de mécanisme recherché. Dans l'article n°1, nous présentons la perte d'expression de PTEN comme mécanisme de résistance. Nous avons défini un seuil de négativité lorsque 0 % des cellules exprime la protéine. La mesure de l'expression de PTEN est bien codifiée et de nombreux anticorps sont disponibles pour l'analyse. Toutefois, l'analyse de l'expression de PTEN n'est pas réalisée en routine dans tous les centres, ce qui limite la détection de ce mécanisme. De surcroît, le seuil de négativité peut varier, certaines équipes incluant une expression faible de la protéine < 10 % comme un résultat négatif (Lotan

et al. 2011). Il convient alors de bien standardiser les techniques afin d'offrir une meilleure reproductibilité.

7.3.3 Impact de la détection de co-altérations sur le choix thérapeutique

Comme nous l'avons décrit précédemment, l'utilisation de traitements capables de surmonter les mécanismes de résistance a considérablement modifié la prise en charge des patients porteurs de tumeurs avec une addiction oncogénique. De plus, des stratégies visant à surmonter les résistances avant que ces dernières n'émergent semblent offrir des résultats supérieurs aux stratégies développées initialement.

La plupart des travaux ayant étudié des co-altérations ont établi des stratégies thérapeutiques dont le plus grand nombre repose sur l'utilisation de combinaisons de traitement afin de bloquer les différentes altérations. Bien que les résultats obtenus soient prometteurs, en pratique clinique aucune combinaison n'est actuellement recommandée.

L'une des raisons principales tient au contraste observé entre les données obtenues sur des modèles précliniques et les données de vie réelle. En prenant pour exemple la co-altération de la voie RAS identifiée chez des patients porteurs de CBNPC METex14, des données publiées par Guo *et al.* n'ont pas mis en évidence de différence de survie et de taux de réponse selon le statut RAS de la tumeur chez des patients traités par ITK MET. Ce contraste entre les données cliniques et fondamentales repose essentiellement sur l'hétérogénéité intratumorale définie par la présence de plusieurs populations cellulaires dont les anomalies moléculaires diffèrent au sein d'une même tumeur (Hinohara et Polyak 2019). En effet, il n'est pas rare d'observer la présence d'une co-altération sur une fraction de la tumeur analysée, suggérant qu'une partie de la tumeur ne porte pas de co-altération susceptible de conférer une résistance.

7.4 Conclusion

En conclusion, ce travail de thèse a permis d'identifier une nouvelle voie de résistance aux ITK MET dans les CBNPC METex14 et de proposer une stratégie thérapeutique afin de surmonter ce mécanisme. Ce travail de thèse a également offert l'opportunité de confirmer la fusion de

MET comme une cible potentielle et d'identifier la mutation kinase de MET comme mécanisme de résistance acquise, dans un autre modèle d'addiction à MET. Enfin, il a donné la possibilité d'évaluer la faisabilité et la pertinence de la recherche de mutations de résistance dans les CBNPC ALK+. Ces résultats illustrent la nécessité de poursuivre dans la recherche des mécanismes de résistance afin de proposer des stratégies thérapeutiques innovantes.

8 Reference

- Abella, Jasmine V, Pascal Peschard, Monica A Naujokas, Tong Lin, Caroline Saucier, Sylvie Urbé, and Morag Park. 2005. "Met/Hepatocyte Growth Factor Receptor Ubiquitination Suppresses Transformation and Is Required for Hrs Phosphorylation." *Molecular and Cellular Biology* 25 (21): 9632–45. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.21.9632-9645.2005>.
- Aisner, Dara L., Lynette M. Sholl, Lynne D. Berry, Michael R. Rossi, Heidi Chen, Junya Fujimoto, Andre L. Moreira, et al. 2018. "The Impact of Smoking and TP53 Mutations in Lung Adenocarcinoma Patients with Targetable Mutations—The Lung Cancer Mutation Consortium (LCMC2)." *Clinical Cancer Research* 24 (5): 1038–47. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-17-2289>.
- Ancot, Frédéric, Catherine Leroy, Ghaffar Muharram, Jonathan Lefebvre, Jérôme Vicogne, Arnaud Lemiere, Zoulika Kherrouche, et al. 2012. "Shedding-Generated Met Receptor Fragments Can Be Routed to Either the Proteasomal or the Lysosomal Degradation Pathway." *Traffic* 13 (9): 1261–72. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2012.01384.x>.
- Andermarcher, E., M. A. Surani, and E. Gherardi. 1996. "Co-Expression of the HGF/SF and c-Met Genes during Early Mouse Embryogenesis Precedes Reciprocal Expression in Adjacent Tissues during Organogenesis." *Developmental Genetics* 18 (3): 254–66. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1520-6408\(1996\)18:3<254::AID-DVG6>3.0.CO;2-8](https://doi.org/10.1002/(SICI)1520-6408(1996)18:3<254::AID-DVG6>3.0.CO;2-8).
- Asses, Yasmine, Vincent Leroux, Safia Tairi-Kellou, Rosanna Dono, Flavio Maina, and Bernard Maigret. 2009. "Analysis of C-Met Kinase Domain Complexes: A New Specific Catalytic Site Receptor Model for Defining Binding Modes of Atp-Competitive Ligands." *Chemical Biology and Drug Design* 74 (6): 560–70. <https://doi.org/10.1111/j.1747-0285.2009.00895.x>.
- Awad, Mark M., Magda Bahcall, Lynette M. Sholl, Frederick Hugh Wilson, Cloud Paweletz, Marzia Capelletti, Giulia Costanza Leonardi, et al. 2018. "Mechanisms of Acquired Resistance to MET Tyrosine Kinase Inhibitors (TKIs) in MET Exon 14 (METex14) Mutant Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC)." *Journal of Clinical Oncology* 36 (15_suppl): 9069–9069. https://doi.org/10.1200/JCO.2018.36.15_suppl.9069.
- Awad, Mark M., Jessica Kim Lee, Russell Madison, Anthony Classon, Jamie Kmak, Garrett M. Frampton, Brian Michael Alexander, Jeffrey Venstrom, and Alexa Betzig Schrock. 2020. "Characterization of 1,387 NSCLCs with MET Exon 14 (METex14) Skipping Alterations (SA) and Potential Acquired Resistance (AR) Mechanisms." *Journal of Clinical Oncology* 38 (15_suppl): 9511–9511. https://doi.org/10.1200/jco.2020.38.15_suppl.9511.
- Awad, Mark M, Geoffrey R Oxnard, David M Jackman, Daniel O Savukoski, Dimity Hall, Priyanka Shivdasani, Jennifer C Heng, et al. 2016. "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." *Journal of Clinical Oncology* 34 (7): JCO.2015.63.4600-. <https://doi.org/10.1200/JCO.2015.63.4600>.
- Ayati, Adileh, Setareh Moghimi, Somayeh Salarinejad, Maliheh Safavi, Behjat Pouramiri, and Alireza Foroumadi. 2020. "A Review on Progression of Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Inhibitors as an Efficient Approach in Cancer Targeted Therapy." *Bioorganic Chemistry*. Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.103811>.
- Bahcall, Magda, Mark M. Awad, Lynette M. Sholl, Frederick H Wilson, Man Xu, Stephen Wang, Sangeetha Palakurthi, et al. 2018. "Amplification of Wild Type KRAS Imparts Resistance to Crizotinib in MET Exon 14 Mutant Non-Small Cell Lung Cancer." *Clinical Cancer Research*, August, clincanres.0876.2018. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-0876>.
- Baldacci, Simon, Zoulika Kherrouche, Vincent Cockenpot, Luc Stoven, Marie Christine Copin, Elisabeth Werkmeister, Nathalie Marchand, Maéva Kyheng, David Tulasne, and Alexis B. Cortot. 2018. "MET Amplification Increases the Metastatic Spread of EGFR-Mutated NSCLC." *Lung Cancer* 125 (November): 57–67.

- <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2018.09.008>.
- Baltschukat, Sabrina, Barbara Schacher Engstler, Alan Huang, Huai-Xiang Hao, Angela Tam, Hui Qin Wang, Jinsheng Liang, et al. 2019. "Capmatinib (INC280) Is Active Against Models of Non-Small Cell Lung Cancer and Other Cancer Types with Defined Mechanisms of *MET* Activation." *Clinical Cancer Research*, January, clincanres.2814.2018. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-2814>.
- Bao, Zhao Shi, Hui Min Chen, Ming Yu Yang, Chuan Bao Zhang, Kai Yu, Wan Lu Ye, Bo Qiang Hu, et al. 2014. "RNA-Seq of 272 Gliomas Revealed a Novel, Recurrent PTPRZ1-MET Fusion Transcript in Secondary Glioblastomas." *Genome Research* 24 (11): 1765–73. <https://doi.org/10.1101/gr.165126.113>.
- Barrueto, Luisa, Franchesca Caminero, Lindsay Cash, Courtney Makris, Purushottam Lamichhane, and Rahul R. Deshmukh. 2020. "Resistance to Checkpoint Inhibition in Cancer Immunotherapy." *Translational Oncology*. Neoplasia Press, Inc. <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2019.12.010>.
- Bent, Martin van den, Analia Azaro, Filip Vos, Juan Sepulveda, W K Alfred Yung, Patrick Wen, Andrew Lassman, et al. 2017. "ACTR-74. A PHASE IB/II, OPEN-LABEL, MULTICENTER STUDY OF CAPMATINIB (INC280) ALONE AND IN COMBINATION WITH BUPARLISIB (BKM120) IN ADULT PATIENTS WITH RECURRENT GLIOBLASTOMA." *Neuro-Oncology* 19 (suppl_6): vi16–17. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nox168.061>.
- Birchmeier, Carmen, Walter Birchmeier, Ermanno Gherardi, and George F Vande Woude. 2003. "Met, Metastasis, Motility and More." *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 4 (12): 915–25. <https://doi.org/10.1038/nrm1261>.
- Blanc-Durand, Félix, Raafat Alameddine, Anthony J Iafrate, Danh Tran-Thanh, Ying-Chun Lo, Normand Blais, Bertrand Routy, et al. 2020. "Tepotinib Efficacy in an NSCLC Patient with Brain Metastasis Harboring an HLA-DRB1-MET Gene Fusion." *The Oncologist*, July. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2020-0502>.
- Bleeker, F E, L Felicioni, F Buttitta, S Lamba, L Cardone, M Rodolfo, A Scarpa, et al. 2008. "AKT1E17K in Human Solid Tumours." *Oncogene* 27 (42): 5648–50. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.170>.
- Boccaccio, Carla, Margherita Andò, Luca Tamagnone, Alberto Bardelli, Paolo Michieli, Carlo Battistini, and Paolo M. Comoglio. 1998. "Induction of Epithelial Tubules by Growth Factor HGF Depends on the STAT Pathway." *Nature* 391 (6664): 285–88. <https://doi.org/10.1038/34657>.
- Bononi, Angela, and Paolo Pinton. 2015. "Study of PTEN Subcellular Localization." *Methods (San Diego, Calif.)* 77–78 (May): 92–103. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2014.10.002>.
- Bos, Johannes L., Holger Rehmann, and Alfred Wittinghofer. 2007. "GEFs and GAPs: Critical Elements in the Control of Small G Proteins." *Cell* 129 (5): 865–77. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2007.05.018>.
- Boumber, Yanis. 2018. "Tumor Mutational Burden (TMB) as a Biomarker of Response to Immunotherapy in Small Cell Lung Cancer." *Journal of Thoracic Disease*. AME Publishing Company. <https://doi.org/10.21037/jtd.2018.07.120>.
- Bussolino, F., M. F. Di Renzo, M. Ziche, E. Bocchietto, M. Olivero, L. Naldini, G. Gaudino, L. Tamagnone, A. Coffey, and P. M. Comoglio. 1992. "Hepatocyte Growth Factor Is a Potent Angiogenic Factor Which Stimulates Endothelial Cell Motility and Growth." *Journal of Cell Biology* 119 (3): 629–41. <https://doi.org/10.1083/jcb.119.3.629>.
- Calvi, Carla, Megan Podowski, Armando Lopez-Mercado, Shana Metzger, Kaori Misono, Alla Malinina, Dustin Dikeman, et al. 2013. "Hepatocyte Growth Factor, a Determinant of Airspace Homeostasis in the Murine Lung." Edited by Steven D. Shapiro. *PLoS Genetics* 9 (2): e1003228. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003228>.
- Camidge, D. Ross, Fabrice Barlesi, Jonathan Wade Goldman, Daniel Morgensztern, Rebecca Suk Heist, Everett E. Vokes, Alexander I. Spira, et al. 2019. "Results of the Phase 1b Study of ABBV-399 (Telisotuzumab Vedotin; Teliso-v) in Combination with Erlotinib in Patients with c-Met+ Non-Small Cell Lung Cancer by EGFR Mutation Status." *Journal of Clinical Oncology* 37 (15_suppl): 3011–3011. https://doi.org/10.1200/jco.2019.37.15_suppl.3011.
- Camidge, D. Ross, Hye Ryun Kim, Myung-Ju Ahn, James Chih-Hsin Yang, Ji-Youn Han, Jong-Seok Lee, Maximilian J. Hochmair,

- et al. 2018. "Brigatinib versus Crizotinib in ALK-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer." *New England Journal of Medicine* 379 (21): 2027–39. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1810171>.
- Camidge, D. Ross, Sai-Hong Ignatius Ou, Geoffrey Shapiro, Gregory Alan Otterson, Liza Cosca Villaruz, Miguel Angel Villalona-Calero, A. John Iafrate, et al. 2014. "Efficacy and Safety of Crizotinib in Patients with Advanced C-MET - Amplified Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC)." *Journal of Clinical Oncology* 32 (15_suppl): 8001–8001. https://doi.org/10.1200/jco.2014.32.15_suppl.8001.
- Camidge, D Ross, Yung-Jue Bang, Eunice L Kwak, A John Iafrate, Marileila Varella-Garcia, Stephen B Fox, Gregory J Riely, et al. 2012. "Activity and Safety of Crizotinib in Patients with ALK-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer: Updated Results from a Phase 1 Study." *The Lancet Oncology* 13 (10): 1011–19. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(12\)70344-3](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(12)70344-3).
- Castellano, Esther, and Julian Downward. 2011. "RAS Interaction with PI3K: More Than Just Another Effector Pathway." *Genes & Cancer* 2 (3): 261–74. <https://doi.org/10.1177/1947601911408079>.
- Chang, Sunhee, Jae Young Hur, Yoon La Choi, Chang Hun Lee, and Wan Seop Kim. 2020. "Current Status and Future Perspectives of Liquid Biopsy in Non-Small Cell Lung Cancer." *Journal of Pathology and Translational Medicine* 54 (3): 204–12. <https://doi.org/10.4132/jptm.2020.02.27>.
- "Chemotherapy and Supportive Care versus Supportive Care Alone for Advanced Non-Small Cell Lung Cancer." 2010. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, May. <https://doi.org/10.1002/14651858.cd007309.pub2>.
- Chen, Hui Min, Kai Yu, Xiao Yan Tang, Zhao Shi Bao, Tao Jiang, Xiao Long Fan, Xiao Wei Chen, and Xiao Dong Su. 2015. "Enhanced Expression and Phosphorylation of the MET Oncoprotein by Glioma-Specific PTPRZ1-MET Fusions." *FEBS Letters* 589 (13): 1437–43. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2015.04.032>.
- Chen, Ya Wen, Zhenghong Xu, Adrienne N.H. Baksh, Jehng Kang Wang, Chiu Yuan Chen, Richard Swanson, Steve T. Olson, Hiroaki Kataoka, Michael D. Johnson, and Chen Yong Lin. 2013. "Antithrombin Regulates Matriptase Activity Involved in Plasmin Generation, Syndecan Shedding, and HGF Activation in Keratinocytes." *PLoS ONE* 8 (5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062826>.
- Chiarle, Roberto, Claudia Voena, Chiara Ambrogio, Roberto Piva, and Giorgio Inghirami. 2008. "The Anaplastic Lymphoma Kinase in the Pathogenesis of Cancer." *Nature Reviews Cancer* 8 (1): 11–23. <https://doi.org/10.1038/nrc2291>.
- Cho, Byoung Chul, Alexander E. Drilon, Robert Charles Doebele, Dong-Wan Kim, Jessica Jiyeong Lin, Jeeyun Lee, Myung-Ju Ahn, et al. 2019. "Safety and Preliminary Clinical Activity of Repotrectinib in Patients with Advanced ROS1 Fusion-Positive Non-Small Cell Lung Cancer (TRIDENT-1 Study)." *Journal of Clinical Oncology* 37 (15_suppl): 9011–9011. https://doi.org/10.1200/jco.2019.37.15_suppl.9011.
- Cho, Byoung Chul, Sun Min Lim, Hye Ryun Kim, Jong Seok Lee, Ki Hyeong Lee, Yun Gyoo Lee, Young Joo Min, et al. 2017. "Open-Label, Multicenter, Phase II Study of Ceritinib in Patients with Non-Small-Cell Lung Cancer Harboring ROS1 Rearrangement." *Journal of Clinical Oncology* 35 (23): 2613–18. <https://doi.org/10.1200/JCO.2016.71.3701>.
- Choi, Young Lim, Manabu Soda, Yoshihiro Yamashita, Toshihide Ueno, Junpei Takashima, Takahiro Nakajima, Yasushi Yatabe, et al. 2010. "EML4-ALK Mutations in Lung Cancer That Confer Resistance to ALK Inhibitors." *New England Journal of Medicine* 363 (18): 1734–39. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1007478>.
- Chouaid, Christos, Cecile Dujon, Pascal Do, Isabelle Monnet, Anne Madroszyk, Herve Le Caer, Jean Bernard Auliac, et al. 2014. "Feasibility and Clinical Impact of Re-Biopsy in Advanced Non Small-Cell Lung Cancer: A Prospective Multicenter Study in a Real-World Setting (GFPC Study 12-01)." *Lung Cancer* 86 (2): 170–73. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2014.08.016>.
- Chowdhury, Tamrin, Yeajina Lee, Sojin Kim, Hyeon Jong Yu, So Young Ji, Jeong Mo Bae, Jae Kyung Won, et al. 2020. "A Glioneuronal Tumor with CLIP2-MET Fusion." *Npj Genomic Medicine* 5 (1): 1–7. <https://doi.org/10.1038/s41525-020-0131-6>.

- Cocco, Emiliano, Maurizio Scaltriti, and Alexander Drilon. 2018. "NTRK Fusion-Positive Cancers and TRK Inhibitor Therapy." *Nature Reviews Clinical Oncology*. Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/s41571-018-0113-0>.
- Cooper, Colin S., Morag Park, Donald G. Blair, Michael A. Tainsky, Kay Huebner, Carlo M. Croce, and George F. Vande Woude. 1984. "Molecular Cloning of a New Transforming Gene from a Chemically Transformed Human Cell Line." *Nature* 311 (5981): 29–33. <https://doi.org/10.1038/311029a0>.
- Cortot, A. B., and P. A. Janne. 2014a. "Molecular Mechanisms of Resistance in Epidermal Growth Factor Receptor-Mutant Lung Adenocarcinomas." *European Respiratory Review* 23 (133): 356–66. <https://doi.org/10.1183/09059180.00004614>.
- . 2014b. "Molecular Mechanisms of Resistance in Epidermal Growth Factor Receptor-Mutant Lung Adenocarcinomas." *European Respiratory Review* 23 (133): 356–66. <https://doi.org/10.1183/09059180.00004614>.
- Cortot, Alexis B., Zoulika Kherrouche, Clotilde Descarpentries, Marie Wislez, Simon Baldacci, Alessandro Furlan, and David Tulasne. 2017. "Exon 14 Deleted MET Receptor as a New Biomarker and Target in Cancers." *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* 109 (5). <https://doi.org/10.1093/jnci/djw262>.
- Cramer, Alexander, Sandra Kleiner, Martin Westermann, Anja Meissner, Anika Lange, and Karlheinz Friedrich. 2005. "Activation of the C-Met Receptor Complex in Fibroblasts Drives Invasive Cell Behavior by Signaling through Transcription Factor STAT3." *Journal of Cellular Biochemistry* 95 (4): 805–16. <https://doi.org/10.1002/jcb.20459>.
- Crystal, Adam S., Alice T. Shaw, Lecia V. Sequist, Luc Friboulet, Matthew J. Niederst, Elizabeth L. Lockerman, Rosa L. Frias, et al. 2014. "Patient-Derived Models of Acquired Resistance Can Identify Effective Drug Combinations for Cancer." *Science* 346 (6216): 1480–86. <https://doi.org/10.1126/science.1254721>.
- Cutsem, Eric Van, Boguslawa Karaszewska, Yoon Koo Kang, Hyun Cheol Chung, Veena Shankaran, Salvatore Siena, Ning F. Go, Hui Yang, Marco Schupp, and David Cunningham. 2019. "A Multicenter Phase II Study of AMG 337 in Patients with MET-Amplified Gastric/Gastroesophageal Junction/Esophageal Adenocarcinoma and Other MET-Amplified Solid Tumors." *Clinical Cancer Research* 25 (8): 2414–23. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-1337>.
- Dagogo-Jack, I, and A T Shaw. 2016. "Crizotinib Resistance: Implications for Therapeutic Strategies." *Annals of Oncology : Official Journal of the European Society for Medical Oncology* 27 Suppl 3 (Suppl 3): iii42–50. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdw305>.
- Dagogo-Jack, Ibiayi, Satoshi Yoda, Jochen K. Lennerz, Adam Langenbucher, Jessica J. Lin, Marguerite M. Rooney, Kylie Prutisto-Chang, et al. 2020. "MET Alterations Are a Recurring and Actionable Resistance Mechanism in ALK-Positive Lung Cancer." *Clinical Cancer Research* 26 (11): 2535–45. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-19-3906>.
- Davies, Kurtis D., and Robert C. Doebele. 2013. "Molecular Pathways: ROS1 Fusion Proteins in Cancer." *Clinical Cancer Research* 19 (15): 4040–45. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-2851>.
- Davies, Kurtis D., Terry L. Ng, Adriana Estrada-Bernal, Anh T. Le, Peter R. Ennever, D. Ross Camidge, Robert C. Doebele, and Dara L. Aisner. 2017. "Dramatic Response to Crizotinib in a Patient With Lung Cancer Positive for an HLA-DRB1-MET Gene Fusion." *JCO Precision Oncology* 2017 (1): 1–6. <https://doi.org/10.1200/po.17.00117>.
- Descarpentries, C., F. Leprêtre, F. Escande, Z. Kherrouche, M. Figeac, S. Sebda, S. Baldacci, et al. 2018. "Optimization of Routine Testing for MET Exon 14 Splice Site Mutations in NSCLC Patients." *Journal of Thoracic Oncology* 13 (12). <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2018.08.2023>.
- Descarpentries, Clotilde, Frédéric Leprêtre, Fabienne Escande, Zoulika Kherrouche, Martin Figeac, Shéhérazade Sebda, Simon Baldacci, et al. 2018. "Optimization of Routine Testing for MET Exon 14 Splice Site Mutations in Non-Small Cell Lung Cancer Patients." *Journal of Thoracic Oncology*, September. <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2018.08.2023>.
- Do, Hongdo, Benjamin Solomon, Paul L Mitchell, Stephen B Fox, and Alexander Dobrovic. 2008. "Detection of the Transforming AKT1 Mutation E17K in Non-Small Cell Lung Cancer by High Resolution Melting." *BMC Research Notes* 1

(1): 14. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-1-14>.

- Doebele, Robert C., Amanda B. Pilling, Dara L. Aisner, Tatiana G. Kutateladze, Anh T. Le, Andrew J. Weickhardt, Kimi L. Kondo, et al. 2012. "Mechanisms of Resistance to Crizotinib in Patients with ALK Gene Rearranged Non-Small Cell Lung Cancer." *Clinical Cancer Research* 18 (5). <http://clincancerres.aacrjournals.org/content/18/5/1472.long>.
- Dong, Hua-Jie, Peng Li, Chang-Ling Wu, Xiao-Yue Zhou, Hong-Jun Lu, and Tong Zhou. 2016. "Response and Acquired Resistance to Crizotinib in Chinese Patients with Lung Adenocarcinomas Harboring MET Exon 14 Splicing Alternations." *Lung Cancer* 102 (December): 118–21. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2016.11.006>.
- Drilon, A., J. Clark, J. Weiss, S. Ou, D.R. Camidge, B. Solomon, G. Otterson, et al. 2018a. "OA12.02 Updated Antitumor Activity of Crizotinib in Patients with MET Exon 14-Altered Advanced Non-Small Cell Lung Cancer." *Journal of Thoracic Oncology* 13 (10): S348. <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2018.08.300>.
- . 2018b. "OA12.02 Updated Antitumor Activity of Crizotinib in Patients with MET Exon 14-Altered Advanced Non-Small Cell Lung Cancer." *Journal of Thoracic Oncology* 13 (10): S348. <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2018.08.300>.
- Drilon, Alexander, Federico Cappuzzo, Sai Hong Ignatius Ou, and D. Ross Camidge. 2017. "Targeting MET in Lung Cancer: Will Expectations Finally Be MET?" *Journal of Thoracic Oncology*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2016.10.014>.
- Drilon, Alexander, Theodore W. Laetsch, Shivaani Kummar, Steven G. DuBois, Ulrik N. Lassen, George D. Demetri, Michael Nathanson, et al. 2018. "Efficacy of Larotrectinib in TRK Fusion-Positive Cancers in Adults and Children ." *New England Journal of Medicine* 378 (8): 731–39. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1714448>.
- Drilon, Alexander, Geoffrey R. Oxnard, Daniel S.W. Tan, Herbert H.F. Loong, Melissa Johnson, Justin Gainor, Caroline E. McCoach, et al. 2020. "Efficacy of Selpercatinib in RET Fusion-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer ." *New England Journal of Medicine* 383 (9): 813–24. <https://doi.org/10.1056/nejmoa2005653>.
- Drilon, Alexander, Natasha Rekhtman, Maria Arcila, Lu Wang, Andy Ni, Melanie Albano, Martine Van Voorthuysen, et al. 2016. "Cabozantinib in Patients with Advanced RET-Rearranged Non-Small-Cell Lung Cancer: An Open-Label, Single-Centre, Phase 2, Single-Arm Trial." *The Lancet Oncology* 17 (12): 1653–60. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(16\)30562-9](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(16)30562-9).
- Drilon, Alexander, Salvatore Siena, Sai Hong Ignatius Ou, Manish Patel, Myung Ju Ahn, Jeeyun Lee, Todd M. Bauer, et al. 2017. "Safety and Antitumor Activity of the Multitargeted Pan-TRK, ROS1, and ALK Inhibitor Entrectinib: Combined Results from Two Phase I Trials (ALKA-372-001 and STARTRK-1)." *Cancer Discovery* 7 (4): 400–409. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-16-1237>.
- Drilon, Alexander, Lu Wang, Maria E. Arcila, Sohail Balasubramanian, Joel R. Greenbowe, Jeffrey S. Ross, Phil Stephens, et al. 2015. "Broad, Hybrid Capture-Based next-Generation Sequencing Identifies Actionable Genomic Alterations in Lung Adenocarcinomas Otherwise Negative for Such Alterations by Other Genomic Testing Approaches." *Clinical Cancer Research* 21 (16): 3631–39. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-2683>.
- Druker, Brian J., Moshe Talpaz, Debra J. Resta, Bin Peng, Elisabeth Buchdunger, John M. Ford, Nicholas B. Lydon, et al. 2001. "Efficacy and Safety of a Specific Inhibitor of the BCR-ABL Tyrosine Kinase in Chronic Myeloid Leukemia." *New England Journal of Medicine* 344 (14): 1031–37. <https://doi.org/10.1056/nejm200104053441401>.
- Du, Xue, Yun Shao, Hai Feng Qin, Yan Hong Tai, and Hong Jun Gao. 2018. "ALK-Rearrangement in Non-Small-Cell Lung Cancer (NSCLC)." *Thoracic Cancer* 9 (4): 423–30. <https://doi.org/10.1111/1759-7714.12613>.
- Duh, Fuh Mei, Stephen W. Scherer, Lap Chee Tsui, Michael I. Lerman, Berton Zbar, and Laura Schmidt. 1997. "Gene Structure of the Human MET Proto-Oncogene." *Oncogene* 15 (13): 1583–86. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1201338>.
- Duplaquet, Leslie, Catherine Leroy, Audrey Vinchent, Sonia Paget, Jonathan Lefebvre, Fabien Vanden Abeele, Steve Lancel, et al. 2020. "Control of Cell Death/Survival Balance by the Met Dependence Receptor." *ELife* 9 (February).

<https://doi.org/10.7554/eLife.50041>.

- Duruiseaux, Michaël, Benjamin Besse, Jacques Cadranel, Maurice Pérol, Bertrand Mennequier, Laurence Bigay-Game, Renaud Descourt, et al. 2017. "Overall Survival with Crizotinib and Next-Generation ALK Inhibitors in ALK-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer (IFCT-1302 CLINALK): A French Nationwide Cohort Retrospective Study." *Oncotarget* 8 (13): 21903–17. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.15746>.
- Eifert, Cheryl, and R. Scott Powers. 2012. "From Cancer Genomes to Oncogenic Drivers, Tumour Dependencies and Therapeutic Targets." *Nature Reviews Cancer*. Nat Rev Cancer. <https://doi.org/10.1038/nrc3299>.
- Endoh, Hideki, Yasushi Yatabe, Takayuki Kosaka, Hiroyuki Kuwano, and Tetsuya Mitsudomi. 2006. "PTEN and PIK3CA Expression Is Associated with Prolonged Survival after Gefitinib Treatment in EGFR-Mutated Lung Cancer Patients." *Journal of Thoracic Oncology : Official Publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* 1 (7): 629–34. [https://doi.org/10.1016/S1556-0864\(15\)30374-9](https://doi.org/10.1016/S1556-0864(15)30374-9).
- Eng, Juliana, Kaitlin M. Woo, Camelia S. Sima, Andrew Plodkowski, Matthew D. Hellmann, Jamie E. Chaft, Mark G. Kris, Maria E. Arcila, Marc Ladanyi, and Alexander Drilon. 2015. "Impact of Concurrent PIK3CA Mutations on Response to EGFR Tyrosine Kinase Inhibition in EGFR-Mutant Lung Cancers and on Prognosis in Oncogene-Driven Lung Adenocarcinomas." *Journal of Thoracic Oncology* 10 (12): 1713–19. <https://doi.org/10.1097/JTO.0000000000000671>.
- Engelman, J. A., T. Mukohara, K. Zejnullahu, E. Lifshits, A. M. Borrás, C.-M. Gale, G. N. Naumov, et al. 2006. "Allelic Dilution Obscures Detection of a Biologically Significant Resistance Mutation in EGFR-Amplified Lung Cancer." *Journal of Clinical Investigation* 116 (10): 2695–2706. <https://doi.org/10.1172/JCI28656>.
- Engelman, Jeffrey A., Ji Luo, and Lewis C. Cantley. 2006. "The Evolution of Phosphatidylinositol 3-Kinases as Regulators of Growth and Metabolism." *Nature Reviews Genetics* 7 (8): 606–19. <https://doi.org/10.1038/nrg1879>.
- Engstrom, Lars D., Ruth Aranda, Matthew Lee, Elizabeth A. Tovar, Curt J. Essenburg, Zachary Madaj, Harrah Chiang, et al. 2017. "Glesatinib Exhibits Antitumor Activity in Lung Cancer Models and Patients Harboring MET Exon 14 Mutations and Overcomes Mutation-Mediated Resistance to Type I MET Inhibitors in Nonclinical Models." *Clinical Cancer Research* 23 (21): 6661–72. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-17-1192>.
- Ettl, Tobias, Sandra Viale-Bouroncle, Matthias G. Hautmann, Martin Gosau, Oliver Kölbl, Torsten E. Reichert, and Christian Morsczeck. 2015. "AKT and MET Signalling Mediates Antiapoptotic Radioresistance in Head Neck Cancer Cell Lines." *Oral Oncology* 51 (2): 158–63. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2014.11.005>.
- Fan, Saijun, Yong Xian Ma, Min Gao, Ren-Qi Yuan, Qinghui Meng, Itzhak D. Goldberg, and Eliot M. Rosen. 2001. "The Multisubstrate Adapter Gab1 Regulates Hepatocyte Growth Factor (Scatter Factor)–c-Met Signaling for Cell Survival and DNA Repair." *Molecular and Cellular Biology* 21 (15): 4968–84. <https://doi.org/10.1128/mcb.21.15.4968-4984.2001>.
- Fang, Wenfeng, Yihua Huang, Weiguang Gu, Jiadi Gan, Wenjing Wang, Shiyue Zhang, Kai Wang, et al. 2020. "PI3K-AKT-MTOR Pathway Alterations in Advanced NSCLC Patients after Progression on EGFR-TKI and Clinical Response to EGFR-TKI plus Everolimus Combination Therapy." *Translational Lung Cancer Research* 9 (4): 1258–67. <https://doi.org/10.21037/tlcr-20-141>.
- Felip, Enriqueta, Leora Horn, Jyoti D. Patel, Hiroshi Sakai, Jürgen Scheele, Rolf Bruns, and Paul K. Paik. 2018. "Tepotinib in Patients with Advanced Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC) Harboring MET Exon 14-Skipping Mutations: Phase II Trial." *Journal of Clinical Oncology* 36 (15_suppl): 9016–9016. https://doi.org/10.1200/JCO.2018.36.15_suppl.9016.
- Felip Font, E., A.T. Shaw, B.J. Solomon, T.M. Bauer, S.-H.I. Ou, S. Gadgeel, R.A. Soo, et al. 2017. "Efficacy and Safety of Lorlatinib in Patients (Pts) with ALK+ Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC) Previously Treated with 2nd-Generation ALK TKIs." *Annals of Oncology* 28 (September): v478–79. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdx380.045>.
- Finocchiaro, Giovanna, Luca Toschi, Letizia Gianoncelli, Marina Baretta, and Armando Santoro. 2015. "Prognostic and

- Predictive Value of MET Deregulation in Non-Small Cell Lung Cancer." *Annals of Translational Medicine*. AME Publishing Company. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2305-5839.2015.03.43>.
- Fixman, Elizabeth D., Tanya M. Fournier, Darren M. Kamikura, Monica A. Naujokas, and Morag Park. 1996. "Pathways Downstream of Shc and Grb2 Are Required for Cell Transformation by the Tpr-Met Oncoprotein." *Journal of Biological Chemistry* 271 (22): 13116–22. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.22.13116>.
- Fontana, Diletta, Monica Ceccon, Carlo Gambacorti-Passerini, and Luca Mologni. 2015. "Activity of Second-Generation ALK Inhibitors against Crizotinib-Resistant Mutants in an NPM-ALK Model Compared to EML4-ALK." *Cancer Medicine* 4 (7): 953–65. <https://doi.org/10.1002/cam4.413>.
- Foveau, Bénédicte, Frédéric Ancot, Catherine Leroy, Annalisa Petrelli, Karina Reiss, Valérie Vingtdoux, Silvia Giordano, Véronique Fafeur, and David Tulasne. 2009. "Down-Regulation of the Met Receptor Tyrosine Kinase by Presenilin-Dependent Regulated Intramembrane Proteolysis." *Molecular Biology of the Cell* 20 (9): 2495–2507. <https://doi.org/10.1091/mbc.E08-09-0969>.
- Frampton, Garrett M, Siraj M Ali, Mark Rosenzweig, Juliann Chmielecki, Xinyuan Lu, Todd M Bauer, Mikhail Akimov, et al. 2015. "Activation of MET via Diverse Exon 14 Splicing Alterations Occurs in Multiple Tumor Types and Confers Clinical Sensitivity to MET Inhibitors." *Cancer Discovery* 5 (8): 850–59. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-15-0285>.
- Friboulet, Luc, Nanxin Li, Ryohei Katayama, Christian C. Lee, Justin F. Gainor, Adam S. Crystal, Pierre-Yves Michellys, et al. 2014. "The ALK Inhibitor Ceritinib Overcomes Crizotinib Resistance in Non-Small Cell Lung Cancer." *Cancer Discovery* 4 (6). <http://cancerdiscovery.aacrjournals.org/content/4/6/662.long>.
- Fruman, David A., Honyin Chiu, Benjamin D. Hopkins, Shubha Bagrodia, Lewis C. Cantley, and Robert T. Abraham. 2017. "The PI3K Pathway in Human Disease." *Cell* 170 (4): 605–35. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.07.029>.
- Fujino, Toshio, Yoshihisa Kobayashi, Kenichi Suda, Takamasa Koga, Masaya Nishino, Shuta Ohara, Masato Chiba, et al. 2019. "Sensitivity and Resistance of MET Exon 14 Mutations in Lung Cancer to Eight MET Tyrosine Kinase Inhibitors In Vitro." *Journal of Thoracic Oncology* 14 (10): 1753–65. <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2019.06.023>.
- Fukuyama, Ryuichi, Yuuka Ichijoh, Shinsei Minoshima, Naomi Kitamura, and Nobuyoshi Shimizu. 1991. "Regional Localization of the Hepatocyte Growth Factor (HGF) Gene to Human Chromosome 7 Band Q21.1." *Genomics* 11 (2): 410–15. [https://doi.org/10.1016/0888-7543\(91\)90149-9](https://doi.org/10.1016/0888-7543(91)90149-9).
- Gainor, Justin F., Dae Ho Lee, Giuseppe Curigliano, Robert Charles Doebele, Dong-Wan Kim, Christina S Baik, Daniel Shao-Weng Tan, et al. 2019. "Clinical Activity and Tolerability of BLU-667, a Highly Potent and Selective RET Inhibitor, in Patients (Pts) with Advanced RET-Fusion+ Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC)." *Journal of Clinical Oncology* 37 (15_suppl): 9008–9008. https://doi.org/10.1200/jco.2019.37.15_suppl.9008.
- Gainor, Justin F, Leila Dardaei, Satoshi Yoda, Luc Friboulet, Ignaty Leshchiner, Ryohei Katayama, Ibiayi Dagogo-Jack, et al. 2016. "Molecular Mechanisms of Resistance to First- and Second-Generation ALK Inhibitors in ALK-Rearranged Lung Cancer." *Cancer Discovery* 6 (10): 1118–33. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-16-0596>.
- Gandino, Lucia, Paola Longatis, Enzo Medico, Maria Prat, and Paolo M Comoglio. 1994. "Phosphorylation of Serine 985 Negatively Regulates the Hepatocyte Growth Factor Receptor Kinase*." *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*. Vol. 269.
- Garcia-Guzman, Miguel, Fabrizio Dolfi, Karin Zeh, and Kristiina Vuori. 1999. "Met-Induced JNK Activation Is Mediated by the Adapter Protein Crk and Correlates with the Gab1-Crk Signaling Complex Formation." *Oncogene* 18 (54): 7775–86. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1203198>.
- Gettinger, Scott N, Lyudmila A Bazhenova, Corey J Langer, Ravi Salgia, Kathryn A Gold, Rafael Rosell, Alice T Shaw, et al. 2016. "Activity and Safety of Brigatinib in ALK-Rearranged Non-Small-Cell Lung Cancer and Other Malignancies: A Single-Arm, Open-Label, Phase 1/2 Trial." *The Lancet. Oncology* 17 (12): 1683–96. [117](https://doi.org/10.1016/S1470-</p>
</div>
<div data-bbox=)

2045(16)30392-8.

- Ghadjar, Pirus, Wieslawa Blank-Liss, Mathew Simcock, Ivan Hegyi, Karl T. Beer, Holger Moch, Daniel M. Aebersold, and Yitzhak Zimmer. 2009. "MET Y1253D-Activating Point Mutation and Development of Distant Metastasis in Advanced Head and Neck Cancers." *Clinical and Experimental Metastasis* 26 (7): 809–15. <https://doi.org/10.1007/s10585-009-9280-9>.
- Giordano, S., C. Ponzetto, M. F. Di Renzo, C. S. Cooper, and P. M. Comoglio. 1989. "Tyrosine Kinase Receptor Indistinguishable from the C-Met Protein." *Nature* 339 (6220): 155–56. <https://doi.org/10.1038/339155a0>.
- Girard, Nicolas. 2015. "Is Chemotherapy Still an Option in Oncogene-Addicted Non-Small Cell Lung Cancer? No." *Bulletin Du Cancer* 102 (6): S96–99. [https://doi.org/10.1016/s0007-4551\(15\)31225-x](https://doi.org/10.1016/s0007-4551(15)31225-x).
- Girard, Nicolas, Denis Moro-Sibilot, Stéphane Bouée, Corinne Emery, Elodie Torreton, Katell Le Lay, Laura Luciani, Christophe Maritaz, and Christos Chouaid. 2020. "Treatment Sequence of First and Second Generation Tyrosine Kinase Inhibitor Followed by Osimertinib in EGFR-Mutated Non-Small-Cell Lung Cancer: A Real Life Study." *Future Oncology* 16 (16): 1115–24. <https://doi.org/10.2217/fo-2020-0084>.
- Goncalves, Marcus D., Benjamin D. Hopkins, and Lewis C. Cantley. 2018. "Phosphatidylinositol 3-Kinase, Growth Disorders, and Cancer." *New England Journal of Medicine* 379 (21): 2052–62. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1704560>.
- Gouji, Toyokawa, Seto Takashi, Takenoyama Mitsuhiro, and Ichinose Yukito. 2014. "Crizotinib Can Overcome Acquired Resistance to CH5424802: Is Amplification of the MET Gene a Key Factor?" *Journal of Thoracic Oncology*. J Thorac Oncol. <https://doi.org/10.1097/JTO.000000000000113>.
- Gow, Chien Hung, Yi Nan Liu, Huei Ying Li, Min Shu Hsieh, Shih Han Chang, Sheng Ching Luo, Tzu Hsiu Tsai, Pei Lung Chen, Meng Feng Tsai, and Jin Yuan Shih. 2018. "Oncogenic Function of a KIF5B-MET Fusion Variant in Non-Small Cell Lung Cancer." *Neoplasia (United States)* 20 (8): 838–47. <https://doi.org/10.1016/j.neo.2018.06.007>.
- Graveel, Carrie, Yanli Su, Julie Koeman, Ling Mei Wang, Lino Tessarollo, Michele Fiscella, Carmen Birchmeier, Pamela Swiatek, Roderick Bronson, and George Vande Woude. 2004. "Activating Met Mutations Produce Unique Tumor Profiles in Mice with Selective Duplication of the Mutant Allele." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (49): 17198–203. <https://doi.org/10.1073/pnas.0407651101>.
- Graziani, Andrea, Danjela Gramaglia, Paolo M. Comoglio. 1991. "The Tyrosine-Phosphorylated Hepatocyte Growth Factor/Scatter Factor Receptor Associates with Phosphatidylinositol 3-Kinase." *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTR.*
- Graziani, A., D. Gramaglia, P. Dalla Zonca, and P. M. Comoglio. 1993. "Hepatocyte Growth Factor/Scatter Factor Stimulates the Ras-Guanine Nucleotide Exchanger." *Journal of Biological Chemistry* 268 (13): 9165–68. <https://europepmc.org/article/MED/8387483>.
- Gregg, Jeffrey P., Tianhong Li, and Ken Y. Yoneda. 2019. "Molecular Testing Strategies in Non-Small Cell Lung Cancer: Optimizing the Diagnostic Journey." *Translational Lung Cancer Research*. AME Publishing Company. <https://doi.org/10.21037/tlcr.2019.04.14>.
- Guo, Robin, Michael Offin, A. Rose Brannon, Jason C. Chang, Andrew Chow, Lukas Delasos, Jeffrey Girshman, et al. 2020. "MET Exon 14-Altered Lung Cancers and MET Inhibitor Resistance." *Clinical Cancer Research*, November, clincanres.2861.2020. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-20-2861>.
- Guo, Robin, Michael Offin, A. Rose Brannon, Andrew Chow, Lukas Delasos, Romel Somwar, Olivia Wilkins, et al. 2019a. "MET Inhibitor Resistance in Patients with MET Exon 14-Altered Lung Cancers." *Journal of Clinical Oncology* 37 (15_suppl): 9006–9006. https://doi.org/10.1200/jco.2019.37.15_suppl.9006.
- Guo, Robin, Michael Offin, A Rose Brannon, Andrew Chow, Lukas Delasos, Romel Somwar, Olivia Wilkins, et al. 2019b. "MET Inhibitor Resistance in Patients with MET Exon 14-Altered Lung Cancers." *Journal of Clinical Oncology* 37 (15_suppl):

9006. https://doi.org/10.1200/JCO.2019.37.15_suppl.9006.
- Hamanoue, Masahiro, Kouichi Kawaida, Sonshin Takao, Hisaaki Shimazu, Sumihare Noji, Kunio Matsumoto, and Toshikazu Nakamura. 1992. "Rapid and Marked Induction of Hepatocyte Growth Factor during Liver Regeneration after Ischemic or Crush Injury." *Hepatology* 16 (6): 1485–92. <https://doi.org/10.1002/hep.1840160626>.
- Han, Sen, Jian Fang, Shun Lu, Linfang Wang, Jing Li, Min Cheng, Yongxin Ren, and Weiguo Su. 2019. "Response and Acquired Resistance to Savolitinib in a Patient with Pulmonary Sarcomatoid Carcinoma Harboring MET Exon 14 Skipping Mutation: A Case Report." *OncoTargets and Therapy* Volume 12 (September): 7323–28. <https://doi.org/10.2147/OTT.S210365>.
- Hashigasako, A., M. Machide, T. Nakamura, K. Matsumoto, and T. Nakamura. 2004. "Bi-Directional Regulation of Ser-985 Phosphorylation of c-Met via Protein Kinase C and Protein Phosphatase 2A Involves c-Met Activation and Cellular Responsiveness to Hepatocyte Growth Factor." *Journal of Biological Chemistry* 279 (25): 26445–52. <https://doi.org/10.1074/jbc.M314254200>.
- Heist, Rebecca S., Lecia V. Sequist, Darrell Borger, Justin F. Gainor, Ronald S. Arellano, Long P. Le, Dora Dias-Santagata, et al. 2016. "Acquired Resistance to Crizotinib in NSCLC with MET Exon 14 Skipping." *Journal of Thoracic Oncology* 11 (8): 1242–45. <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2016.06.013>.
- Hervieu, Alexia, and Stéphanie Kermorgant. 2018. "The Role of PI3K in Met Driven Cancer: A Recap." *Frontiers in Molecular Biosciences* 5: 86. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2018.00086>.
- Hida, Toyooki, Hiroshi Nokihara, Masashi Kondo, Young Hak Kim, Koichi Azuma, Takashi Seto, Yuichi Takiguchi, et al. 2017. "Alectinib versus Crizotinib in Patients with ALK-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer (J-ALEX): An Open-Label, Randomised Phase 3 Trial." *Lancet (London, England)* 390 (10089): 29–39. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)30565-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)30565-2).
- Hida, Toyooki, Vamsidhar Velcheti, Karen L. Reckamp, Hiroshi Nokihara, Pallavi Sachdev, Tomoki Kubota, Takuya Nakada, Corina E. Dutcus, Min Ren, and Tomohide Tamura. 2019. "A Phase 2 Study of Lenvatinib in Patients with RET Fusion-Positive Lung Adenocarcinoma." *Lung Cancer* 138 (December): 124–30. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2019.09.011>.
- Hinohara, Kunihiro, and Kornelia Polyak. 2019. "Intratumoral Heterogeneity: More Than Just Mutations." *Trends in Cell Biology*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2019.03.003>.
- Hofman, Paul. 2017. "ALK in Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC) Pathobiology, Epidemiology, Detection from Tumor Tissue and Algorithm Diagnosis in a Daily Practice." *Cancers*. MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/cancers9080107>.
- Hong, David S., Marwan G. Fakih, John H. Strickler, Jayesh Desai, Gregory A. Durm, Geoffrey I. Shapiro, Gerald S. Falchook, et al. 2020. "KRAS G12C Inhibition with Sotorasib in Advanced Solid Tumors ." *New England Journal of Medicine* 383 (13): 1207–17. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1917239>.
- Horiike, Atsushi, Kengo Takeuchi, Takeshi Uenami, Yuko Kawano, Azusa Tanimoto, Kyohei Kaburaki, Yuichi Tambo, et al. 2016. "Sorafenib Treatment for Patients with RET Fusion-Positive Non-Small Cell Lung Cancer." *Lung Cancer* 93 (March): 43–46. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2015.12.011>.
- Huang, Lihua, and Liwu Fu. 2015. "Mechanisms of Resistance to EGFR Tyrosine Kinase Inhibitors." *Acta Pharmaceutica Sinica B*. Chinese Academy of Medical Sciences. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2015.07.001>.
- Hubbard, Stevan R. 2002. "Protein Tyrosine Kinases: Autoregulation and Small-Molecule Inhibition." *Current Opinion in Structural Biology*. Elsevier Ltd. [https://doi.org/10.1016/S0959-440X\(02\)00383-4](https://doi.org/10.1016/S0959-440X(02)00383-4).
- Hwu, Patrick, and Michael Davies. n.d. "The Role of the PI3K Pathway in Immune Resistance." Accessed November 25, 2020. <https://grantome.com/grant/NIH/R01-CA187076-01>.
- Igawa, T., K. Matsumoto, S. Kanda, Y. Saito, and T. Nakamura. 1993. "Hepatocyte Growth Factor May Function as a

- Renotropic Factor for Regeneration in Rats with Acute Renal Injury." *American Journal of Physiology - Renal Fluid and Electrolyte Physiology* 265 (1 34-1). <https://doi.org/10.1152/ajprenal.1993.265.1.f61>.
- "IMpower132: Efficacy of Atezolizumab (Atezo) + Carboplatin (Carbo)/Cisplatin (Cis) + Pemetrexed (Pem) as 1L Treatment in Key Subgroups with Stage I... | OncologyPRO." n.d. Accessed December 10, 2020. <https://oncologypro.esmo.org/meeting-resources/esmo-2018-congress/IMpower132-efficacy-of-atezolizumab-atezo-carboplatin-carbo-cisplatin-cis-pemetrexed-pem-as-1L-treatment-in-key-subgroups-with-stage-IV-non-squamous-non-small-cell-lung-cancer-NSCLC>.
- Infarinato, N. R., J. H. Park, K. Krytska, H. T. Ryles, R. Sano, K. M. Szigety, Y. Li, et al. 2016. "The ALK/ROS1 Inhibitor PF-06463922 Overcomes Primary Resistance to Crizotinib in ALK-Driven Neuroblastoma." *Cancer Discovery* 6 (1): 96–107. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-15-1056>.
- Ishibe, Shuta, Dominique Joly, Zhen Xiang Liu, and Lloyd G. Cantley. 2004a. "Paxillin Serves as an ERK-Regulated Scaffold for Coordinating FAK and Rac Activation in Epithelial Morphogenesis." *Molecular Cell* 16 (2): 257–67. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2004.10.006>.
- . 2004b. "Paxillin Serves as an ERK-Regulated Scaffold for Coordinating FAK and Rac Activation in Epithelial Morphogenesis." *Molecular Cell* 16 (2): 257–67. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2004.10.006>.
- Ishibe, Shuta, Anil Karihaloo, Hong Ma, Junhui Zhang, Arnaud Marlier, Mitchihiro Mitobe, Akashi Togawa, et al. 2009. "Met and the Epidermal Growth Factor Receptor Act Cooperatively to Regulate Final Nephron Number and Maintain Collecting Duct Morphology." *Development* 136 (2): 337–45. <https://doi.org/10.1242/dev.024463>.
- Jardim, Denis L. Fontes, Debora De Melo Gagliato, Gerald S. Falchook, Filip Janku, Ralph Zinner, Jennifer J. Wheeler, Vivek Subbiah, et al. 2014. "MET Aberrations and C-MET Inhibitors in Patients with Gastric and Esophageal Cancers in a Phase I Unit." *Oncotarget* 5 (7): 1837–45. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.1828>.
- Jean, S., and A. A. Kiger. 2014. "Classes of Phosphoinositide 3-Kinases at a Glance." *Journal of Cell Science* 127 (5): 923–28. <https://doi.org/10.1242/jcs.093773>.
- Jeffers, M, L Schmidt, N Nakaigawa, C P Webb, G Weirich, T Kishida, B Zbar, and G F Vande Woude. 1997. "Activating Mutations for the Met Tyrosine Kinase Receptor in Human Cancer." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (21): 11445–50. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9326629>.
- Jin, Wei, Benjie Shan, Hu Liu, Shoubing Zhou, Wenjuan Li, Jing Pan, Lin Lin, Dandan Hu, and Yueyin Pan. 2019. "Acquired Mechanism of Crizotinib Resistance in NSCLC with MET Exon 14 Skipping." *Journal of Thoracic Oncology : Official Publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* 14 (7): e137–39. <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2019.04.021>.
- Jing, Changwen, Xuhua Mao, Zhuo Wang, Kejing Sun, Rong Ma, Jianzhong Wu, and Haixia Cao. 2018a. "Next-generation Sequencing-based Detection of EGFR, KRAS, BRAF, NRAS, PIK3CA, Her-2 and TP53 Mutations in Patients with Non-small Cell Lung Cancer." *Molecular Medicine Reports*, June. <https://doi.org/10.3892/mmr.2018.9210>.
- . 2018b. "Next-generation Sequencing-based Detection of EGFR, KRAS, BRAF, NRAS, PIK3CA, Her-2 and TP53 Mutations in Patients with Non-small Cell Lung Cancer." *Molecular Medicine Reports* 18 (2): 2191–97. <https://doi.org/10.3892/mmr.2018.9210>.
- Joffre, Carine, Rachel Barrow, Ludovic Ménard, Véronique Calleja, Ian R. Hart, and Stéphanie Kermorgant. 2011. "A Direct Role for Met Endocytosis in Tumorigenesis." *Nature Cell Biology* 13 (7): 827–37. <https://doi.org/10.1038/ncb2257>.
- Johnson, Alison C., Pascal Dô, Nicolas Richard, Catherine Dubos, Jean Jacques Michels, Jessica Bonneau, and Radj Gervais. 2016. "Identification of I1171N Resistance Mutation in ALK-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer Tumor Sample and Circulating Tumor DNA." *Lung Cancer* 99 (September): 38–40. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2016.06.010>.
- Jung, Kyeong Ah, Bo Hyun Choi, and Mi Kyoung Kwak. 2015. "The C-MET/PI3K Signaling Is Associated with Cancer

- Resistance to Doxorubicin and Photodynamic Therapy by Elevating BCRP/ABCG2 Expression." *Molecular Pharmacology* 87 (3): 465–76. <https://doi.org/10.1124/mol.114.096065>.
- Juric, Dejan, Jordi Rodon, Josep Tabernero, Filip Janku, Howard A Burris, Jan H M Schellens, Mark R Middleton, et al. 2018. "Phosphatidylinositol 3-Kinase α -Selective Inhibition With Alpelisib (BYL719) in PIK3CA-Altered Solid Tumors: Results From the First-in-Human Study." *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 36 (13): 1291–99. <https://doi.org/10.1200/JCO.2017.72.7107>.
- Kamps, Rick, Rita Brandão, Bianca Bosch, Aimee Paulussen, Sofia Xanthoulea, Marinus Blok, and Andrea Romano. 2017. "Next-Generation Sequencing in Oncology: Genetic Diagnosis, Risk Prediction and Cancer Classification." *International Journal of Molecular Sciences* 18 (2): 308. <https://doi.org/10.3390/ijms18020308>.
- Kang, Hyo Jae, Hyo Jeong Lim, Jong Sun Park, Young Jae Cho, Ho Il Yoon, Jin Haeng Chung, Jae Ho Lee, and Choon Taek Lee. 2014. "Comparison of Clinical Characteristics between Patients with ALK-Positive and EGFR-Positive Lung Adenocarcinoma." *Respiratory Medicine* 108 (2): 388–94. <https://doi.org/10.1016/j.rmed.2013.11.020>.
- Kannaiyan, Radhamani, and Daruka Mahadevan. 2018. "A Comprehensive Review of Protein Kinase Inhibitors for Cancer Therapy." *Expert Review of Anticancer Therapy*. Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/14737140.2018.1527688>.
- Katayama, R., A. T. Shaw, T. M. Khan, M. Mino-Kenudson, B. J. Solomon, B. Halmos, N. A. Jessop, et al. 2012. "Mechanisms of Acquired Crizotinib Resistance in ALK-Rearranged Lung Cancers." *Science Translational Medicine* 4 (120): 120ra17–120ra17. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3003316>.
- Kawakami, Hisato, Isamu Okamoto, Wataru Okamoto, Junko Tanizaki, Kazuhiko Nakagawa, and Kazuto Nishio. 2014. "Targeting MET Amplification as a New Oncogenic Driver." *Cancers* 6 (3): 1540–52. <https://doi.org/10.3390/cancers6031540>.
- Kermorgant, Stéphanie, and Peter J. Parker. 2008. "Receptor Trafficking Controls Weak Signal Delivery: A Strategy Used by c-Met for STAT3 Nuclear Accumulation." *Journal of Cell Biology* 182 (5): 855–63. <https://doi.org/10.1083/jcb.200806076>.
- Kherrouche, Zoulika, Didier Monte, Elisabeth Werkmeister, Luc Stoven, Yvan De Launoit, Alexis B. Cortot, David Tulasne, and Anne Chotteau-Lelievre. 2015. "PEA3 Transcription Factors Are Downstream Effectors of Met Signaling Involved in Migration and Invasiveness of Met-Addicted Tumor Cells." *Molecular Oncology* 9 (9): 1852–67. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2015.07.001>.
- Kim, Dong-Wan, Myung-Ju Ahn, Yuankai Shi, Tommaso Martino De Pas, Pan-Chyr Yang, Gregory J. Riely, Lucio Crinò, et al. 2012. "Results of a Global Phase II Study with Crizotinib in Advanced ALK-Positive Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC)." *Clinical Advances in Hematology and Oncology*. American Society of Clinical Oncology. https://doi.org/10.1200/jco.2012.30.15_suppl.7533.
- Kim, Dong-Wan, Marcello Tiseo, Myung-Ju Ahn, Karen L. Reckamp, Karin Holmskov Hansen, Sang-We Kim, Rudolf M. Huber, et al. 2017. "Brigatinib in Patients With Crizotinib-Refractory Anaplastic Lymphoma Kinase-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer: A Randomized, Multicenter Phase II Trial." *Journal of Clinical Oncology* 35 (22): 2490–98. <https://doi.org/10.1200/JCO.2016.71.5904>.
- Kim, Soyeon, Tae Min Kim, Dong-Wan Kim, Heounjeong Go, Bhumsuk Keam, Se-Hoon Lee, Ja-Lok Ku, Doo Hyun Chung, and Dae Seog Heo. 2013. "Heterogeneity of Genetic Changes Associated with Acquired Crizotinib Resistance in ALK-Rearranged Lung Cancer." *Journal of Thoracic Oncology* 8 (4): 415–22. <https://doi.org/10.1097/JTO.0b013e318283dcc0>.
- Kirchhofer, Daniel, Mark Peek, Michael T. Lipari, Karen Billeci, Bin Fan, and Paul Moran. 2005. "Hepsin Activates Pro-Hepatocyte Growth Factor and Is Inhibited by Hepatocyte Growth Factor Activator Inhibitor-1B (HAI-1B) and HAI-2."

- FEBS Letters* 579 (9): 1945–50. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.01.085>.
- Klempner, Samuel J., Ali Borghei, Behrooz Hakimian, Siraj M. Ali, and Sai-Hong Ignatius Ou. 2017. “Intracranial Activity of Cabozantinib in MET Exon 14–Positive NSCLC with Brain Metastases.” *Journal of Thoracic Oncology* 12 (1): 152–56. <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2016.09.127>.
- Komada, Masayuki, Kiyotaka Hatsuzawa, Sayumi Shibamoto, Fumiaki Ito, Kazuhisa Nakayama, and Naomi Kitamura. 1993. “Proteolytic Processing of the Hepatocyte Growth Factor/Scatter Factor Receptor by Furin.” *FEBS Letters* 328 (1–2): 25–29. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(93\)80958-W](https://doi.org/10.1016/0014-5793(93)80958-W).
- Kong-Beltran, M. 2006. “Somatic Mutations Lead to an Oncogenic Deletion of Met in Lung Cancer.” *Cancer Research* 66 (1): 283–89. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-2749>.
- Kong-Beltran, Monica, Jennifer Stamos, and Dineli Wickramasinghe. 2004. “The Sema Domain of Met Is Necessary for Receptor Dimerization and Activation.” *Cancer Cell* 6 (1): 75–84. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2004.06.013>.
- Kong, Li Ren, Nur Afiqah Binte Mohamed Salleh, Tuan Zea Tan, Dennis Kappei, and Boon Cher Goh. 2017. “P1.02-041 Characterization of MET-N375S as an Activating Mutation in Squamous Cell Carcinoma of the Lung.” *Journal of Thoracic Oncology* 12 (1): S512. <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2016.11.624>.
- Kosai, Ken Ichiro, Kunio Matsumoto, Shigekazu Nagata, Yoshihide Tsujimoto, and Toshikazu Nakamura. 1998. “Abrogation of Fas-Induced Fulminant Hepatic Failure in Mice by Hepatocyte Growth Factor.” *Biochemical and Biophysical Research Communications* 244 (3): 683–90. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1998.8293>.
- Kozlov, Guennadi, Audrey Perreault, Joseph D. Schrag, Morag Park, Miroslaw Cygler, Kalle Gehring, and Irena Ekiel. 2004. “Insights into Function of PSI Domains from Structure of the Met Receptor PSI Domain.” *Biochemical and Biophysical Research Communications* 321 (1): 234–40. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.06.132>.
- Kris, Mark G., D. R. Camidge, G. Giaccone, T. Hida, B. T. Li, J. O’Connell, I. Taylor, et al. 2015. “Targeting HER2 Aberrations as Actionable Drivers in Lung Cancers: Phase II Trial of the Pan-HER Tyrosine Kinase Inhibitor Dacomitinib in Patients with HER2-Mutant or Amplified Tumors.” *Annals of Oncology* 26 (7): 1421–27. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdv186>.
- Kron, A, C Alidousty, M Scheffler, S Merkelbach-Bruse, D Seidel, R Riedel, M A Ihle, et al. 2018. “Impact of TP53 Mutation Status on Systemic Treatment Outcome in ALK-Rearranged Non-Small-Cell Lung Cancer.” *Annals of Oncology : Official Journal of the European Society for Medical Oncology* 29 (10): 2068–75. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdy333>.
- Lamorte, Louie, Isabelle Royal, Monica Naujokas, and Morag Park. 2002. “Crk Adapter Proteins Promote an Epithelial-Mesenchymal-like Transition and Are Required for HGF-Mediated Cell Spreading and Breakdown of Epithelial Adherens Junctions.” *Molecular Biology of the Cell* 13 (5): 1449–61. <https://doi.org/10.1091/mbc.01-10-0477>.
- Landi, Lorenza, Rita Chiari, Marcello Tiseo, Federica D’Inca, Claudio Dazzi, Antonio Chella, Angelo Delmonte, et al. 2019. “Crizotinib in MET Deregulated or ROS1 Rearranged Pretreated Non-Small-Cell Lung Cancer (METROS): A Phase II, Prospective, Multicentre, Two-Arms Trial.” *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, August, clincanres.0994.2019. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-19-0994>.
- Lantuejoul, Sylvie, Lénaïg Mescam-Mancini, Anne Mcleer-Florin, R É, and M É S U M M. 2012. “Réarrangements Du Gène ALK Dans Les Cancers Du Poumon Non à Petites Cellules ALK Gene Rearrangement in Non-Small-Cell Lung Carcinoma.” <http://www.edimark.fr/Front/frontpost/getfiles/18975.pdf>.
- Lee, Jae Ho, San Uk Han, Hyeseong Cho, Barbara Jennings, Bernard Gerrard, Michael Dean, Laura Schmidt, Berton Zbar, and George F. Vande Woude. 2000. “A Novel Germ Line Juxtamembrane Met Mutation in Human Gastric Cancer.” *Oncogene* 19 (43): 4947–53. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1203874>.
- Lee, Nayeon, Junghun Lee, Sang Hwan Lee, Subin Kim, and Sunyoung Kim. 2018. “Disproportionately High Levels of HGF Induce the Degradation of the C-Met Receptor through the Proteasomal Degradation Pathway.” *Biochemical and*

- Biophysical Research Communications* 505 (3): 925–30. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.09.127>.
- Lee, Yu-Ru, Ming Chen, and Pier Paolo Pandolfi. 2018. “The Functions and Regulation of the PTEN Tumour Suppressor: New Modes and Prospects.” *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 19 (9): 547–62. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0015-0>.
- Lefebvre, J, G Muharram, C Leroy, Z Kherrouche, R Montagne, G Ichim, S Tauszig-Delamasure, et al. 2013. “Caspase-Generated Fragment of the Met Receptor Favors Apoptosis via the Intrinsic Pathway Independently of Its Tyrosine Kinase Activity.” *Cell Death and Disease* 4 (10): e871. <https://doi.org/10.1038/cddis.2013.377>.
- Lefebvre, Jonathan, Frédéric Ancot, Catherine Leroy, Ghaffar Muharram, Arnaud Lemièrre, and David Tulasne. 2012. “Met Degradation: More than One Stone to Shoot a Receptor Down.” *The FASEB Journal* 26 (4): 1387–99. <https://doi.org/10.1096/fj.11-197723>.
- Li, An-Na, Jinji Yang, Xu-Chao Zhang, Zhou Zhang, Jian Su, Lan-Ying Gou, Yu Bai, et al. 2017. “Acquired MET Y1248H and D1246N Mutations Mediate Resistance to MET Inhibitors in Non-Small Cell Lung Cancer.” *Clinical Cancer Research*, April, clincanres.3273.2016. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-16-3273>.
- Li, Bob T., Ronglai Shen, Darren Buonocore, Zachary T. Olah, Ai Ni, Michelle S. Ginsberg, Gary A. Ulaner, et al. 2018. “Ado-Trastuzumab Emtansine for Patients with HER2-Mutant Lung Cancers: Results from a Phase II Basket Trial.” In *Journal of Clinical Oncology*, 36:2532–37. American Society of Clinical Oncology. <https://doi.org/10.1200/JCO.2018.77.9777>.
- Li, D M, and H Sun. 1997. “TEP1, Encoded by a Candidate Tumor Suppressor Locus, Is a Novel Protein Tyrosine Phosphatase Regulated by Transforming Growth Factor Beta.” *Cancer Research* 57 (11): 2124–29. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9187108>.
- Li, J, C Yen, D Liaw, K Podsypanina, S Bose, S I Wang, J Puc, et al. 1997. “PTEN, a Putative Protein Tyrosine Phosphatase Gene Mutated in Human Brain, Breast, and Prostate Cancer.” *Science (New York, N.Y.)* 275 (5308): 1943–47. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9072974>.
- Liang, Hongge, and Mengzhao Wang. 2020. “MET Oncogene in Non-Small Cell Lung Cancer: Mechanism of MET Dysregulation and Agents Targeting the HGF/c-Met Axis.” *OncoTargets and Therapy*. Dove Medical Press Ltd. <https://doi.org/10.2147/OTT.S231257>.
- Lianidou, Evi, and Klaus Pantel. 2019. “Liquid Biopsies.” *Genes Chromosomes and Cancer*. Blackwell Publishing Inc. <https://doi.org/10.1002/gcc.22695>.
- Lin, Jenny C., Monica Naujokas, Hong Zhu, Serge Nolet, and Morag Park. 1998. “Intron-Exon Structure of the MET Gene and Cloning of an Alternatively-Spliced Met Isoform Reveals Frequent Exon-Skipping of a Single Large Internal Exon.” *Oncogene* 16 (7): 833–42. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1201599>.
- Lin, Jessica J., Viola W. Zhu, Satoshi Yoda, Beow Y. Yeap, Alexa B. Schrock, Ibiayi Dagogo-Jack, Nicholas A. Jessop, et al. 2018. “Impact of EML4-ALK Variant on Resistance Mechanisms and Clinical Outcomes in ALK -Positive Lung Cancer.” *Journal of Clinical Oncology* 36 (12): 1199–1206. <https://doi.org/10.1200/JCO.2017.76.2294>.
- Lin, Jessica J, Gregory J Riely, and Alice T Shaw. 2017. “Targeting ALK: Precision Medicine Takes on Drug Resistance.” *Cancer Discovery* 7 (2): 137–55. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-16-1123>.
- Lin, Jessica J, and Alice T Shaw. n.d. “Resisting Resistance: Targeted Therapies in Lung Cancer.” <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2016.05.010>.
- Liu, Pingyu, Yijun Wang, and Xin Li. 2019. “Targeting the Untargetable KRAS in Cancer Therapy.” *Acta Pharmaceutica Sinica B*. Chinese Academy of Medical Sciences. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2019.03.002>.
- Liu, Qian, Shengnan Yu, Weiheng Zhao, Shuang Qin, Qian Chu, and Kongming Wu. 2018. “EGFR-TKIs Resistance via EGFR-Independent Signaling Pathways.” *Molecular Cancer* 17 (1): 53. <https://doi.org/10.1186/s12943-018-0793-1>.
- Liu, Shuying, Funda Meric-Bernstam, Napa Parinyanitikul, Bailiang Wang, Agda K. Eterovic, Xiaofeng Zheng, Mihai Gagea, et

- al. 2015. "Functional Consequence of the MET-T1010I Polymorphism in Breast Cancer." *Oncotarget* 6 (5): 2604–14. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.3094>.
- Liu, Xuewen, Yuxia Jia, Mark B Stoopler, Yufeng Shen, Haiying Cheng, Jinli Chen, Mahesh Mansukhani, Sanjay Koul, Balazs Halmos, and Alain C Borczuk. 2016. "Next-Generation Sequencing of Pulmonary Sarcomatoid Carcinoma Reveals High Frequency of Actionable MET Gene Mutations." *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 34 (8): 794–802. <https://doi.org/10.1200/JCO.2015.62.0674>.
- Liu, Yao, Qin Zhang, Chuanli Ren, Yanbing Ding, Guangfu Jin, Zhibin Hu, Yaochu Xu, and Hongbing Shen. 2012. "A Germline Variant N375S in MET and Gastric Cancer Susceptibility in a Chinese Population." *Journal of Biomedical Research* 26 (5): 315–18. <https://doi.org/10.7555/JBR.26.20110087>.
- Liu, Yingjie, Nibedita Chattopadhyay, Shan Qin, Charles Szekeres, Tetyana Vasylyeva, Zhen X. Mahoney, Mary Taglienti, et al. 2009. "Coordinate Integrin and C-Met Signaling Regulate Wnt Gene Expression during Epithelial Morphogenesis." *Development* 136 (5): 843–53. <https://doi.org/10.1242/dev.027805>.
- Liu, Youhua. 1999. "Hepatocyte Growth Factor Promotes Renal Epithelial Cell Survival by Dual Mechanisms." *American Journal of Physiology - Renal Physiology* 277 (4 46-4). <https://doi.org/10.1152/ajprenal.1999.277.4.f624>.
- Longati, P., A. Bardelli, C. Ponzetto, L. Naldini, and P. M. Comoglio. 1994. "Tyrosines1234-1235 Are Critical for Activation of the Tyrosine Kinase Encoded by the MET Proto-Oncogene (HGF Receptor)." *Oncogene* 9 (1): 49–57. <https://moh-it.pure.elsevier.com/en/publications/tyrosinessup1234-1235sup-are-critical-for-activation-of-the-tyros>.
- Lotan, Tamara L., Bora Gurel, Siobhan Sutcliffe, David Esopi, Wennuan Liu, Jianfeng Xu, Jessica L. Hicks, et al. 2011. "PTEN Protein Loss by Immunostaining: Analytic Validation and Prognostic Indicator for a High Risk Surgical Cohort of Prostate Cancer Patients." *Clinical Cancer Research* 17 (20): 6563–73. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-1244>.
- Lovly, Christine M, Nerina T McDonald, Heidi Chen, Sandra Ortiz-Cuaran, Lukas C Heukamp, Yingjun Yan, Alexandra Florin, et al. 2014. "Rationale for Co-Targeting IGF-1R and ALK in ALK Fusion–Positive Lung Cancer." *Nature Medicine* 20 (9): 1027–34. <https://doi.org/10.1038/nm.3667>.
- Lu, Shun, Jian Fang, Xingya Li, Lejie Cao, Jianying Zhou, Qisen Guo, Zongan Liang, et al. 2020. "Phase II Study of Savolitinib in Patients (Pts) with Pulmonary Sarcomatoid Carcinoma (PSC) and Other Types of Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC) Harboring MET Exon 14 Skipping Mutations (METex14+)." *Journal of Clinical Oncology* 38 (15_suppl): 9519–9519. https://doi.org/10.1200/jco.2020.38.15_suppl.9519.
- Ludovini, Vienna, Fortunato Bianconi, Lorenza Pistola, Rita Chiari, Vincenzo Minotti, Renato Colella, Dario Giuffrida, et al. 2011. "Phosphoinositide-3-Kinase Catalytic Alpha and KRAS Mutations Are Important Predictors of Resistance to Therapy with Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitors in Patients with Advanced Non-Small Cell Lung Cancer." *Journal of Thoracic Oncology* 6 (4): 707–15. <https://doi.org/10.1097/JTO.0b013e31820a3a6b>.
- Lynch, Thomas J., Daphne W. Bell, Raffaella Sordella, Sarada Gurubhagavatula, Ross A. Okimoto, Brian W. Brannigan, Patricia L. Harris, et al. 2004. "Activating Mutations in the Epidermal Growth Factor Receptor Underlying Responsiveness of Non–Small-Cell Lung Cancer to Gefitinib." *New England Journal of Medicine* 350 (21): 2129–39. <https://doi.org/10.1056/nejmoa040938>.
- Ma, Patrick C., Gautam Maulik, James Christensen, and Ravi Salgia. 2003. "C-Met: Structure, Functions and Potential for Therapeutic Inhibition." *Cancer and Metastasis Reviews*. *Cancer Metastasis Rev*. <https://doi.org/10.1023/A:1023768811842>.
- Ma, Patrick C, Ramasamy Jagadeeswaran, Simha Jagadeesh, Maria S Tretiakova, Vidya Nallasura, Edward A Fox, Mark Hansen, et al. 2005. "Functional Expression and Mutations of C-Met and Its Therapeutic Inhibition with SU11274 and Small Interfering RNA in Non-Small Cell Lung Cancer." *Cancer Research* 65 (4): 1479–88.

<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-2650>.

- Ma, Patrick C, Takashi Kijima, Gautam Maulik, Edward A Fox, Martin Sattler, James D Griffin, Bruce E Johnson, and Ravi Salgia. 2003. "C-MET Mutational Analysis in Small Cell Lung Cancer: Novel Juxtamembrane Domain Mutations Regulating Cytoskeletal Functions." *Cancer Research* 63 (19): 6272–81.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14559814>.
- Malanga, Donatella, Marianna Scrima, Carmela De Marco, Fernanda Fabiani, Nicola De Rosa, Silvia de Gisi, Natalia Malara, et al. 2008. "Activating E17K Mutation in the Gene Encoding the Protein Kinase AKT in a Subset of Squamous Cell Carcinoma of the Lung." *Cell Cycle* 7 (5): 665–69. <https://doi.org/10.4161/cc.7.5.5485>.
- Maroun, Christiane R., Monica A. Naujokas, and Morag Park. 2003. "Membrane Targeting of Grb2-Associated Binder-1 (Gab1) Scaffolding Protein through Src Myristoylation Sequence Substitutes for Gab1 Pleckstrin Homology Domain and Switches an Epidermal Growth Factor Response to an Invasive Morphogenic Program." *Molecular Biology of the Cell* 14 (4): 1691–1708. <https://doi.org/10.1091/mbc.E02-06-0352>.
- Marquardt, Jens U., Daekwan Seo, Luis E. Gómez-Quiroz, Koichi Uchida, Matthew C. Gillen, Mitsuteru Kitade, Pal Kaposi-Novak, Elizabeth A. Conner, Valentina M. Factor, and Snorri S. Thorgeirsson. 2012. "Loss of C-Met Accelerates Development of Liver Fibrosis in Response to CCl 4 Exposure through Deregulation of Multiple Molecular Pathways." *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease* 1822 (6): 942–51.
<https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2012.02.012>.
- Mazieres, J., A. Drilon, A. Lusque, L. Mhanna, A. B. Cortot, L. Mezquita, A. A. Thai, et al. 2019. "Immune Checkpoint Inhibitors for Patients with Advanced Lung Cancer and Oncogenic Driver Alterations: Results from the IMMUNOTARGET Registry." *Annals of Oncology* 30 (8): 1321–28. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdz167>.
- McCoach, Caroline E., Anh T. Le, Katherine Gowan, Kenneth Jones, Laura Schubert, Andrea Doak, Adriana Estrada-Bernal, et al. 2018. "Resistance Mechanisms to Targeted Therapies in ROS1 + and ALK + Non-Small Cell Lung Cancer." *Clinical Cancer Research*, April. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-17-2452>.
- Mellor, Paul, Levi A Furber, Jennifer N K Nyarko, and Deborah H Anderson. 2012. "Multiple Roles for the P85α Isoform in the Regulation and Function of PI3K Signalling and Receptor Trafficking." *The Biochemical Journal* 441 (1): 23–37.
<https://doi.org/10.1042/BJ20111164>.
- Mezquita, Laura, and David Planchard. 2018. "The Role of Brigatinib in Crizotinib-Resistant Non-Small Cell Lung Cancer." *Cancer Management and Research* 10: 123–30. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S129963>.
- Mhanna, Laurent, Nicolas Guibert, Julie Milia, and Julien Mazieres. 2019. "When to Consider Immune Checkpoint Inhibitors in Oncogene-Driven Non-Small Cell Lung Cancer?" *Current Treatment Options in Oncology* 20 (7): 60.
<https://doi.org/10.1007/s11864-019-0652-3>.
- Miled, N., Y. Yan, W.-C. Hon, O. Perisic, M. Zvelebil, Y. Inbar, D. Schneidman-Duhovny, H. J. Wolfson, J. M. Backer, and R. L. Williams. 2007. "Mechanism of Two Classes of Cancer Mutations in the Phosphoinositide 3-Kinase Catalytic Subunit." *Science* 317 (5835): 239–42. <https://doi.org/10.1126/science.1135394>.
- Mills, Jamie N., Alex C. Rutkovsky, and Antonio Giordano. 2018. "Mechanisms of Resistance in Estrogen Receptor Positive Breast Cancer: Overcoming Resistance to Tamoxifen/Aromatase Inhibitors." *Current Opinion in Pharmacology*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2018.04.009>.
- Miyamoto, Shingo, Soichiro Ikushima, Ryu Ono, Nobuyasu Awano, Keisuke Kondo, Yoshiaki Furuhashi, Kento Fukumoto, and Toshio Kumasaka. 2016. "Transformation to Small-Cell Lung Cancer as a Mechanism of Acquired Resistance to Crizotinib and Alectinib." *Japanese Journal of Clinical Oncology* 46 (2): 170–73. <https://doi.org/10.1093/jjco/hyv173>.
- Miyawaki, Masayoshi, Hiroyuki Yasuda, Tetsuo Tani, Junko Hamamoto, Daisuke Arai, Kota Ishioka, Keiko Ohgino, et al. 2017. "Overcoming EGFR Bypass Signal-Induced Acquired Resistance to ALK Tyrosine Kinase Inhibitors in ALK-Translocated

- Lung Cancer." *Molecular Cancer Research* 15 (1): 106–14. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-16-0211>.
- Mohapatra, Bhopal, Gulzar Ahmad, Scott Nadeau, Neha Zutshi, Wei An, Sarah Scheffe, Lin Dong, et al. 2013. "Protein Tyrosine Kinase Regulation by Ubiquitination: Critical Roles of Cbl-Family Ubiquitin Ligases." *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*. NIH Public Access. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2012.10.010>.
- Mok, Tony S., Yi-Long Wu, Myung-Ju Ahn, Marina C. Garassino, Hye R. Kim, Suresh S. Ramalingam, Frances A. Shepherd, et al. 2017. "Osimertinib or Platinum–Pemetrexed in EGFR T790M–Positive Lung Cancer." *New England Journal of Medicine* 376 (7): 629–40. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1612674>.
- Mok, Tony S., Yi-Long Wu, Sumitra Thongprasert, Chih-Hsin Yang, Da-Tong Chu, Nagahiro Saijo, Patrapim Sunpaweravong, et al. 2009. "Gefitinib or Carboplatin–Paclitaxel in Pulmonary Adenocarcinoma." *New England Journal of Medicine* 361 (10): 947–57. <https://doi.org/10.1056/nejmoa0810699>.
- Mok, Tony, David Spigel, Enriqueta Felip, Filippo deMarinis, Myung-Ju Ahn, Harry J M Groen, Heather A Wakelee, et al. 2015. "ASCEND-2: A Single-Arm, Open-Label, Multicenter Phase II Study of Ceritinib in Adult Patients (Pts) with ALK-Rearranged (ALK+) Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC) Previously Treated with Chemotherapy and Crizotinib (CRZ)." *Journal of Clinical Oncology* 33 (15_suppl): 8059. https://doi.org/10.1200/jco.2015.33.15_suppl.8059.
- Moro-Sibilot, D., N. Cozic, M. Pérol, J. Otto, J. Mazieres, P. Souquet, R. Bahleda, et al. 2018a. "OA12.03 Activity of Crizotinib in MET or ROS1 Positive (+) NSCLC: Results of the AcSé Trial." *Journal of Thoracic Oncology* 13 (10): S348. <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2018.08.301>.
- . 2018b. "OA12.03 Activity of Crizotinib in MET or ROS1 Positive (+) NSCLC: Results of the AcSé Trial." *Journal of Thoracic Oncology* 13 (10): S348. <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2018.08.301>.
- Moumen, Anice, Salvatore Patané, Almudena Porras, Rosanna Dono, and Flavio Maina. 2007. "Met Acts on Mdm2 via MTOR to Signal Cell Survival during Development." *Development* 134 (7): 1443–51. <https://doi.org/10.1242/dev.02820>.
- Mukai, Shoichiro, Tsuyoshi Fukushima, Daiji Naka, Hiroyuki Tanaka, Yukio Osada, and Hiroaki Kataoka. 2008. "Activation of Hepatocyte Growth Factor Activator Zymogen (pro-HGFA) by Human Kallikrein 1-Related Peptidases." *FEBS Journal* 275 (5): 1003–17. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2008.06265.x>.
- Mur, Emilie Bousquet, Sara Bernardo, Laura Papon, Maicol Mancini, Eric Fabbrizio, Marion Goussard, Irene Ferrer, et al. 2020. "Notch Inhibition Overcomes Resistance to Tyrosine Kinase Inhibitors in EGFR-Driven Lung Adenocarcinoma." *Journal of Clinical Investigation* 130 (2): 612–24. <https://doi.org/10.1172/JCI126896>.
- Nakamura, Toshikazu, Katsuhiko Nawa, and Akira Ichihara. 1984. "Partial Purification and Characterization of Hepatocyte Growth Factor from Serum of Hepatectomized Rats." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 122 (3): 1450–59. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(84\)91253-1](https://doi.org/10.1016/0006-291X(84)91253-1).
- Nakayama, Mizuho, Katsuya Sakai, Atsuko Yamashita, Takahiro Nakamura, Yoshinori Suzuki, and Kunio Matsumoto. 2013. "Met/HGF Receptor Activation Is Regulated by Juxtamembrane Ser985 Phosphorylation in Hepatocytes." *Cytokine* 62 (3): 446–52. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2013.04.006>.
- Naldini, L., L. Tamagnone, E. Vigna, M. Sachs, G. Hartmann, W. Birchmeier, Y. Daikuhara, H. Tsubouchi, F. Blasi, and P.M. Comoglio. 1992. "Extracellular Proteolytic Cleavage by Urokinase Is Required for Activation of Hepatocyte Growth Factor/Scatter Factor." *The EMBO Journal* 11 (13): 4825–33. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1992.tb05588.x>.
- Naldini, L., K. M. Weidner, E. Vigna, G. Gaudino, A. Bardelli, C. R.P. Ponzetto Narsimhan, G. Hartmann, et al. 1991. "Scatter Factor and Hepatocyte Growth Factor Are Indistinguishable Ligands for the MET Receptor." *EMBO Journal* 10 (10): 2867–78. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1991.tb07836.x>.
- Naldini, L., K.M. Weidner, E. Vigna, G. Gaudino, A. Bardelli, C. Ponzetto, R.P. Narsimhan, G. Hartmann, R. Zarnegar, and G.K. Michalopoulos. 1991. "Scatter Factor and Hepatocyte Growth Factor Are Indistinguishable Ligands for the MET

- Receptor." *The EMBO Journal* 10 (10): 2867–78. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1991.tb07836.x>.
- Neel, Dana S., and Trevor G. Bivona. 2017. "Resistance Is Futile: Overcoming Resistance to Targeted Therapies in Lung Adenocarcinoma." *Npj Precision Oncology* 1 (1): 3. <https://doi.org/10.1038/s41698-017-0007-0>.
- Ng, Terry L., and D. Ross Camidge. 2016. "Intracranial Efficacy of Crizotinib versus Chemotherapy in PROFILE 1014: Shining a Light on Central Nervous System Endpoints in Clinical Trials." *Translational Cancer Research* 3 (5). <https://doi.org/10.21037/9463>.
- Niemann, Catherin, Volker Brinkmann, Eva Spitzer, Guido Hartmann, Martin Sachs, Helga Naundorf, and Walter Birchmeier. 1998. "Reconstitution of Mammary Gland Development in Vitro: Requirement of c- Met and c-ErbB2 Signaling for Branching and Alveolar Morphogenesis." *Journal of Cell Biology* 143 (2): 533–45. <https://doi.org/10.1083/jcb.143.2.533>.
- Nishino, Tomoyoshi, Hiroko Hisha, Naoki Nishino, Masakazu Adachi, and Susumu Ikehara. 1995. "Hepatocyte Growth Factor as a Hematopoietic Regulator." *Blood* 85 (11): 3093–3100. <https://doi.org/10.1182/blood.v85.11.3093.bloodjournal85113093>.
- Noonan, Sinéad A., Lynne Berry, Xian Lu, Dexiang Gao, Anna E. Barón, Patrick Chesnut, Jamie Sheren, et al. 2016. "Identifying the Appropriate FISH Criteria for Defining MET Copy Number-Driven Lung Adenocarcinoma through Oncogene Overlap Analysis." *Journal of Thoracic Oncology* 11 (8): 1293–1304. <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2016.04.033>.
- Nuga, Oluwademilade, Ana deCarvalho, Yuling Meng, Laura Hasselbach, Kevin Nelson, Susan Irtenkauf, and Andrea Transou. 2018. "Abstract 2519: Identification of Novel MET Fusion Transcript Amplification in Glioblastoma." In *Cancer Research*, 78:2519–2519. American Association for Cancer Research (AACR). <https://doi.org/10.1158/1538-7445.am2018-2519>.
- Okada, Koutaroh, Mitsugu Araki, Takuya Sakashita, Biao Ma, Ryo Kanada, Noriko Yanagitani, Atsushi Horiike, et al. 2019. "Prediction of ALK Mutations Mediating ALK-TKIs Resistance and Drug Re-Purposing to Overcome the Resistance." *EBioMedicine* 41 (March): 105–19. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.01.019>.
- Ou, Sai-Hong Ignatius, Michele Azada, David J. Hsiang, June M. Herman, Tatiana S. Kain, Christina Siwak-Tapp, Cameron Casey, et al. 2014. "Next-Generation Sequencing Reveals a Novel NSCLC ALK F1174V Mutation and Confirms ALK G1202R Mutation Confers High-Level Resistance to Alectinib (CH5424802/RO5424802) in ALK-Rearranged NSCLC Patients Who Progressed on Crizotinib." *Journal of Thoracic Oncology* 9 (4): 549–53. <https://doi.org/10.1097/JTO.0000000000000094>.
- Ou, Sai-Hong Ignatius, Joel Greenbowe, Ziad U. Khan, Michele C. Azada, Jeffrey S. Ross, Phil J. Stevens, Siraj M. Ali, Vincent A. Miller, and Barbara Gitlitz. 2015. "I1171 Missense Mutation (Particularly I1171N) Is a Common Resistance Mutation in ALK-Positive NSCLC Patients Who Have Progressive Disease While on Alectinib and Is Sensitive to Ceritinib." *Lung Cancer* 88 (2): 231–34. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2015.02.005>.
- Ou, Sai-Hong Ignatius, and Misako Nagasaka. 2020. "A Catalog of 5' Fusion Partners in ROS1-Positive NSCLC Circa 2020." *JTO Clinical and Research Reports* 1 (3): 100048. <https://doi.org/10.1016/j.jtocrr.2020.100048>.
- Ou, Sai-Hong Ignatius, Lauren Young, Alexa B. Schrock, Adrienne Johnson, Samuel J. Klempner, Viola W. Zhu, Vincent A. Miller, and Siraj M. Ali. 2017. "Emergence of Preexisting MET Y1230C Mutation as a Resistance Mechanism to Crizotinib in NSCLC with MET Exon 14 Skipping." *Journal of Thoracic Oncology* 12 (1): 137–40. <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2016.09.119>.
- Oxnard, G. R., J. C.H. Yang, H. Yu, S. W. Kim, H. Saka, L. Horn, K. Goto, et al. 2020. "TATTON: A Multi-Arm, Phase Ib Trial of Osimertinib Combined with Selumetinib, Savolitinib, or Durvalumab in EGFR-Mutant Lung Cancer." *Annals of Oncology* 31 (4): 507–16. <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2020.01.013>.

- Oxnard, Geoffrey R., Mireille Cantarini, Paul Frewer, George Hawkins, Jane Peters, Paul Howarth, Ghada F. Ahmed, et al. 2019. "SAVANNAH: A Phase II Trial of Osimertinib plus Savolitinib for Patients (Pts) with EGFR -Mutant, MET -Driven (MET +), Locally Advanced or Metastatic Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC), Following Disease Progression on Osimertinib. ." *Journal of Clinical Oncology* 37 (15_suppl): TPS9119–TPS9119. https://doi.org/10.1200/jco.2019.37.15_suppl.tps9119.
- Paik, Paul K., Enriqueta Felip, Remi Veillon, Hiroshi Sakai, Alexis B. Cortot, Marina C. Garassino, Julien Mazieres, et al. 2020. "Tepotinib in Non–Small-Cell Lung Cancer with MET Exon 14 Skipping Mutations ." *New England Journal of Medicine*, May. <https://doi.org/10.1056/nejmoa2004407>.
- Paik, Paul K., Enriqueta Felip, Remi Veillon, Jürgen Scheele, and Rolf Bruns. 2017. "Phase II Trial of the C-Met Inhibitor Tepotinib in Advanced Lung Adenocarcinoma with MET Exon 14 Skipping Mutations." *Journal of Clinical Oncology* 35 (15_suppl): e20541–e20541. https://doi.org/10.1200/JCO.2017.35.15_suppl.e20541.
- Park, K., J. Zhou, D.-W. Kim, A.R. Ahmad, R.A. Soo, R. Bruns, J. Straub, et al. 2019. "Tepotinib plus Gefitinib in Patients with MET-Amplified EGFR-Mutant NSCLC: Long-Term Outcomes of the INSIGHT Study." *Annals of Oncology* 30 (November): ix159. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdz437.003>.
- Park, M., M. Dean, K. Kaul, M. J. Braun, M. A. Gonda, and G. Vande Woude. 1987. "Sequence of MET Protooncogene CDNA Has Features Characteristic of the Tyrosine Kinase Family of Growth-Factor Receptors." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84 (18): 6379–83. <https://doi.org/10.1073/pnas.84.18.6379>.
- Passaro, A., A. Prelaj, A. Pochesci, G. Spitaleri, G. Rossi, E. Del Signore, C. Catania, and F. de Marinis. 2017. "Brigatinib for the Treatment of ALK-Positive Advanced Non-Small Cell Lung Cancer Patients." *Drugs of Today* 53 (8): 435. <https://doi.org/10.1358/dot.2017.53.8.2676119>.
- Paumelle, Rejane, David Tulasne, Zoulika Kherrouche, Serge Plaza, Catherine Leroy, Sylvie Reveneau, Bernard Vandenbunder, Veronique Fafeur, David Tulashe, and Sylene Reveneau. 2002. "Hepatocyte Growth Factor/Scatter Factor Activates the ETS1 Transcription Factor by a RAS-RAF-MEK-ERK Signaling Pathway." *Oncogene* 21 (15): 2309–19. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1205297>.
- Paz-Ares, Luis, Alexander Luft, David Vicente, Ali Tafreshi, Mahmut Gümüş, Julien Mazières, Barbara Hermes, et al. 2018. "Pembrolizumab plus Chemotherapy for Squamous Non-Small-Cell Lung Cancer." *The New England Journal of Medicine*, September. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1810865>.
- Paz-Ares, Luis, E. H. Tan, K. O'Byrne, L. Zhang, V. Hirsh, M. Boyer, J. C.H. Yang, et al. 2017. "Afatinib versus Gefitinib in Patients with EGFR Mutation-Positive Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer: Overall Survival Data from the Phase IIb LUX-Lung 7 Trial." *Annals of Oncology* 28 (2): 270–77. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdw611>.
- Pelicci, G., S. Giordano, Z. Zhen, A. E. Salcini, L. Lanfrancone, A. Bardelli, G. Panayotou, et al. 1995. "The Motogenic and Mitogenic Responses to HGF Are Amplified by the Shc Adaptor Protein." *Oncogene* 10 (8): 1631–38. <https://moh-it.pure.elsevier.com/en/publications/the-motogenic-and-mitogenic-responses-to-hgf-are-amplified-by-the>.
- Pento, Joseph Thomas. 2017. "Monoclonal Antibodies for the Treatment of Cancer." *Anticancer Research*. International Institute of Anticancer Research. <https://doi.org/10.21873/anticancer.12040>.
- Peschard, Pascal, Noboru Ishiyama, Tong Lin, Stan Lipkowitz, and Morag Park. 2004. "A Conserved DpYR Motif in the Juxtamembrane Domain of the Met Receptor Family Forms an Atypical C-Cbl/Cbl-b Tyrosine Kinase Binding Domain Binding Site Required for Suppression of Oncogenic Activation." *Journal of Biological Chemistry* 279 (28): 29565–71. <https://doi.org/10.1074/jbc.M403954200>.
- Peters, Solange, D. Ross Camidge, Alice T. Shaw, Shirish Gadgeel, Jin S. Ahn, Dong-Wan Kim, Sai-Hong I. Ou, et al. 2017. "Alectinib versus Crizotinib in Untreated ALK -Positive Non–Small-Cell Lung Cancer." *New England Journal of Medicine*, June, NEJMoa1704795. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1704795>.

- Petrelli, Annalisa, Giorgio F. Gilestro, Stefania Lanzardo, Paolo M. Comoglio, Nicola Migone, and Silvia Giordano. 2002. "The Endophilin-CIN85-Cbl Complex Mediates Ligand-Dependent Downregulation of c-Met." *Nature* 416 (6877): 187–90. <https://doi.org/10.1038/416187a>.
- Planchard, D., S. Popat, K. Kerr, S. Novello, E. F. Smit, C. Faivre-Finn, T. S. Mok, et al. 2018. "Metastatic Non-Small Cell Lung Cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for Diagnosis, Treatment and Follow-Up." *Annals of Oncology* 29 (October): iv192–237. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdy275>.
- Planchard, David, Egbert F Smit, Harry J M Groen, Julien Mazieres, Benjamin Besse, Åslaug Helland, Vanessa Giannone, et al. 2017. "Dabrafenib plus Trametinib in Patients with Previously Untreated BRAFV600E-Mutant Metastatic Non-Small-Cell Lung Cancer: An Open-Label, Phase 2 Trial." *The Lancet Oncology* 18 (10): 1307–16. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(17\)30679-4](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(17)30679-4).
- Pons-Tostivint, Elvire, Benoît Thibault, and Julie Guillermet-Guibert. 2017. "Targeting PI3K Signaling in Combination Cancer Therapy." *Trends in Cancer* 3 (6): 454–69. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2017.04.002>.
- Ponzetto, C, A Bardelli, F Maina, P Longati, G Panayotou, R Dhand, M D Waterfield, and P M Comoglio. 1993. "A Novel Recognition Motif for Phosphatidylinositol 3-Kinase Binding Mediates Its Association with the Hepatocyte Growth Factor/Scatter Factor Receptor." *Molecular and Cellular Biology* 13 (8): 4600–4608. <https://doi.org/10.1128/mcb.13.8.4600>.
- Ponzetto, Carola, Alberto Bardelli, Zhu Zhen, Flavio Maina, Paolo dalla Zonca, Silvia Giordano, Andrea Graziani, George Panayotou, and Paolo M. Comoglio. 1994. "A Multifunctional Docking Site Mediates Signaling and Transformation by the Hepatocyte Growth Factor/Scatter Factor Receptor Family." *Cell* 77 (2): 261–71. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90318-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90318-2).
- Prat, Maria, Radha P. Narsimhan, Tiziana Crepaldi, M. Rita Nicotra, Pier G. Natali, and Paolo M. Comoglio. 1991. "The Receptor Encoded by the Human C-MET Oncogene Is Expressed in Hepatocytes, Epithelial Cells and Solid Tumors." *International Journal of Cancer* 49 (3): 323–28. <https://doi.org/10.1002/ijc.2910490302>.
- Prunotto, Chiara, Tiziana Crepaldi, Paolo E. Forni, Alessandro Ieraci, Robert G. Kelly, Shahragim Tajbakhsh, Margaret Buckingham, and Carola Ponzetto. 2004. "Analysis of Mlc-LacZ Met Mutants Highlights the Essential Function of Met for Migratory Precursors of Hypaxial Muscles and Reveals a Role for Met in the Development of Hyoid Arch-Derived Facial Muscles." *Developmental Dynamics* 231 (3): 582–91. <https://doi.org/10.1002/dvdy.20177>.
- Pylayeva-Gupta, Yuliya, Elda Grabocka, and Dafna Bar-Sagi. 2011. "RAS Oncogenes: Weaving a Tumorigenic Web." *Nature Reviews Cancer*. Nat Rev Cancer. <https://doi.org/10.1038/nrc3106>.
- Qiao, Huan, and Christine M Lovly. 2016. "Cracking the Code of Resistance across Multiple Lines of ALK Inhibitor Therapy in Lung Cancer." *Cancer Discovery* 6 (10): 1084–86. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-16-0910>.
- Qin, Shukui, Stephen Lam Chan, Wattana Sukeepaisarnjaroen, Guohong Han, Su Pin Choo, Virote Sriuranpong, Hongming Pan, et al. 2019. "A Phase II Study of the Efficacy and Safety of the MET Inhibitor Capmatinib (INC280) in Patients with Advanced Hepatocellular Carcinoma." *Therapeutic Advances in Medical Oncology* 11. <https://doi.org/10.1177/1758835919889001>.
- Raiborg, Camilla, Tor Erik Rusten, and Harald Stenmark. 2003. "Protein Sorting into Multivesicular Endosomes." *Current Opinion in Cell Biology*. Elsevier Ltd. [https://doi.org/10.1016/S0955-0674\(03\)00080-2](https://doi.org/10.1016/S0955-0674(03)00080-2).
- Ramalingam, S S, Y Cheng, C Zhou, Y Ohe, F Imamura, B C Cho, M-C Lin, et al. 2018. "LBA50Mechanisms of Acquired Resistance to First-Line Osimertinib: Preliminary Data from the Phase III FLAURA Study." *Annals of Oncology* 29 (suppl_8). <https://doi.org/10.1093/annonc/mdy424.063>.
- Ramalingam, Suresh S., Johan Vansteenkiste, David Planchard, Byoung Chul Cho, Jhanelle E. Gray, Yuichiro Ohe, Caicun Zhou, et al. 2020. "Overall Survival with Osimertinib in Untreated, EGFR -Mutated Advanced NSCLC ." *New England*

- Journal of Medicine* 382 (1): 41–50. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1913662>.
- Reck, Martin, Delvys Rodríguez-Abreu, Andrew G. Robinson, Rina Hui, Tibor Csőszi, Andrea Fülöp, Maya Gottfried, et al. 2016. “Pembrolizumab versus Chemotherapy for PD-L1–Positive Non–Small-Cell Lung Cancer.” *New England Journal of Medicine* 375 (19): 1823–33. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1606774>.
- Recondo, Gonzalo, Magda Bahcall, Liam F. Spurr, Jianwei Che, Biagio Ricciuti, Giulia C. Leonardi, Ying Chun Lo, et al. 2020. “Molecular Mechanisms of Acquired Resistance to MET Tyrosine Kinase Inhibitors in Patients with MET Exon 14–Mutant NSCLC.” *Clinical Cancer Research* 26 (11): 2615–25. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-19-3608>.
- Renzo, M. F. Di, M. Olivero, T. Martone, A. Maffe, P. Maggiore, A. De Stefani, G. Valente, S. Giordano, G. Cortesina, and P. M. Comoglio. 2000. “Somatic Mutations of the MET Oncogene Are Selected during Metastatic Spread of Human HNSC Carcinomas.” *Oncogene* 19 (12): 1547–55. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1203455>.
- Rodon, Jordi, Giuseppe Curigliano, Jean Pierre Delord, Wael Harb, Analia Azaro, Yu Han, Celine Wilke, Valerie Donnet, Dalila Sellami, and Thaddeus Beck. 2018. “A Phase Ib, Open-Label, Dose-Finding Study of Alpelisib in Combination with Paclitaxel in Patients with Advanced Solid Tumors.” *Oncotarget* 9 (60): 31709–18. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.25854>.
- Rodrigues, G A, and M Park. 1993. “Dimerization Mediated through a Leucine Zipper Activates the Oncogenic Potential of the Met Receptor Tyrosine Kinase.” *Molecular and Cellular Biology* 13 (11): 6711–22. <https://doi.org/10.1128/mcb.13.11.6711>.
- Rodriguez-Viciano, Pablo, Patricia H. Warne, Ritu Dhand, Bart Vanhaesebroeck, Ivan Gout, Michael J. Fry, Michael D. Waterfield, and Julian Downward. 1994. “Phosphatidylinositol-3-OH Kinase Direct Target of Ras.” *Nature* 370 (6490): 527–32. <https://doi.org/10.1038/370527a0>.
- Romond, Edward H., Edith A. Perez, John Bryant, Vera J. Suman, Charles E. Geyer, Nancy E. Davidson, Elizabeth Tan-Chiu, et al. 2005. “Trastuzumab plus Adjuvant Chemotherapy for Operable HER2-Positive Breast Cancer.” *New England Journal of Medicine* 353 (16): 1673–84. <https://doi.org/10.1056/nejmoa052122>.
- Rosell, Rafael, Enric Carcereny, Radj Gervais, Alain Vergnenegre, Bartomeu Massuti, Enriqueta Felip, Ramon Palmero, et al. 2012. “Erlotinib versus Standard Chemotherapy as First-Line Treatment for European Patients with Advanced EGFR Mutation-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer (EURTAC): A Multicentre, Open-Label, Randomised Phase 3 Trial.” *The Lancet Oncology* 13 (3): 239–46. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(11\)70393-X](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(11)70393-X).
- Roskoski, Robert. 2015. “A Historical Overview of Protein Kinases and Their Targeted Small Molecule Inhibitors.” *Pharmacological Research*. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2015.07.010>.
- Rotow, Julia K, Philippe Gui, Wei Wu, Victoria M Raymond, Richard B Lanman, Frederic J Kaye, Nir Peled, et al. 2018. “Co-Occurring Genetic Alterations in the RAS Pathway Promote Resistance to MET Inhibitor Treatment in Non-Small Cell Lung Cancer with a MET Exon 14 Skipping Mutation.” *BioRxiv*, July, 374181. <https://doi.org/10.1101/374181>.
- Rubin, Jeffrey S., Donald P. Bottaro, and Stuart A. Aaronson. 1993. “Hepatocyte Growth Factor/Scatter Factor and Its Receptor, the c-Met Proto-Oncogene Product.” *BBA - Reviews on Cancer*. [https://doi.org/10.1016/0304-419X\(93\)90015-5](https://doi.org/10.1016/0304-419X(93)90015-5).
- Sabari, Joshua K., Fernando Santini, Isabella Bergagnini, W. Victoria Lai, Kathryn C. Arbour, and Alexander Drilon. 2017. “Changing the Therapeutic Landscape in Non-Small Cell Lung Cancers: The Evolution of Comprehensive Molecular Profiling Improves Access to Therapy.” *Current Oncology Reports*. Current Medicine Group LLC 1. <https://doi.org/10.1007/s11912-017-0587-4>.
- Salgia, Ravi. 2017. “MET in Lung Cancer: Biomarker Selection Based on Scientific Rationale.” *Molecular Cancer Therapeutics* 16 (4): 555–65. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-16-0472>.
- Sasaki, T., J. Koivunen, A. Ogino, M. Yanagita, S. Nikiforow, W. Zheng, C. Lathan, et al. 2011. “A Novel ALK Secondary

- Mutation and EGFR Signaling Cause Resistance to ALK Kinase Inhibitors." *Cancer Research* 71 (18): 6051–60. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-1340>.
- Sasaki, T., K. Okuda, W. Zheng, J. Butrynski, M. Capelletti, L. Wang, N. S. Gray, et al. 2010. "The Neuroblastoma-Associated F1174L ALK Mutation Causes Resistance to an ALK Kinase Inhibitor in ALK-Translocated Cancers." *Cancer Research* 70 (24): 10038–43. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-2956>.
- Scheffler, Matthias, Marc Bos, Masyar Gardizi, Katharina König, Sebastian Michels, Jana Fassunke, Carina Heydt, et al. 2015. "PIK3CA Mutations in Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC): Genetic Heterogeneity, Prognostic Impact and Incidence of Prior Malignancies." *Oncotarget* 6 (2): 1315–26. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.2834>.
- Schelter, Florian, Julia Kobuch, Marcia L. Moss, J. David Becherer, Paolo M. Comoglio, Carla Boccaccio, and Achim Krüger. 2010. "A Disintegrin and Metalloproteinase-10 (ADAM-10) Mediates DN30 Antibody-Induced Shedding of the Met Surface Receptor." *Journal of Biological Chemistry* 285 (34): 26335–40. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.106435>.
- Schiller, Joan H., David Harrington, Chandra P. Belani, Corey Langer, Alan Sandler, James Krok, Junming Zhu, and David H. Johnson. 2002. "Comparison of Four Chemotherapy Regimens for Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer." *New England Journal of Medicine* 346 (2): 92–98. <https://doi.org/10.1056/nejmoa011954>.
- Schmidt, Claudia, Friedhelm Blatt, Stefanie Goedecke, Volker Brinkmann, Wolfgang Zschesche, Melanie Sharpe, Ermanno Gherardi, and Carmen Birchmeler. 1995. "Scatter Factor/Hepatocyte Growth Factor Is Essential for Liver Development." *Nature* 373 (6516): 699–702. <https://doi.org/10.1038/373699a0>.
- Schmidt, Laura, Fuh-Mei Duh, Fan Chen, Takeshi Kishida, Gladys Glenn, Peter Choyke, Stephen W. Scherer, et al. 1997. "Germline and Somatic Mutations in the Tyrosine Kinase Domain of the MET Proto-Oncogene in Papillary Renal Carcinomas." *Nature Genetics* 16 (1): 68–73. <https://doi.org/10.1038/ng0597-68>.
- Schram, Alison M., Matthew T. Chang, Philip Jonsson, and Alexander Drilon. 2017. "Fusions in Solid Tumours: Diagnostic Strategies, Targeted Therapy, and Acquired Resistance." *Nature Reviews Clinical Oncology*. Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2017.127>.
- Schrock, Alexa B., Garrett M. Frampton, James Suh, Zachary R. Chalmers, Mark Rosenzweig, Rachel L. Erlich, Balazs Halmos, et al. 2016. "Characterization of 298 Patients with Lung Cancer Harboring MET Exon 14 Skipping Alterations." *Journal of Thoracic Oncology* 11 (9): 1493–1502. <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2016.06.004>.
- Schuler, M., R. Berardi, W. T. Lim, M. de Jonge, T. M. Bauer, A. Azaro, M. Gottfried, et al. 2020. "Molecular Correlates of Response to Capmatinib in Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer: Clinical and Biomarker Results from a Phase I Trial." *Annals of Oncology* 31 (6): 789–97. <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2020.03.293>.
- Sequist, L. V., B. A. Waltman, D. Dias-Santagata, S. Digumarthy, A. B. Turke, P. Fidias, K. Bergethon, et al. 2011. "Genotypic and Histological Evolution of Lung Cancers Acquiring Resistance to EGFR Inhibitors." *Science Translational Medicine* 3 (75): 75ra26–75ra26. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3002003>.
- Sequist, Lecia V., Ji Youn Han, Myung Ju Ahn, Byoung Chul Cho, Helena Yu, Sang We Kim, James Chih Hsin Yang, et al. 2020. "Osimertinib plus Savolitinib in Patients with EGFR Mutation-Positive, MET-Amplified, Non-Small-Cell Lung Cancer after Progression on EGFR Tyrosine Kinase Inhibitors: Interim Results from a Multicentre, Open-Label, Phase 1b Study." *The Lancet Oncology* 21 (3): 373–86. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(19\)30785-5](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(19)30785-5).
- Sequist, Lecia V., Belinda A Waltman, Dora Dias-Santagata, Subba Digumarthy, Alexa B Turke, Panos Fidias, Kristin Bergethon, et al. 2011. "Genotypic and Histological Evolution of Lung Cancers Acquiring Resistance to EGFR Inhibitors." *Science Translational Medicine* 3 (75): 75ra26. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3002003>.
- Shaw, A T, G J Riely, Y -J Bang, D -W Kim, D R Camidge, B J Solomon, M Varella-Garcia, et al. 2019. "Crizotinib in ROS1-Rearranged Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer (NSCLC): Updated Results, Including Overall Survival, from PROFILE 1001." *Annals of Oncology* 30 (7): 1121–26. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdz131>.

- Shaw, Alice T., Todd M. Bauer, Filippo de Marinis, Enriqueta Felip, Yasushi Goto, Geoffrey Liu, Julien Mazieres, et al. 2020. "First-Line Lorlatinib or Crizotinib in Advanced ALK -Positive Lung Cancer." *New England Journal of Medicine* 383 (21): 2018–29. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2027187>.
- Shaw, Alice T., Enriqueta Felip, Todd M. Bauer, Benjamin Besse, Alejandro Navarro, Sophie Postel-Vinay, Justin F. Gainor, et al. 2017. "Lorlatinib in Non-Small-Cell Lung Cancer with ALK or ROS1 Rearrangement: An International, Multicentre, Open-Label, Single-Arm First-in-Man Phase 1 Trial." *The Lancet Oncology* 18 (12): 1590–99. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(17\)30680-0](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(17)30680-0).
- Shaw, Alice T., Luc Friboulet, Ignaty Leshchiner, Justin F. Gainor, Simon Bergqvist, Alexei Brooun, Benjamin J. Burke, et al. 2016. "Resensitization to Crizotinib by the Lorlatinib ALK Resistance Mutation L1198F." *New England Journal of Medicine* 374 (1): 54–61. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1508887>.
- Shaw, Alice T., Dong-Wan Kim, Kazuhiko Nakagawa, Takashi Seto, Lucio Crinó, Myung-Ju Ahn, Tommaso De Pas, et al. 2013. "Crizotinib versus Chemotherapy in Advanced ALK -Positive Lung Cancer." *New England Journal of Medicine* 368 (25): 2385–94. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1214886>.
- Shaw, Alice T., Jean-François Martini, Benjamin Besse, Todd M. Bauer, Chia-Chi Lin, Ross A. Soo, Gregory J. Riely, et al. 2018. "Abstract CT044: Efficacy of Lorlatinib in Patients (Pts) with Advanced ALK-Positive Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC) and ALK Kinase Domain Mutations." *Cancer Research* 78 (13 Supplement): CT044–CT044. <https://doi.org/10.1158/1538-7445.am2018-ct044>.
- Shaw, Alice T, Enriqueta Felip, Todd M Bauer, Benjamin Besse, Alejandro Navarro, Sophie Postel-Vinay, Justin F Gainor, et al. 2017. "Lorlatinib in Non-Small-Cell Lung Cancer with ALK or ROS1 Rearrangement: An International, Multicentre, Open-Label, Single-Arm First-in-Man Phase 1 Trial." *The Lancet Oncology* 18 (12): 1590–99. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(17\)30680-0](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(17)30680-0).
- Shaw, Alice T, Leena Gandhi, Shirish Gadgeel, Gregory J Riely, Jeremy Cetnar, Howard West, D Ross Camidge, et al. 2016. "Alectinib in ALK-Positive, Crizotinib-Resistant, Non-Small-Cell Lung Cancer: A Single-Group, Multicentre, Phase 2 Trial." *The Lancet Oncology* 17 (2): 234–42. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(15\)00488-X](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(15)00488-X).
- Shaw, Alice T, Dong-Wan Kim, Raneeh Mehra, Daniel S W Tan, Enriqueta Felip, Laura Q M Chow, D Ross Camidge, et al. 2014. "Ceritinib in ALK-Rearranged Non-Small-Cell Lung Cancer." *N Engl J Med* 37013 (27). <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1311107>.
- Shaw, Alice T, Tae Min Kim, Lucio Crinò, Cesare Gridelli, Katsuyuki Kiura, Geoffrey Liu, Silvia Novello, et al. 2017. "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." *The Lancet. Oncology* 18 (7): 874–86. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(17\)30339-X](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(17)30339-X).
- Shaw, Alice Tsang, Pasi A. Janne, Benjamin Besse, Benjamin J. Solomon, Fiona Helen Blackhall, D. Ross Camidge, Tony Mok, et al. 2016. "Crizotinib vs Chemotherapy in ALK + Advanced Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC): Final Survival Results from PROFILE 1007. ." *Journal of Clinical Oncology* 34 (15_suppl): 9066–9066. https://doi.org/10.1200/jco.2016.34.15_suppl.9066.
- Shepherd, Frances A., José Rodrigues Pereira, Tudor Ciuleanu, Eng Huat Tan, Vera Hirsh, Sumitra Thongprasert, Daniel Campos, et al. 2005. "Erlotinib in Previously Treated Non-Small-Cell Lung Cancer." *New England Journal of Medicine* 353 (2): 123–32. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa050753>.
- Shi, Yuankai, Joseph Siu Kie Au, Sumitra Thongprasert, Sankar Srinivasan, Chun Ming Tsai, Mai Trong Khoa, Karin Heeroma, Yohji Itoh, Gerardo Cornelio, and Pan Chyr Yang. 2014. "A Prospective, Molecular Epidemiology Study of EGFR Mutations in Asian Patients with Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer of Adenocarcinoma Histology (PIONEER)." *Journal of Thoracic Oncology* 9 (2): 154–62. <https://doi.org/10.1097/JTO.0000000000000033>.

- Smit, Egbert F., Kazuhiko Nakagawa, Misako Nagasaka, Enriqueta Felip, Yasushi Goto, Bob T. Li, Jose Maria Pacheco, et al. 2020. "Trastuzumab Deruxtecan (T-DXd; DS-8201) in Patients with HER2-Mutated Metastatic Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC): Interim Results of DESTINY-Lung01." *Journal of Clinical Oncology* 38 (15_suppl): 9504–9504. https://doi.org/10.1200/jco.2020.38.15_suppl.9504.
- Soda, Manabu, Young Lim Choi, Munehiro Enomoto, Shuji Takada, Yoshihiro Yamashita, Shunpei Ishikawa, Shin-Ichiro Fujiwara, et al. n.d. "Identification of the Transforming EML4–ALK Fusion Gene in Non-Small-Cell Lung Cancer." <https://doi.org/10.1038/nature05945>.
- Solomon, B, A Shaw, S Ou, B Besse, E Felip, T Bauer, R Soo, et al. 2017. "OA 05.06 Phase 2 Study of Lorlatinib in Patients with Advanced ALK⁺/ROS1⁺ Non-Small-Cell Lung Cancer." *Journal of Thoracic Oncology* 12 (11): S1756. <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2017.09.351>.
- Solomon, Benjamin J., Tony Mok, Dong-Wan Kim, Yi-Long Wu, Kazuhiko Nakagawa, Tarek Mekhail, Enriqueta Felip, et al. 2014. "First-Line Crizotinib versus Chemotherapy in ALK -Positive Lung Cancer." *New England Journal of Medicine* 371 (23): 2167–77. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1408440>.
- Solomon, Benjamin J, Cai Cun Zhou, Alexander Drilon, Keunchil Park, Jürgen Wolf, Yasir Elamin, Hannah M Davis, et al. 2020. "Phase III Study of Selpercatinib vs Chemotherapy +/- Pembrolizumab in Untreated RET Positive Non-Small-Cell Lung Cancer ." *Future Oncology*, November. <https://doi.org/10.2217/fon-2020-0935>.
- Solomon, Benjamin, Marileila Varella-Garcia, and D Ross Camidge. 2009. "ALK Gene Rearrangements: A New Therapeutic Target in a Molecularly Defined Subset of Non-Small Cell Lung Cancer." *Journal of Thoracic Oncology* 4 (12): 1450–54. <https://doi.org/10.1097/JTO.0b013e3181c4dedb>.
- Song, Min Sup, Leonardo Salmena, and Pier Paolo Pandolfi. 2012. "The Functions and Regulation of the PTEN Tumour Suppressor." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 13 (5): 283–96. <https://doi.org/10.1038/nrm3330>.
- Soria, Jean-Charles, Ho-Young Lee, Janet I Lee, Luo Wang, Jean-Pierre Issa, Bonnie L Kemp, Diane D Liu, Jonathan M Kurie, Li Mao, and Fadlo R Khuri. 2002. "Lack of PTEN Expression in Non-Small Cell Lung Cancer Could Be Related to Promoter Methylation." *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 8 (5): 1178–84. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12006535>.
- Soria, Jean-Charles, Yuichiro Ohe, Johan Vansteenkiste, Thanyanan Reungwetwattana, Busyamas Chewaskulyong, Ki Hyeong Lee, Arunee Dechaphunkul, et al. 2018. "Osimertinib in Untreated EGFR -Mutated Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer ." *New England Journal of Medicine* 378 (2): 113–25. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1713137>.
- Soria, Jean-Charles, Daniel S W Tan, Rita Chiari, Yi-Long Wu, Luis Paz-Ares, Juergen Wolf, Sarayat L Geater, et al. 2017. "First-Line Ceritinib versus Platinum-Based Chemotherapy in Advanced ALK -Rearranged Non-Small-Cell Lung Cancer (ASCEND-4): A Randomised, Open-Label, Phase 3 Study." *The Lancet* 389 (10072): 917–29. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)30123-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)30123-X).
- Sos, Martin L, Mirjam Koker, Barbara A Weir, Stefanie Heynck, Rosalia Rabinovsky, Thomas Zander, Jens M Seeger, et al. 2009. "PTEN Loss Contributes to Erlotinib Resistance in EGFR-Mutant Lung Cancer by Activation of Akt and EGFR." *Cancer Research* 69 (8): 3256–61. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-4055>.
- Stamos, Jennifer, Robert A. Lazarus, Xiaoyi Yao, Daniel Kirchhofer, and Christian Wiesmann. 2004. "Crystal Structure of the HGF β -Chain in Complex with the Sema Domain of the Met Receptor." *EMBO Journal* 23 (12): 2325–35. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600243>.
- Stoker, Michael, Ermanno Gherardi, Marion Perryman, and Julia Gray. 1987. "Scatter Factor Is a Fibroblast-Derived Modulator of Epithelial Cell Mobility." *Nature* 327 (6119): 239–42. <https://doi.org/10.1038/327239a0>.
- Suzawa, Ken, Michael Offin, Daniel Lu, Christopher Kurzatkowski, Morana Vojnic, Roger S. Smith, Joshua K. Sabari, et al. 2019. "Activation of KRAS Mediates Resistance to Targeted Therapy in MET Exon 14–Mutant Non-Small Cell Lung

- Cancer." *Clinical Cancer Research* 25 (4): 1248–60. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-1640>.
- Suzawa, Ken, Michael Offin, Daniel Lu, Christopher Kurzatkowski, Morana Vojnic, Roger S Smith, Joshua K Sabari, et al. 2018. "Activation of KRAS Mediates Resistance to Targeted Therapy in MET Exon 14 Mutant Non-Small Cell Lung Cancer." *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, October, clincanres.1640.2018. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-1640>.
- Take, Hitoshi, Shinji Watanabe, Kazuyo Takeda, Zu Xi Yu, Nobuhisa Iwata, and Sachiko Kajigaya. 2000. "Cloning and Characterization of a Novel Adaptor Protein, CIN85, That Interacts with c-Cbl." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 268 (2): 321–28. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.2147>.
- Takeda, Hiromasa, Nagio Takigawa, Kadoaki Ohashi, Daisuke Minami, Itaru Kataoka, Eiki Ichihara, Nobuaki Ochi, Mitsune Tanimoto, and Katsuyuki Kiura. 2013. "Vandetanib Is Effective in EGFR-Mutant Lung Cancer Cells with PTEN Deficiency." *Experimental Cell Research* 319 (4): 417–23. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2012.12.018>.
- Tani, Tetsuo, Hiroyuki Yasuda, Junko Hamamoto, Aoi Kuroda, Daisuke Arai, Kota Ishioka, Keiko Ohgino, et al. 2016. "Activation of EGFR Bypass Signaling by TGF α Overexpression Induces Acquired Resistance to Alectinib in ALK-Translocated Lung Cancer Cells." *Molecular Cancer Therapeutics* 15 (1): 162–71. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-15-0084>.
- Tchekmedyan, Nishan, Siraj M Ali, Vincent A Miller, and Eric B Haura. 2016. "Acquired ALK L1152R Mutation Confers Resistance to Ceritinib and Predicts Response to Alectinib." *Journal of Thoracic Oncology : Official Publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* 11 (7): e87-8. <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2016.03.018>.
- Teis, D., and L. A. Huber. 2003. "The Odd Couple: Signal Transduction and Endocytosis." *Cellular and Molecular Life Sciences*. Cell Mol Life Sci. <https://doi.org/10.1007/s00018-003-3010-2>.
- Tempest, P. R., M. R. Stratton, and C. S. Cooper. 1988. "Structure of the Met Protein and Variation of Met Protein Kinase Activity among Human Tumour Cell Lines." *British Journal of Cancer* 58 (1): 3–7. <https://doi.org/10.1038/bjc.1988.150>.
- Tovar, Elizabeth A., and Carrie R. Graveel. 2017. "MET in Human Cancer: Germline and Somatic Mutations." *Annals of Translational Medicine*. AME Publishing Company. <https://doi.org/10.21037/atm.2017.03.64>.
- Toyokawa, Gouji, Eiko Inamasu, Shinichiro Shimamatsu, Tsukihisa Yoshida, Kaname Nosaki, Fumihiko Hirai, Masafumi Yamaguchi, Takashi Seto, Mitsuhiro Takenoyama, and Yukito Ichinose. 2015. "Identification of a Novel ALK G1123S Mutation in a Patient with ALK-Rearranged Non-Small-Cell Lung Cancer Exhibiting Resistance to Ceritinib." *JTO Acquisition* 10 (7): e55–57. <https://doi.org/10.1097/JTO.0000000000000509>.
- Tsao, Anne S., Xi Ming Tang, Bradley Sabloff, Lianchun Xiao, Hisayuki Shigematsu, Jack Roth, Margaret Spitz, Waun Ki Hong, Adi Gazdar, and Ignacio Wistuba. 2006. "Clinicopathologic Characteristics of the EGFR Gene Mutation in Non-Small Cell Lung Cancer." *Journal of Thoracic Oncology* 1 (3): 231–39. [https://doi.org/10.1016/S1556-0864\(15\)31573-2](https://doi.org/10.1016/S1556-0864(15)31573-2).
- TULASNE, DAVID, REJANE PAUMELLE, CATHERINE LEROY, SYLVIE REVENEAU, BERNARD VANDENBUNDER, and VERONIQUE FAFEUR. 2002. "Involvement of RAS-ERK Signaling in Multiple Biological Responses to HGF/SF." *Annals of the New York Academy of Sciences* 973 (1): 105–8. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2002.tb04615.x>.
- VanderLaan, Paul A., Deepa Rangachari, Susan M. Mockus, Vanessa Spottlow, Honey V. Reddi, Joan Malcolm, Mark S. Huberman, Loren J. Joseph, Susumu S. Kobayashi, and Daniel B. Costa. 2017. "Mutations in TP53 , PIK3CA , PTEN and Other Genes in EGFR Mutated Lung Cancers: Correlation with Clinical Outcomes." *Lung Cancer* 106 (April): 17–21. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2017.01.011>.
- Verret, B., J. Cortes, T. Bachelot, F. Andre, and M. Arnedos. 2019. "Efficacy of PI3K Inhibitors in Advanced Breast Cancer." *Annals of Oncology : Official Journal of the European Society for Medical Oncology*. NLM (Medline). <https://doi.org/10.1093/annonc/mdz381>.

- Verstreken, Patrik, Ole Kjaerulff, Thomas E. Lloyd, Richard Atkinson, Yi Zhou, Ian A. Meinertzhagen, and Hugo J. Bellen. 2002. "Endophilin Mutations Block Clathrin-Mediated Endocytosis but Not Neurotransmitter Release." *Cell* 109 (1): 101–12. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00688-8](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00688-8).
- Verstreken, Patrik, Tong Wey Koh, Karen L. Schulze, R. Grace Zhai, P. Robin Hiesinger, Yi Zhou, Sunil Q. Mehta, Yu Cao, Jack Roos, and Hugo J. Bellen. 2003. "Synaptojanin Is Recruited by Endophilin to Promote Synaptic Vesicle Uncoating." *Neuron* 40 (4): 733–48. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(03\)00644-5](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(03)00644-5).
- Wang, Q., P. Liu, J. M. Spangle, T. Von, T. M. Roberts, N. U. Lin, I. E. Krop, E. P. Winer, and J. J. Zhao. 2016. "PI3K-P110 α Mediates Resistance to HER2-Targeted Therapy in HER2+, PTEN-Deficient Breast Cancers." *Oncogene* 35 (27): 3607–12. <https://doi.org/10.1038/onc.2015.406>.
- Wang, Samantha X.Y., Bing M. Zhang, Heather A. Wakelee, Michael Z. Koontz, MingGui Pan, Maximilian Diehn, Christian A. Kunder, and Joel W. Neal. 2019. "Case Series of MET Exon 14 Skipping Mutation-Positive Non-Small-Cell Lung Cancers with Response to Crizotinib and Cabozantinib." *Anti-Cancer Drugs* 30 (5): 537–41. <https://doi.org/10.1097/CAD.0000000000000765>.
- Wang, Wen xian, Chunwei Xu, Yu Chen, You-cai Zhu, Yueping Liu, Hong Wang, Wu Zhuang, et al. 2018. "MET Gene Fusions in Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC) in the Chinese Population: A Multicenter Study. ." *Journal of Clinical Oncology* 36 (15_suppl): e13539–e13539. https://doi.org/10.1200/jco.2018.36.15_suppl.e13539.
- Waqar, Saiama Naheed, Mary Weber Redman, Susanne M. Arnold, Fred R. Hirsch, Philip C. Mack, Lawrence Howard Schwartz, David R. Gandara, et al. 2019. "Phase II Study of ABBV-399 (Process II) in Patients with C-MET Positive Stage IV/Recurrent Lung Squamous Cell Cancer (SCC): LUNG-MAP Sub-Study S1400K (NCT03574753)." *Journal of Clinical Oncology* 37 (15_suppl): 9075–9075. https://doi.org/10.1200/jco.2019.37.15_suppl.9075.
- Weidner, K. Michael, Jürgen Behrens, Joel Vandekerckhove, and Walter Birchmeier. 1990. "Scatter Factor: Molecular Characteristics and Effect on the Invasiveness of Epithelial Cells." *Journal of Cell Biology* 111 (5): 2097–2108. <https://doi.org/10.1083/jcb.111.5.2097>.
- Westover, D., J. Zugazagoitia, B. C. Cho, C. M. Lovly, and L. Paz-Ares. 2018. "Mechanisms of Acquired Resistance to First-and Second-Generation EGFR Tyrosine Kinase Inhibitors." *Annals of Oncology*. Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdx703>.
- Wolf, J, T Seto, J-Y Han, N Reguart, E B Garon, H J M Groen, D S Tan, et al. 2018. "LBA52Results of the GEOMETRY Mono-1 Phase II Study for Evaluation of the MET Inhibitor Capmatinib (INC280) in Patients (Pts) with MET Δ ex14 Mutated Advanced Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC)." *Annals of Oncology* 29 (suppl_8). <https://doi.org/10.1093/annonc/mdy424.090>.
- Wolf, Juergen, Tobias R. Overbeck, Ji-Youn Han, Maximilian Hochmair, Filippo de Marinis, Kadoaki Ohashi, Egbert F. Smit, et al. 2020. "Capmatinib in Patients with High-Level MET -Amplified Advanced Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC): Results from the Phase 2 GEOMETRY Mono-1 Study. ." *Journal of Clinical Oncology* 38 (15_suppl): 9509–9509. https://doi.org/10.1200/jco.2020.38.15_suppl.9509.
- Wu, Shang-Gin, Yih-Leong Chang, Chong-Jen Yu, Pan-Chyr Yang, and Jin-Yuan Shih. 2016. "The Role of PIK3CA Mutations among Lung Adenocarcinoma Patients with Primary and Acquired Resistance to EGFR Tyrosine Kinase Inhibition." *Scientific Reports* 6 (1): 35249. <https://doi.org/10.1038/srep35249>.
- Wu, Yi-Long, Masahiro Tsuboi, Jie He, Thomas John, Christian Grohe, Margarita Majem, Jonathan W. Goldman, et al. 2020. "Osimertinib in Resected EGFR -Mutated Non-Small-Cell Lung Cancer. ." *New England Journal of Medicine* 383 (18): 1711–23. <https://doi.org/10.1056/nejmoa2027071>.
- Wu, Yi Long, Ying Cheng, Xiangdong Zhou, Ki Hyeong Lee, Kazuhiko Nakagawa, Seiji Niho, Fumito Tsuji, et al. 2017. "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." *The Lancet Oncology* 18 (11): 1454–66. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(17\)30608-3](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(17)30608-3).
- Wu, Yi Long, Li Zhang, Dong Wan Kim, Xiaoqing Liu, Dae Ho Lee, James Chih Hsin Yang, Myung Ju Ahn, et al. 2018. "Phase Ib/II Study of Capmatinib (INC280) Plus Gefitinib after Failure of Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Inhibitor Therapy in Patients with EGFR-Mutated, MET Factor-Dysregulated Non-Small-Cell Lung Cancer." *Journal of Clinical Oncology* 36 (31): 3101–9. <https://doi.org/10.1200/JCO.2018.77.7326>.
- Xu, Tao, Hongxiang Wang, Xiaoquan Huang, Weiqing Li, Qilin Huang, Yong Yan, and Juxiang Chen. 2018. "Gene Fusion in Malignant Glioma: An Emerging Target for Next-Generation Personalized Treatment." *Translational Oncology*. Neoplasia Press, Inc. <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2018.02.020>.
- Xu, Tian-Xiao, Si-Fan Yu, Meng Ma, Jie Dai, Zhi-Hong Chi, Lu Si, Xi-Nan Sheng, Chuan-Liang Cui, Yan Kong, and Jun Guo. 2018. "CMET-N375S Germline Mutation Is Associated with Poor Prognosis of Melanoma in Chinese Patients." *Translational Cancer Research* 7 (2): 248–56. <https://doi.org/10.21037/19570>.
- Yakes, F. Michael, Jason Chen, Jenny Tan, Kyoko Yamaguchi, Yongchang Shi, Peiwen Yu, Fawn Qian, et al. 2011. "Cabozantinib (XL184), a Novel MET and VEGFR2 Inhibitor, Simultaneously Suppresses Metastasis, Angiogenesis, and Tumor Growth." *Molecular Cancer Therapeutics* 10 (12): 2298–2308. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-11-0264>.
- Yamamoto, H., H. Shigematsu, M. Nomura, W. W. Lockwood, M. Sato, N. Okumura, J. Soh, et al. 2008. "PIK3CA Mutations and Copy Number Gains in Human Lung Cancers." *Cancer Research* 68 (17): 6913–21. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-5084>.
- Yan, S. Betty, Victoria L. Peek, Rose Ajamie, Sean G. Buchanan, Jeremy R. Graff, Steven A. Heidler, Yu-Hua Hui, et al. 2013. "LY2801653 Is an Orally Bioavailable Multi-Kinase Inhibitor with Potent Activity against MET, MST1R, and Other Oncoproteins, and Displays Anti-Tumor Activities in Mouse Xenograft Models." *Investigational New Drugs* 31 (4): 833–44. <https://doi.org/10.1007/s10637-012-9912-9>.
- Yan, Sau-Chi Betty, Suzane L. Um, Victoria L. Peek, Jennifer R. Stephens, Wei Zeng, Bruce W. Konicek, Ling Liu, Volker Wacheck, and Richard A. Walgren. 2017. "Abstract 528: Evaluation of Single Agent Merestinib (LY2801653) or Emibetuzumab (LY2875358) and the Combination in a Xenograft Tumor Model Bearing MET Exon 14 Skipping." In *Molecular and Cellular Biology, Genetics*, 77:528–528. American Association for Cancer Research. <https://doi.org/10.1158/1538-7445.AM2017-528>.
- Yang, J.-., J. Fang, Y. Shu, J. Chang, G. Chen, J. He, W. Li, et al. 2017. "OA 09.06 A Phase Ib Trial of Savolitinib plus Gefitinib for Chinese Patients with EGFR-Mutant MET-Amplified Advanced NSCLC." *Journal of Thoracic Oncology* 12 (11): S1769. <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2017.09.379>.
- Yano, Seiji, Wei Wang, Qi Li, Kunio Matsumoto, Haruko Sakurama, Takahiro Nakamura, Hirokazu Ogino, et al. 2008. "Hepatocyte Growth Factor Induces Gefitinib Resistance of Lung Adenocarcinoma with Epidermal Growth Factor Receptor-Activating Mutations." *Cancer Research* 68 (22): 9479–87. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-1643>.
- Yeh, Iwei, Thomas Botton, Eric Talevich, A. Hunter Shain, Alyssa J. Sparatta, Arnaud De La Fouchardiere, Thaddeus W. Mully, et al. 2015. "Activating MET Kinase Rearrangements in Melanoma and Spitz Tumours." *Nature Communications* 6 (May): 7174. <https://doi.org/10.1038/ncomms8174>.
- Yoda, Satoshi, Jessica J Lin, Michael S Lawrence, Benjamin J Burke, Luc Friboulet, Adam Langenbucher, Leila Dardaei, et al. 2018. "Sequential ALK Inhibitors Can Select for Lorlatinib-Resistant Compound ALK Mutations in ALK-Positive Lung Cancer." *Cancer Discovery*, April, CD-17-1256. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-17-1256>.
- Yoo, Seol Bong, Xianhua Xu, Hyun Ju Lee, Sanghoon Jheon, Choon-Taek Lee, Gheeyoung Choe, and Jin-Haeng Chung. 2011.

- "Loss of PTEN Expression Is an Independent Poor Prognostic Factor in Non-Small Cell Lung Cancer." *The Korean Journal of Pathology* 45 (4): 329. <https://doi.org/10.4132/KoreanJPathol.2011.45.4.329>.
- Yu, Helena A., Ken Suzawa, Emmet Jordan, Ahmet Zehir, Ai Ni, Ryan Kim, Mark G. Kris, et al. 2018. "Concurrent Alterations in EGFR-Mutant Lung Cancers Associated with Resistance to EGFR Kinase Inhibitors and Characterization of MTOR as a Mediator of Resistance." *Clinical Cancer Research* 24 (13): 3108–18. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-17-2961>.
- Zhang, Jianming, Priscilla L. Yang, and Nathanael S. Gray. 2009. "Targeting Cancer with Small Molecule Kinase Inhibitors." *Nature Reviews Cancer*. Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrc2559>.
- Zhang, Sen, Sara Nadworny, Scott D. Wardwell, Lindsey Eichinger, Biplob Das, Emily Y. Ye, J. Graeme Hodgson, and Victor M. Rivera. 2015. "Abstract 781: The Potent ALK Inhibitor AP26113 Can Overcome Mechanisms of Resistance to First- and Second-Generation ALK TKIs in Preclinical Models." *Cancer Research* 75 (15 Supplement): 781–781. <https://doi.org/10.1158/1538-7445.AM2015-781>.
- Zhang, Yu Wen, Ling Mei Wang, Richard Jove, and George F. Vande Woude. 2002. "Requirement of Stat3 Signaling for HGF/SF-Met Mediated Tumorigenesis." *Oncogene* 21 (2): 217–26. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1205004>.
- Zhang, Yu, Jinping Yin, and Feng Peng. 2017. "Acquired Resistance to Crizotinib in Advanced Lung Adenocarcinoma with MET Exon 14 Skipping." *Lung Cancer (Amsterdam, Netherlands)* 113 (November): 69–71. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2017.09.006>.
- Zhou, Caicun, Yi-Long Wu, Gongyan Chen, Jifeng Feng, Xiao-Qing Liu, Changli Wang, Shucai Zhang, et al. 2011. "Erlotinib versus Chemotherapy as First-Line Treatment for Patients with Advanced EGFR Mutation-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer (OPTIMAL, CTONG-0802): A Multicentre, Open-Label, Randomised, Phase 3 Study." *The Lancet. Oncology* 12 (8): 735–42. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(11\)70184-X](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(11)70184-X).
- Zhu, Chengpei, Liangcai Wu, Yanling Lv, Jinxia Guan, Xue Bai, Jianzhen Lin, Tingting Liu, et al. 2019. "The Fusion Landscape of Hepatocellular Carcinoma." *Molecular Oncology* 13 (5): 1214–25. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.12479>.
- Zhu, Qingqing, Ping Zhan, Xinlin Zhang, Tangfeng Lv, and Yong Song. 2015. "Clinicopathologic Characteristics of Patients with ROS1 Fusion Gene in Non-Small Cell Lung Cancer: A Meta-Analysis." *Translational Lung Cancer Research* 4 (3): 300–309. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2218-6751.2015.05.01>.
- Zou, Helen Y., Luc Friboulet, David P. Kodack, Lars D. Engstrom, Qiu-hua Li, Melissa West, Ruth W. Tang, et al. 2015a. "PF-06463922, an ALK/ROS1 Inhibitor, Overcomes Resistance to First and Second Generation ALK Inhibitors in Preclinical Models." *Cancer Cell* 28 (1): 70–81. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2015.05.010>.
- Zou, Helen Y., Luc Friboulet, David P. Kodack, Lars D. Engstrom, Qiu-hua Li, Melissa West, Ruth W. Tang, et al. 2015b. "PF-06463922, an ALK/ROS1 Inhibitor, Overcomes Resistance to First and Second Generation ALK Inhibitors in Preclinical Models." *Cancer Cell* 28 (1): 70–81. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2015.05.010>.

9 Annexe

Annexe 1

Figure extraite de l'article « Ligand-dependent oncogene addiction of the MET exon14 skipping ; » ; soumission prévue en janvier 2021 » (A) Expérience de tumorigenèse in vivo sur souris hHGFki-SCID ; injection des lignées 16HBE6WT et 16HBE-Ex14 (B) Expérience de tumorigenèse in vivo sur souris hHGFki-SCID et NSG contrôle, injection de la lignée 16HBE-Ex14 (C) Efficacité de l'OMO-1 (inhibiteur MET) sur la croissance in-vivo de la lignée 16HBE-Ex14 dans les souris hHGFki-SCID.

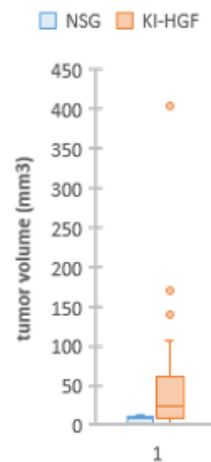
A.

	% of positive xenograft in KI-HGF mice	Mean volume (mm ³)
16HBE-WT	14 % (1/7)	47 +/- 0
16HBE-Ex14	100 % (7/7)	171 +/- 112

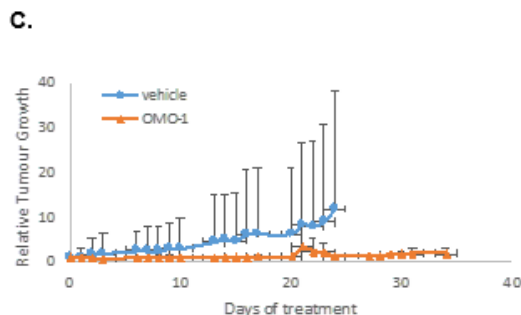
Comparé au récepteur sauvage, METex14 est un oncogène efficace en présence d'HGF.

B.

	% of positive 16HBE-Ex14 xenograft	Mean volume (mm ³)
Control NSG mice	35 (9/26)	8 +/- 4
KI-HGF mice	86 (38/44)	50 +/- 71



Le récepteur muté METex14 est un oncogène faible en absence de stimulation par son ligand



Efficacité du TKI-MET OMO-1 pour inhiber la croissance tumorale in vivo

Optimization of Routine Testing for *MET* Exon 14 Splice Site Mutations in NSCLC Patients



Clotilde Descarpentries, PharmD,^a Frédéric Leprêtre, PhD,^b
 Fabienne Escande, PharmD, PhD,^a Zoulika Kherrouche, PhD,^c Martin Figeac, PhD,^b
 Shéhérazade Sebda, MSc,^b Simon Baldacci, MD, PhD,^c Valérie Grégoire,^d
 Philippe Jamme, MD,^c Marie-Christine Copin, MD, PhD,^{c,d} David Tulasne, PhD,^c
 Alexis B. Cortot, MD, PhD^{c,e,*}

^aDepartment of Biochemistry and Molecular Biology, Hormonology Metabolism Nutrition Oncology, CHU Lille, Lille, France

^bLille University, Functional and Structural Platform, CHU Lille, Lille, France

^cLille University, CNRS, Institut Pasteur de Lille, Mechanisms of Tumorigenesis and Targeted Therapies, Lille, France

^dLille University, Pathology Department, CHU Lille, Lille, France

^eLille University, Thoracic Oncology Department, CHU Lille, Lille, France

Received 18 April 2018; revised 3 August 2018; accepted 14 August 2018

Available online - 6 September 2018

ABSTRACT

Introduction: Genomic alterations affecting splice sites of MNNG HOS transforming gene (*MET*) exon 14 were recently identified in NSCLC patients. Objective responses to *MET* tyrosine kinase inhibitors have been reported in these patients. Thus, detection of *MET* exon 14 splice site mutations represents a major challenge. So far, most of these alterations were found by full-exome sequencing or large capture-based next-generation sequencing (NGS) panels, which are not suitable for routine diagnosis.

Methods: Aiming to provide a molecular testing method applicable in routine practice, we first developed a fragment-length analysis for detecting deletions in introns flanking *MET* exon 14. Second, we designed an optimized targeted NGS panel called CLAPv1, covering the *MET* exon 14 and flanking regions in addition to the main molecular targets usually covered in genomic testing. In patients with *MET* exon 14 mutations, *MET* gene amplification, gene copy number and *MET* receptor expression were also determined.

Results: Among 1514 formalin-fixed paraffin-embedded NSCLC samples, nonoptimized NGS allowed detection of *MET* exon 14 mutations in only 0.3% of the patients, and fragment length analysis detected deletions in 1.1% of the patients. Combined, the optimized CLAPv1 panel and fragment-length analysis implemented for routine molecular testing revealed *MET* exon 14 alterations in 2.2% of 365 additional NSCLC patients. *MET* gene amplification or high gene copy number was observed in 6 of 30 patients (20%) harboring *MET* exon 14 mutations.

Conclusions: These results show that optimized targeted NGS and fragment-length analysis improve detection of *MET* alterations in routine practice.

© 2018 International Association for the Study of Lung Cancer. Published by Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: *MET*; Receptor tyrosine kinase; Next-generation sequencing; Lung cancer; Splice site

Introduction

Targeted therapies have recently changed the care of patients with cancers displaying well-defined oncogene-addiction-causing alterations. Several such genomic

*Corresponding author.

Drs. Descarpentries and Leprêtre contributed equally to this work.

Disclosure: Dr. Descarpentries has received personal fees from Astra Zeneca and Novartis Pharma SAS; and has received nonfinancial support from Astra Zeneca, Novartis Pharma SAS, Roche SAS, Boehringer Ingelheim France, and Pfizer. Dr. Escande has received personal fees and nonfinancial support from Astra Zeneca, Boehringer, and Roche. Dr. Kherrouche has received grants from Canceropole Nord-ouest, ANR Metropolis, Ligue Contre le Cancer, INCA, and Merck. Dr. Baldacci has received personal fees from Astra Zeneca, Roche, and Glaxo Smith Kline, Lilly, and Pfizer. Dr. Jamme has received grants from Canceropole Nord-ouest, ANR Metropolis, Ligue Contre le Cancer, INCA, and Merck; and has received personal fees from Chugai Pharma and Boehringer. Dr. Tulasne has received grants from Canceropole Nord-ouest, Agence Nationale pour la recherche ANR, Ligue Nationales Contre le Cancer, Institut National du Cancer INCa, Merck, and Roche. Dr. Cortot has received grants from Canceropole Nord-ouest, Agence Nationale pour la recherche ANR, Ligue Nationale Contre le Cancer, Institut National du Cancer INCa, and Merck; and has received personal fees from Astra Zeneca, Bristol Myers Squibb, MSD, Roche, Novartis, Pfizer, and Takeda. The remaining authors declare no conflict of interest.

Address for correspondence: Alexis Cortot, MD, PhD, Thoracic Oncology Department, Hôpital Calmette, CHU Lille, F-59000 Lille, France. E-mail: alexis.cortot@chru-lille.fr

© 2018 International Association for the Study of Lung Cancer. Published by Elsevier Inc. All rights reserved.

ISSN: 1556-0864

<https://doi.org/10.1016/j.jtho.2018.08.2023>

alterations have been evidenced, including mutations, translocations, and gene amplifications. In NSCLC, mutations occurring in the kinase domain of EGFR or BRAF and rearrangements involving the tyrosine kinase receptor ALK receptor tyrosine kinase (ALK) or ROS1 define unique subsets of patients who benefit from tyrosine kinase inhibitors (TKIs). Point mutations, insertions, and deletions are usually investigated by next-generation sequencing (NGS), with the help of commercial panels covering the main oncogenes amenable to targeted therapies. However, the spectrum of targetable molecular alterations is constantly expanding with the regular discovery of novel driver alterations in oncogenes and tumor suppressor genes. Recent publications describe a set of novel mutations located within splice sites of MNNG HOS transforming gene (*MET*) exon 14, causing constitutive activation of the MET receptor.

MET is a receptor tyrosine kinase produced predominantly in cells of epithelial origin. It is activated by its stromal ligand, the hepatocyte growth factor, also called scatter factor.¹ Hepatocyte growth factor and *MET* are essential to embryonic development and tissue regeneration in adults.²⁻⁹ Amplification of the *MET* gene, leading to its massive expression and ligand-independent activation, has been reported in 1% to 5% of gastric and lung cancers.¹⁰⁻¹² *MET* kinase domain mutations have also been described in various cancer types, including renal and lung cancers.¹³ In a recent study, mutations at *MET* exon 14 splice sites were found in approximately 3% of the profiled lung tumors.¹⁴ To date, more than 130 different mutations altering splice sites of *MET* exon 14 have been described. These mutations include point mutations, deletions, insertions, and complex mutations (indels), all of which affect conserved sequences of splice donor or acceptor sites. At the 5' end of the exon, most of the alterations are deletions, insertions, and indels affecting the splice acceptor site, the branch point, or the polypyrimidine tract. At the 3' end, most are point mutations affecting the splice donor site.¹⁵ All these alterations are thought to induce in-frame exon 14 skipping, which leads to deletion of the juxtamembrane domain of the *MET* receptor. This juxtamembrane domain is a well-known negative regulatory domain containing at least three regulatory sites: (1) a ligand-dependent phosphorylated tyrosine residue (Y1003) involved in receptor degradation through recruitment of the ubiquitin ligase CBL proto-oncogene (CBL), (2) a phosphorylated serine residue (S985) involved in downregulation of *MET* kinase activity, and (3) a caspase cleavage site involved in *MET* degradation during apoptosis. Thus, *MET* exon 14 splicing and subsequent juxtamembrane domain skipping result in constitutive *MET* activation (for a review see Cortot et al.¹⁶).

Importantly, several case reports describe objective responses to *MET*-targeting TKIs in patients with such mutations, and preliminary results of a phase I clinical trial reported a 39% objective response rate with crizotinib.^{15,17-27} Thus, identifying NSCLC patients harboring *MET* exon 14 splice site mutations has become an important goal. Given the expected low rate of such mutations, clinicians need a sensitive routine method for detecting them to identify all patients liable to benefit from *MET* TKI treatment.

MET exon 14 splice site mutations have been found mainly by whole-exome sequencing, large-hybrid-capture-based NGS, or Sanger sequencing of *MET*.^{14,15,28-30} Such technologies are not applicable in routine practice because of high cost, the need to use large tumor samples, or a lack of sensitivity. In contrast, targeted NGS, now widely implemented in molecular laboratories, allows comprehensive routine molecular profiling of tumor samples enabling the detection of known altered oncogenes and tumor suppressors. Commercially available panels, however, are not suitable for detecting the wide range of *MET* exon 14 splice site mutations because of the great diversity and specific localization of these alterations.³¹

Here we describe a method for detecting *MET* exon 14 splice site mutations. It can be implemented in routine practice and is based on combining fragment-length analysis with optimized targeted NGS.

Materials and Methods

Tumor Samples and DNA/RNA Extraction

Formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) samples from non-small cell lung tumors were received in our laboratory between October 2015 and December 2017, in the context of daily practice. Before molecular analysis, a hematoxylin-and-eosin-stained slide was prepared from each tumor and examined by a pathologist. The pathologist evaluated the tumor cell content. If easily feasible, macrodissection was performed to enhance the tumor cell content. DNA was extracted from FFPE tumor blocks. Briefly, 10- μ m-thick sections were cut from each block. After removing the paraffin with Deparaffinization Solution (Qiagen, Courtaboeuf, France), DNA was extracted with the QIAamp FFPE tissue kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. Extracted DNA was quantified with the Quant-it PicoGreen dsDNA Assay Kit (ThermoFisher Scientific, Courtaboeuf, France) on a Xenius XC spectrofluorometer (Safas, Monaco). Immunohistochemistry (IHC) (for *MET* expression) and fluorescence in situ hybridization (FISH) (for detection of *MET* gene amplification) were performed on 4- μ m-thick FFPE sections. RNA was extracted from three 20- μ m-thick sections of

each available FFPE tumor block. This was done with the Total RNA FFPE tissue kit (Macherey-Nagel, Inc., Bethlehem, Pennsylvania) according to the manufacturer's instructions.

NGS Panel Design

The panel designed for FFPE samples was developed with the AmpliSeq designer software (ThermoFisher Scientific) with white glove assistance to cover some positions. These targets were partially selected from the Ion AmpliSeq Colon and Lung Research Panel V2, and the panel was optimized to cover the whole *MET* exon 14 to detect most of the described variants. Additional targets included partial or entire exons of the following selected genes: *ACVR1*, *AKT1*, *ALK*, *BRAF*, *CTNNB1*, *EGFR*, *ERBB2*, *ERBB4*, *FGFR1*, *FGFR2*, *FGFR3*, *GNA11*, *GNAQ*, *GNAS*, *H3F3A*, *H3F3B*, *HIST1H3B*, *HIST1H3C*, *HRAS*, *IDH1*, *IDH2*, *KRAS*, *KIT*, *MAP2K1*, *MET*, *NRAS*, *PDGFRA*, *PIK3CA*, *PTEN*, *PTPN11*, *SMAD4*, and *TP53*. The designed panel named CLAPv1 is provided in [Supplementary Table S3](#).

Library Preparation

AmpliSeq libraries were prepared with the Ion AmpliSeq Library Kit 2.0, the Ion Xpress Barcode Adapter Kit, and primers (Ion AmpliSeq custom panel or Colon and Lung V2) (ThermoFisher Scientific). Ten nanograms of each DNA sample were used as template to prepare the library according to the manufacturer's instructions. Quality control and quantification of all libraries were performed on the Agilent 2200 (Agilent Technologies, Inc., Wilmington, Delaware) TapeStation using the High Sensitivity D1000 ScreenTape assay. After normalization, the libraries were pooled. Emulsion polymerase chain reaction (PCR) was used to clonally amplify the obtained library pool, diluted to 65 $\mu\text{mol/L}$. Emulsion PCR, enrichment, and chip loading were performed on an Ion Chef instrument with the Ion P Hi-Chef Kit or the Ion 54 Kit-Chef (ThermoFisher Scientific). Samples were sequenced using Ion P1 chips on the Ion Proton System or Ion 540 chips on the Ion S5XL system (ThermoFisher Scientific). Forty-eight barcoded samples were loaded per chip, that is, 45 patient tumor samples and 3 control samples. A positive control, a negative control, and a nontemplate control were analyzed on each run to ensure the analytical performance of the assay. Data were analyzed with Torrent Suite Software v.5.2.2 (ThermoFisher Scientific). Variant calling was performed with optimized settings (available on demand). The variants obtained were annotated with the Variant Effect Predictor.³² Control sample analysis and quality metrics were checked on each sample to avoid false results: mean read length greater than 108 bp and number of variants less than 35. If these quality metrics were not achieved, the

sample was considered not interpretable. The lower limit of detection for our NGS assays was approximately 5% mutated DNA (i.e., 10% tumor cells). If a sample contained less than 10% tumor cells and no mutation on any driver gene, it was considered not interpretable (risk of false-negative results). For a wild-type (WT) call, a minimum of 500 \times was required.

IHC

For MET IHC staining, the Ultra automated slide processing system (Ventana Roche, Tucson, Arizona) was used according to the manufacturer's protocol, with rabbit monoclonal primary antibody against MET (CONFIRM Anti-Total MET, clone SP44, Ventana), as previously described.³³

FISH

Gene copy number (GCN) and *MET* gene amplification were determined by FISH as previously described.³⁴ FFPE tissue sections were hybridized with SPEC Zytolight Dual Color probe *MET/CEN7q* (Zytovision ref Z-2087-200 GmbH, Bremerhaven, Germany) according to the manufacturer's instructions.

Evaluation of *MET* GCN was performed on the whole slide for each sample. Signals were counted in at least 100 nonoverlapping nuclei per slide, with an epifluorescence microscope (Olympus BX63) and an automated imaging application (BioView, Abbott, Berkshire, United Kingdom). The following data were recorded for each sample: mean *MET* GCN per cell and the *MET/CEN7* ratio.

Tumors were classified according to the *MET* amplification status, which provides the clearest definition of a *MET*-GCN-gain-addicted state. This status was defined as follows: high-level amplification, when the *MET/CEN7* ratio was greater than or equal to 5 or when 10% or more of the tumor cells displayed clusters or 15 or more copies of the *MET* gene; intermediate-level amplification when the *MET/CEN7* ratio was greater than 2.2 but less than 5; low-level amplification when the *MET/CEN7* ratio was 1.8 or more but less than or equal to 2.2. All other tumors were classified as negative.³⁵

Fragment-Length Analysis

Intron sequences flanking exon 14 of *MET* were amplified with two primer pairs in one tube. The primer pair for MET1 was: MET1_F 5'-CATGAGTTCTGGG CACTGG, MET1_R 5'-6-FAM-CTTCTGGAAAAGTAGCTCGG and the primer pair for MET 2 was: MET2_F 5'-TAAGTGCCCGAAGT GTAAGC, MET2_R 5'-HEX-CAA CAATGTCACAACCCACTG. PCR was performed in a 25- μL final volume containing 1 \times Multiplex Master Mix (Qiagen), 0.4 $\mu\text{mol/L}$ MET1 primer pair, 0.2 $\mu\text{mol/L}$ MET2

primer pair, and 5 to 25 ng DNA. The cycling conditions were: 95°C for 15 minutes, followed by 33 cycles of 95°C for 30 seconds, 62°C for 30 seconds, 72°C for 30 seconds, and a final extension of 72°C for 10 minutes. Fluorescent amplified products were separated on an ABI Prism 3130XL analyzer (ThermoFisher Scientific). Data were interpreted with GeneMapper software version 4.1 (ThermoFisher Scientific) followed by visual inspection. The lower limit of detection of the fragment analysis assay was approximately 10% mutated DNA (i.e., 20% tumor cells).

Real-Time Reverse Transcribed-PCR and Melting Curves

Total cDNA was reverse-transcribed from total RNA with random hexamers, using the High Capacity cDNA Reverse Transcriptase Kit (Applied Biosystems, Foster City, California). Two primer pairs in exons flanking exon 14 of *MET* were designed to generate fragments of different sizes and melting temperatures for wild type *MET* and *MET* displaying exon 14 skipping. The primer pair A was: MET3: 5'-GGTTTTTCCTGTGGCTGAAA, MET4: 5'-GGCATGAACCGTTCTGAGAT and the primer pair B was: MET5: 5'CCAGATCAGAATTTACAGG and MET4. Fragments were amplified with Fast SYBR Green mix (Applied Biosystems) in an Mx3005P instrument (Agilent), as described by the supplier. The cycling conditions were: 95°C for 5 minutes, followed by 40 cycles of 95°C for 15 seconds, 60°C for 30 seconds, and a final cycle 95°C for 1 minute, 55°C for 30 seconds and 95°C for 30 seconds. The dissociation curves of the amplified products were analyzed with MxPro software version 4.10. The PCR products were separated on 2.0% agarose gels and visualized under ultraviolet light.

Copy Number Analysis of the NGS Data

The count assigned to each amplicon for each sample was computed from bam files with bedtools coverage [bedtools], taking into account only reads showing a 95% overlap with the amplicon.³⁶ Log read counts were normalized on the basis of the GC percentage and size of each amplicon, the Guanine Cytosine (GC) percentages of the forward and reverse primers, and also the GC percentage of a 150-kb window around the amplicon as in [WACA].³⁷ We also normalized the read count with respect to the derivative log ratio spread (DLRS) introduced by Agilent Technologies for comparative genomic hybridization arrays to take DNA quality into account. All normalizations were performed with a multiple linear model in one step. The log₂ ratio of each amplicon for each sample was computed as the log₂ of the number obtained by dividing the normalized read count for a particular sample by the median read count of all

samples. Segmentation of the log₂ ratio was performed with the CNA package of R, implementing the circular binary segmentation method.³⁸ We only kept segments with a mean log₂ ratio above max (1.5 × DLRS, 1) or below min (-1.5 × DLRS, -0.5) and encompassing at least 3 amplicons.

Results

Optimization of Targeted NGS and Fragment Analysis for Detecting *MET* Exon 14 Splice Site Mutations

Between November 2015 and August 2017, 1826 FFPE tumor samples from 1722 NSCLC patients were received in our laboratory for molecular screening as part of its routine practice. All samples were tested with the "Colon&Lung V2" NGS panel. For 208 of the 1722 patients (12%), the sequencing data were not interpretable because of poor DNA quality or insufficient quantity (138 patients) or a low number of tumor cells (70 patients). Among the 1514 remaining patients, the main mutations detected were *KRAS* (36.2%), *EGFR* (13.1%), *BRAF* (4%), and *ERBB2* (0.3%) mutations (Fig. 1A). *MET* exon 14 splice site mutations were detected in 4 patients (0.3%) (Fig. 1A, Supplementary Table 1A).

To optimize detection of the wide range of *MET* exon 14 splice site mutations, we developed two alternative molecular screens, one based on fragment-length analysis and one on optimized targeted NGS. We set up a fragment-length analysis with primers surrounding either the 5' (225 bp) or the 3' end (142 bp) of exon 14, covering 91% of the previously identified deletions (Fig. 2).¹⁵ Among the 1514 samples screened by fragment-length analysis and yielding interpretable results, 16 *MET* exon 14 splice site mutations (1.1%) were detected, including mutations in both the 5' and 3' ends of exon 14 (Fig. 3A, Supplemental Table 1A). Differences between mutant and WT alleles ranged from 1 to 55 bp. Representative fragment analyses of WT and mutant samples are shown (Supplemental Figs. 1A, B, and C). One complex indel (patient 21) detected with the Colon&Lung V2 panel (mutant allele frequency: 3%) (Supplemental Table 1A) was not picked up by the fragment analysis.

An optimized NGS panel named CLAPv1 (Colon&Lung Adapted Panel Version 1) was derived from the Colon&Lung V2 panel. It contained 182 amplicons ranging from 62 to 154 bases in size (mean, 112 bases) and spanning 12.93 kb of the human genome (hg19) in 2 pools. This CLAPv1 panel was notably designed to better cover *MET* exon 14 splice site mutations, using 3 amplicons respectively covering the 140 bp of exon 14, 97 bp of intron 13, and 36 bp of intron 14. These amplicons thus cover 87% of the *MET* exon 14 alterations previously described (Fig. 2).¹⁵ The CLAPv1 panel was also designed to allow

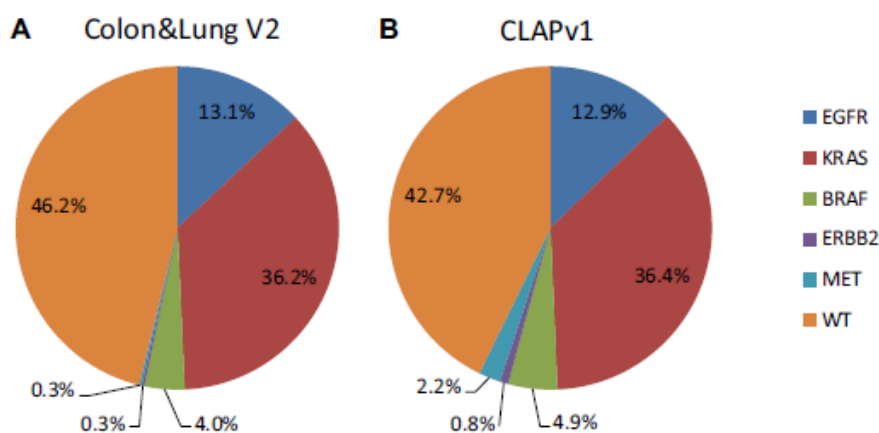


Figure 1. Percentage of genomic alterations found in NSCLC patients according to different next-generation sequencing (NGS) panel assays. The pie charts show the percentages of main genomic alterations found by the targeted NGS panels (A) Colon1&Lung V2 on 1514 tumor samples and (B) CLAPv1 on 365 tumor samples. WT (wild-type) indicates the absence of any mutation in *EGFR*, *KRAS*, *BRAF*, *ERBB2*, and *MET*.

detection of all main molecular targets previously covered by the Colon&Lung V2 panel, including key genes involved in NSCLC and colorectal cancer, melanoma, stromal gastrointestinal tumors, and glioma.

To assess the efficacy of using the CLAPv1 panel to detect *MET* exon 14 alterations while maintaining accurate detection of all the other targeted genomic regions, we selected 52 samples already known to harbor various mutations, including 20 samples harboring *MET* exon 14 splice site mutations. These 52 samples were sequenced again with CLAPv1. Coverage depth analysis of the first sequencing run showed efficient sequencing with an average of 8510 \times (Supplemental Fig. 2). Only 3 amplicons among the 182 amplicons had a median coverage depth below 500 \times , corresponding to *ERBB2* exon 19: AA 761 to 769 (NM_004448.3) and *FGFR3* exons 6 and 9: AA 229 to 247 and 369 to 375 (NM_000142.4) (Supplemental Fig. 2). Eighteen of the 20 *MET* exon 14 splice site mutations were detected with the CLAPv1 panel. The two remaining mutations were two large deletions (50 and 55 bp, patients 14 and 15) preventing primer hybridization (Supplemental Table 1A). Importantly, these two deletions were detected by fragment-length analysis, suggesting that the two techniques are complementary. Furthermore, all known mutations in other genes were confirmed with the CLAPv1 panel (data not shown). For example, 10 *EGFR* mutations with allelic fractions between 3.5% and 88% were picked up.

Routine Detection of *MET* Exon 14 Mutations in NSCLC Cancer Patients

On the basis of these results, both the CLAPv1 panel and fragment-length analysis were further implemented in routine practice for molecular testing of NSCLC

patients. Among 402 samples analyzed over 5 months, 365 samples (91%) had interpretable sequencing results, among which 8 tumors (2.2%) displayed *MET* exon 14 splice site mutations. All were found with the CLAPv1 panel and 4 of them were also detected by fragment-length analysis (Fig. 3B and Supplemental Tables 1A and B). Other oncogenic drivers detected in this series of patients included 47 *EGFR* mutations (12.9%), 133 *KRAS* mutations (36.4%), 18 *BRAF* mutations (4.9%), and 3 *ERBB2* mutations (0.8%) (Fig. 1B).

Altogether, *MET* exon 14 splice site mutations were found in 30 patients (Fig. 4). The CLAPv1 panel assay detected 26 mutations among the 28 samples tested (93%), and combining fragment-length analysis with the CLAPv1 panel assay allowed detection of 100% of the mutations (Fig. 4). The main clinical characteristics of the 30 *MET*-mutated NSCLC patients are presented in Table 1 (see also Supplemental Table 2 for individual patient data).

Validation of *MET* Exon 14 Skipping

To assess *MET* exon 14 skipping in the patients displaying splice site mutations, mRNA was extracted from seven tumor samples of six patients and analyzed by SYBR green fluorescence real-time PCR. We designed two sets of specific primers both able to discriminate splicing isoforms on the basis of the melting curves of the PCR products. PCR with the primers set A from a control WT *MET* FFPE sample or from EBC1 cell line having a WT *MET* isoform, amplified a 216 bp product and the melting curve analysis revealed a single peak at 77.4 $^{\circ}$ C. The amplicon size of PCR from Hs746T and H596 cells, showing *MET* exon 14 skipping was 58 bp and the melting curves displayed a separate peak at

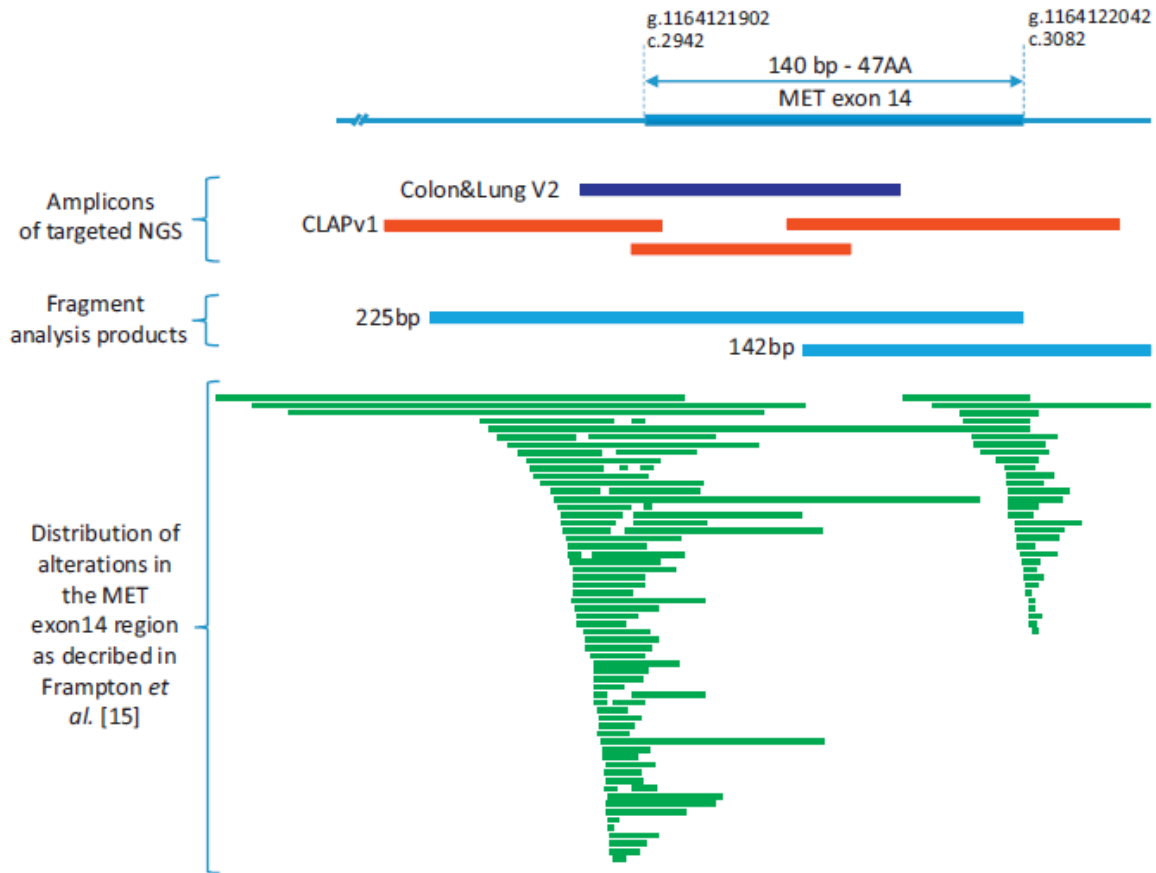


Figure 2. Positions of the amplicons of targeted next-generation sequencing (NGS) panels and fragment analysis products below *MET* exon 14. Exon 14 of *MET* (140 bp located between genomic positions g.1164121902 and g.1164122042 on *Homo sapiens* chromosome 7, GRCh37, GenBank: CM000669.1 or between cDNA positions c.2942 and c.3082 NM_00127500.1) and its flanking intronic regions are represented, with its coverage by the single amplicon of the Colon&Lung V2 panel and by the three amplicons of the CLAPv1 panel. Fragment analysis products covering 225 bp of the 5' end and and 144 bp of the 3' end of exon 14 are also shown.

approximately 72°C (Supplemental Figs. 3A and C). PCR with the primers set B generated a 286 bp amplicon, from the control WT *MET* FFPE sample or cell line, with a dissociation temperature of 77.3°C and a 128 bp amplicon from the *MET* exon 14 skipping cell lines with a dissociation temperature of 74.8°C (Supplemental Figs. 3B and D). For six patients, paraffin-embedded tumor material was available (for patient 7, two samples were available and thus analyzed) and messenger RNAs were extracted, retrotranscribed and analyzed by PCR. For five patients of six, analysis showed exon 14 skipping with both primers sets. For patient 14, the exon 14 skipping was revealed with the primers set A, whereas primer set B did not allow PCR product detection. These results show that the identified genomic mutations of these six patients lead to *MET* exon 14 skipping. Furthermore, the mutations of eight patients have been

previously reported to induce exon 14 skipping on RNA (Supplemental Table 1) and the remaining 17 mutations were predicted to induce exon 14 skipping based on in silico tools.^{14,19,21,23,39} Thus, all identified mutations are anticipated to induce *MET* exon 14 skipping.

MET Expression Level and *MET* GCN in Tumors Harboring Exon 14 Splice Site Mutations

To evaluate *MET* expression in patients harboring *MET* exon 14 splice site mutations, IHC staining of *MET* was performed on the available paraffin-embedded tumor slides. Of 30 samples, 25 were available for IHC analysis. The samples were divided into 4 grades, from no to high expression. Two patients did not express *MET* (IHC 0) and 7 patients showed low-level expression (IHC 1+). *MET* overexpression (IHC 2+ and 3+) was found in

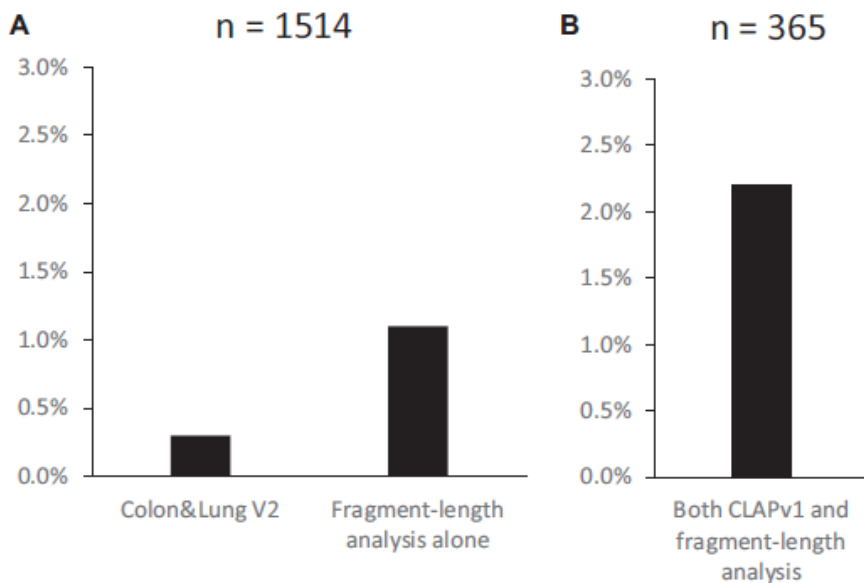


Figure 3. Percentage of tumors with *MET* exon 14 splice site mutations found in NSCLC patients by means of next-generation sequencing (NGS) panel assays and fragment analysis. (A) Percentage of tumor samples displaying *MET* exon 14 mutations as determined on 1514 NSCLC tumor samples by Colon&Lung V2 or fragment-length analysis. (B) Percentage of tumor samples displaying *MET* exon 14 mutations by CLAPv1 and fragment-length analysis combined, as determined on 365 NSCLC tumor samples.

16 of 25 patients (64%) (Fig. 4 and Supplemental Tables 1A and B). Next, we performed FISH analysis on the 25 available paraffin-embedded tumor slides. Three patients displayed *MET* gene amplification (*MET/CEN7* ratio >1.8 or the presence of clusters) and one displayed an increased *MET* gene copy number (>5 copies) but no significant *MET/CEN7* ratio increase. All four patients displayed *MET* overexpression (IHC 2+ or 3+) (Fig. 4 and Supplemental Tables 1A and B).

In parallel, CLAPv1 sequencing data were analyzed to measure potential *MET* GCN increases on the basis of

read counts. Read count analysis was performed on 23 of the 25 samples for which FISH results were available. It revealed two samples (patients 20 and 22) with a significant *MET* copy number increase (Fig. 4 and Supplemental Tables 1A and B). According to the FISH analysis, one of these patients displayed *MET* gene amplification (patient 20), and the other, a high copy number without any *MET/CEN7* ratio increase (patient 22). Patient 29 displayed *MET* gene amplification according to the FISH analysis, whereas the read count did not reveal any significant *MET* gene copy number

Patient ID#	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
Colon&Lung V2	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Yellow	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Yellow	Yellow	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Fragment analysis	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow
CLAPv1	Yellow	Yellow	Yellow	ND	ND	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow
<i>MET</i> exon 14 mutation	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow
IHC MET	0	3+	1+	1+	2+	2+	2+	0	2+	3+	2+	ND	1+	1+	2+	3+	2+	2+	1+	3+	ND	3+	1+	ND	2+	ND	1+	3+	3+	ND
FISH MET (Ampl. or Copy number)	Grey	Grey	ND	Grey	Red	Grey	Grey	Grey	Grey	ND	ND	Grey	Grey	Grey	Grey	ND	Grey	Grey	Grey	Red	Red	ND	Red	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Red	Grey
NGS Count Read (copy number)	Grey	Grey	Grey	ND	ND	Grey	Grey	Grey	Red	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Red	Red	Red	Red	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey

Figure 4. Molecular features of the 30 patients harboring somatic *MET* exon 14 alterations. Synthetic view of the *MET* exon 14 mutations detected (yellow squares) or not (grey squares) by the Colon&Lung V2 panel assay or by fragment-length analysis and CLAPv1 panel. Tumors examined by immunohistochemistry were each attributed one of four scores (0 to 3+) according to their level of *MET* expression. Score 0: no expression; score 3+ maximal expression. Samples displaying *MET* gene amplification (as determined by fluorescence in situ hybridization [FISH]) or an increased copy number (as determined by FISH or by counting reads from the NGS CLAPv1 panel) are indicated by red squares. ND, not determined.

Table 1. Clinical and Histologic Data Pertaining to NSCLC Patients Harboring *MET* Exon 14 Mutations (N = 30)

Age, mean, y (range)	73 (45-91)	
Sex, n (%)		
Male	13	(43)
Female	17	(57)
Smoking status		
Current	4	(13)
Former	12	(40)
Never	14	(47)
Histology		
Adenocarcinoma	24	(80)
PSC	3	(10)
NSCLC NOS	3	(10)
Stage		
I to III	12	(40)
IV	16	(53)
Unknown	2	(7)
Type of <i>MET</i> exon 14 splice site mutations		
Point mutations	9	(30)
Insertions, deletions or indels	21	(70)

Values are presented as n (%) unless otherwise specified.

ADC, adenocarcinoma; NSCLC NOS, not otherwise specified; PSC, pulmonary sarcomatoid carcinoma.

increase. In this sample, however, the read count displayed a high background, preventing accurate data interpretation (data not shown). Tumor samples from five patients with no tissue available for FISH analysis were subjected to read count analysis, and two were found to harbor an increased *MET* copy number (patients 10 and 16). Accordingly, these two tumor samples displayed high *MET* expression (IHC 3+). Raw data are shown for samples 10, 16, 20, and 22, which displayed an increased copy number, and for sample 1, which did not (Supplemental Fig. 4). Taken together, the FISH and NGS data analyses revealed six *MET* gene amplifications or copy number increases among 30 patients (20%).

Discussion

MET exon 14 splice site mutations are different from most receptor tyrosine kinase mutations amenable to targeted therapies. Firstly, they occur either within the introns flanking exon 14 or at the junction between intron and exon 14. Secondly, *MET* exon 14 splice site mutations are molecularly diverse, including small and large deletions, point mutations, and indels. Consequently, detection of *MET* exon 14 splice site mutations requires a specific approach. Here we show that combining fragment-length analysis with adapted targeted NGS allows detection of *MET* exon 14 splice site mutations in 2.2% of patients in routine practice, as compared to the 0.3% detection rate obtained with nonoptimized targeted NGS alone.

MET exon 14 mutations were first reported on large retrospective cohorts. Various methods were used to

detect them, including mRNA and whole-exome sequencing, large-scale targeted NGS based on hybrid capture (including 4557 exons of 287 genes), and Sanger sequencing of *MET* regions known to harbor such alterations.^{14,15,28-30} These approaches are not suitable for molecular testing in routine practice, as they are expensive, time consuming, or require both large quantities of genomic DNA and in-depth bioinformatic analysis. Targeted NGS panels used in routine practice usually cover hotspots known to harbor genomic alterations. These panels, however, have not been specifically designed to cover intronic mutations such as *MET* exon 14 splice site mutations. It has recently been reported that none of the eight amplicon-based NGS panels commercially available is able to detect more than 63% of *MET* exon 14 mutations.³¹ For instance, the ability of the Colon&LungV2 panel to detect *MET* exon 14 splice site mutations has been estimated in silico at 24%. Accordingly, we found this panel to detect only 4 *MET* exon 14 splice site mutations among 1514 NSCLC patients. This is only 0.3%, far below the expected rate. In contrast, the optimized CLAPv1 panel detected *MET* exon 14 mutations (half point mutations and half deletions) in 2.2% of NSCLC patients. In addition, the CLAPv1 panel accurately covered most of the other targeted genes, yielding rates of *EGFR*, *KRAS*, *BRAF*, or *ERBB2* mutations similar to those reported so far.⁴⁰ As the CLAPv1 panel allows accurate identification of *MET* exon 14 mutated patients liable to benefit from *MET* TKI treatment, we provide the details of this panel in Supplementary Table 3.

Although amplicon-based NGS assays such as the CLAPv1 panel are suitable for routine molecular screening, some well-known intrinsic limitations remain.⁴¹ For instance, the usual bioinformatic workflows might fail to detect some deletions or insertions, or primers might fail to hybridize to the regions affected by such modifications. As approximately half of all *MET* exon 14 mutations are deletions or insertions, we have avoided this drawback by developing another molecular assay based on fragment length analysis. We show that two large deletions undetected by the CLAPv1 panel for lack of primer hybridization to the deleted sequence were successfully detected by fragment length analysis. Yet fragment length analysis also has potential drawbacks. First, its sensitivity is lower than that of amplicon-based NGS, as shown by the case of patient 21, whose deletion was detected with the CLAPv1 panel but not by fragment-length analysis. Second, fragment-length analysis does not provide the sequence of the mutant allele and has to be combined with sequencing of the amplified fragment. Another approach to detecting *MET* exon 14 alterations is mRNA analysis. We show here that melting curve analysis of fluorescent reverse transcriptase

(RT)-PCR products allows effective discrimination of mRNAs with and without *MET* exon 14 skipping. This method is sensitive, specific, and can be applied to FFPE samples where the RNA quality is not optimal, thanks to the small size of the amplicons. This method could thus be useful, for instance, in further characterizing *MET* genomic mutations not initially identified as splice site mutations. Indeed, it is accepted that mutations affecting splice sites lead to exon 14 skipping, but it could be difficult to predict effect of mutations located deeper in intron 13 or within exon 14. Exon 14 mutations are highly diverse and their effect on RNA is published only for a few of them.^{19,21,23} Overall, we identified 30 NSCLC patients harboring *MET* exon 14 splice site mutations. In line with previous reports, this group of patients was characterized by an advanced age (median age, 73 years), a high proportion of women (57%), and a high proportion of never-smokers (47%).

MET exon 14 skipping leads to in-frame deletion of the juxtamembrane domain. This regulatory domain contains the phosphorylated tyrosine residue 1003 involved in recruiting the E3 ubiquitin ligase CBL.⁴² Mutation of this residue prevents degradation of the receptor and causes its aberrant activation.⁴³ Juxtamembrane deletion has been proposed to cause similar effects.¹⁹ Patients with *MET* exon 14 mutations might thus display increased *MET* expression. Here we found 64% of the patients displaying *MET* exon 14 splice site mutations to show high expression of *MET* (IHC 2+ and 3+), as compared to approximately 50% of unselected NSCLC patients.³³ Two patients, however, had tumors with *MET* exon 14 splice site mutations but no *MET* expression. Whether such patients can still benefit from *MET* TKI treatment must be investigated.

MET gene amplification is a rare event in NSCLC. It can be viewed as an oncogenic driver and has been associated with *MET* TKI efficacy.⁴⁴ In NSCLC patients harboring *MET* exon 14 splice site mutations, *MET* gene amplification appears more frequent (15% to 20% of tumor samples) than in other patients, but its impact on patient clinicopathologic characteristics and disease outcomes remains unclear.²⁹ FISH analysis of 25 tumor samples of our cohort showed the presence of increased GCN (due to gene amplification, chromosome 7 polysomy, or both) in several patients. In parallel, we set up a bioinformatic analysis to evaluate GCN on the basis of the CLAPv1 NGS data. This analysis confirmed the *MET* GCN increases observed by FISH and allowed, when FISH was not possible, identifying additional patients potentially harboring such alterations. Because NGS data analysis does not unambiguously identify gene amplification (which relies on observation of gene clustering or on calculating the ratio of the number of gene copies to the number of chromosome

centromeres) this method remains indicative and cannot substitute for FISH analysis. Constitution of a larger cohort of *MET* exon 14 splice site mutations might be needed to assess whether FISH and bioinformatic analysis of NGS data are in total agreement. Taken together, both our FISH analysis and our NGS data analysis revealed probable *MET* gene amplification and *MET* GCN increases in approximately 20% of tested patients, all of whom displayed *MET* overexpression as determined by IHC. Analysis of *MET* mutations and *MET* amplification raises the question of the mutant allele specific imbalance phenomenon which could have an impact on prognosis or response to treatment.^{45,46} Based on analysis of mutant allele frequency, we observed mutant allele specific imbalance in four samples from our series. Further characterization of this phenomenon in *MET*-mutated samples is warranted.

In conclusion, optimized targeted NGS and fragment analysis allow better routine identification of NSCLC patients harboring *MET* exon 14 splice site mutations. This shows that these technologies can be rapidly adapted to the routine diagnosis of recently discovered molecular alterations.

Acknowledgments

This work was supported by the CNRS, the Institut Pasteur de Lille, and INSERM, and by grants from the Cancéropôle Nord-Ouest, the Agence Nationale de la Recherche; Metropolis project, the Ligue Contre le Cancer, Comité Nord, the Institut National du Cancer, Ecole Doctorale Biologie Santé, and the Site de Recherche Intégrée sur le Cancer, SIRIC ONCOLille.

Supplementary Data

Note: To access the supplementary material accompanying this article, visit the online version of the *Journal of Thoracic Oncology* at www.jto.org and at <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2018.08.2023>.

References

1. Birchmeier C, Birchmeier W, Gherardi E, et al. *Met*, metastasis, motility and more. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2003;4:915-925.
2. Bladt F, Riethmacher D, Isermann S, et al. Essential role for the c-met receptor in the migration of myogenic precursor cells into the limb bud. *Nature*. 1995;376:768-771.
3. Schmidt C, Bladt F, Goedecke S, et al. Scatter factor/hepatocyte growth factor is essential for liver development. *Nature*. 1995;373:699-702.
4. Uehara Y, Minowa O, Mori C, et al. Placental defect and embryonic lethality in mice lacking hepatocyte growth factor/scatter factor. *Nature*. 1995;373:702-705.

5. Maina F, Hilton MC, Ponzetto C, et al. Met receptor signaling is required for sensory nerve development and HGF promotes axonal growth and survival of sensory neurons. *Genes Dev.* 1997;11:3341-3350.
6. Calvi C, Podowski M, Lopez-Mercado A, et al. Hepatocyte growth factor, a determinant of airspace homeostasis in the murine lung. *PLoS Genet.* 2013;9:e1003228.
7. Chmielowiec J, Borowiak M, Morkel M, et al. c-Met is essential for wound healing in the skin. *J Cell Biol.* 2007;177:151-162.
8. Borowiak M, Garratt AN, Wustefeld T, et al. Met provides essential signals for liver regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101:10608-10613.
9. Huh CG, Factor VM, Sanchez A, et al. Hepatocyte growth factor/c-met signaling pathway is required for efficient liver regeneration and repair. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101:4477-4482.
10. Ponzetto C, Giordano S, Peverali F, et al. c-met is amplified but not mutated in a cell line with an activated met tyrosine kinase. *Oncogene.* 1991;6:553-559.
11. Watermann I, Schmitt B, Stellmacher F, et al. Improved diagnostics targeting c-MET in non-small cell lung cancer: expression, amplification and activation? *Diagn Pathol.* 2015;10:130.
12. Yang Y, Wu N, Shen J, et al. MET overexpression and amplification define a distinct molecular subgroup for targeted therapies in gastric cancer. *Gastric Cancer.* 2016;19:777-788.
13. Sattler M, Reddy MM, Hasina R, et al. The role of the c-Met pathway in lung cancer and the potential for targeted therapy. *Ther Adv Med Oncol.* 2011;3:171-184.
14. Cancer Genome Atlas Cancer Network. Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma. *Nature.* 2014;511:543-550.
15. Frampton GM, Ali SM, Rosenzweig M, et al. Activation of MET via diverse exon 14 splicing alterations occurs in multiple tumor types and confers clinical sensitivity to MET inhibitors. *Cancer Disc.* 2015;5:850-859.
16. Cortot AB, Kherrouche Z, Descarpentries C, et al. Exon 14 deleted MET receptor as a new biomarker and target in cancers. *J Natl Cancer Inst.* 2017;109.
17. Jenkins RW, Oxnard GR, Elkin S, et al. Response to crizotinib in a patient with lung adenocarcinoma harboring a MET splice site mutation. *Clin Lung Cancer.* 2015;16:e101-e104.
18. Jorge SE, Sol Schulman S, Freed JA, et al. Responses to the multitargeted MET/ALK/ROS1 inhibitor crizotinib and co-occurring mutations in lung adenocarcinomas with MET amplification or MET exon 14 skipping mutation. *Lung Cancer.* 2015;90:369-374.
19. Liu X, Jia Y, Stoopler MB, et al. Next-generation sequencing of pulmonary sarcomatoid carcinoma reveals high frequency of actionable MET gene mutations. *J Clin Oncol.* 2015;34:794-802.
20. Mendenhall MA, Goldman JW. MET-mutated NSCLC with major response to crizotinib. *J Thorac Oncol.* 2015;10:e33-e34.
21. Paik PK, Drilon A, Fan PD, et al. Response to MET inhibitors in patients with stage IV lung adenocarcinomas harboring MET mutations causing exon 14 skipping. *Cancer Disc.* 2015;5:842-849.
22. Waqar SN, Morgensztern D, Sehn J. MET mutation associated with responsiveness to crizotinib. *J Thorac Oncol.* 2015;10:e29-e31.
23. Awad MM, Oxnard GR, Jackman DM, 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.* 2015;34:721-730.
24. Heist RS, Shim HS, Gingipally S, et al. MET exon 14 skipping in non-small cell lung cancer. *Oncologist.* 2016;21:481-486.
25. Mahjoubi L, Gazzah A, Besse B, et al. A never-smoker lung adenocarcinoma patient with a MET exon 14 mutation (D1028N) and a rapid partial response after crizotinib. *Invest New Drugs.* 2016;34:397-398.
26. Shea M, Huberman MS, Costa DB. Lazarus-type response to crizotinib in a patient with poor performance status and advanced MET exon 14 skipping mutation-positive lung adenocarcinoma. *J Thorac Oncol.* 2016;11:e81-e82.
27. Drilon AE, Camidge RD, Ou SHI, et al. Efficacy and safety of crizotinib in patients (pts) with advanced MET exon 14-altered non-small cell lung cancer (NSCLC). *J Clin Oncol.* 2016;34(suppl; abstr 108). ASCO Annual Meeting.
28. Ma PC, Kijima T, Maulik G, et al. c-MET mutational analysis in small cell lung cancer: novel juxtamembrane domain mutations regulating cytoskeletal functions. *Cancer Res.* 2003;63:6272-6281.
29. Dong HJ, Li P, Wu CL, et al. Response and acquired resistance to crizotinib in Chinese patients with lung adenocarcinomas harboring MET exon 14 splicing alterations. *Lung Cancer.* 2016;102:118-121.
30. Liu SY, Gou LY, Li AN, et al. The unique characteristics of MET exon 14 mutation in Chinese patients with NSCLC. *J Thorac Oncol.* 2016;11:1503-1510.
31. Poirot B, Doucet L, Benhenda S, et al. MET exon 14 alterations and new resistance mutations to tyrosine kinase inhibitors: risk of inadequate detection with current amplicon-based NGS panels. *J Thorac Oncol.* 2017;12:1582-1587.
32. McLaren W, Gil L, Hunt SE, et al. The Ensembl Variant Effect Predictor. *Genome Biol.* 2016;17:122.
33. Lapere C, Cortot AB, Gregoire V, et al. Preferential localization of MET expression at the invasion front and in spreading cells through air spaces in non-small cell lung carcinomas. *Am J Surg Pathol.* 2017;41:414-422.
34. Schildhaus HU, Schultheis AM, Ruschoff J, et al. MET amplification status in therapy-naïve adeno- and squamous cell carcinomas of the lung. *Clin Cancer Res.* 2015;21:907-915.
35. Noonan SA, Berry L, Lu X, et al. Identifying the appropriate FISH criteria for defining MET copy number-driven lung adenocarcinoma through oncogene overlap analysis. *J Thorac Oncol.* 2016;11:1293-1304.
36. Quinlan AR, Hall IM. BEDTools: a flexible suite of utilities for comparing genomic features. *Bioinformatics (Oxford, England).* 2010;26:841-842.
37. Lepretre F, Villenet C, Quief S, et al. Waved aCGH: to smooth or not to smooth. *Nucleic Acids Res.* 2010;38:e94.
38. Olshen AB, Venkatraman ES, Lucito R, et al. Circular binary segmentation for the analysis of array-based DNA

- copy number data. *Biostatistics (Oxford, England)*. 2004;5:557-572.
39. Onozato R, Kosaka T, Kuwano H, et al. Activation of MET by gene amplification or by splice mutations deleting the juxtamembrane domain in primary resected lung cancers. *J Thorac Oncol*. 2009;4:5-11.
 40. Barlesi F, Mazieres J, Merlio JP, et al. Routine molecular profiling of patients with advanced non-small-cell lung cancer: results of a 1-year nationwide programme of the French Cooperative Thoracic Intergroup (IFCT). *Lancet*. 2016;387:1415-1426.
 41. Jennings LJ, Arcila ME, Corless C, et al. Guidelines for validation of next-generation sequencing-based oncology panels: a joint consensus recommendation of the Association for Molecular Pathology and College of American Pathologists. *J Mol Diagn*. 2017;19:341-365.
 42. Peschard P, Ishiyama N, Lin T, et al. A conserved DpYR motif in the juxtamembrane domain of the Met receptor family forms an atypical c-Cbl/Cbl-b tyrosine kinase binding domain binding site required for suppression of oncogenic activation. *J Biol Chem*. 2004;279:29565-29571.
 43. Peschard P, Fournier TM, Lamorte L, et al. Mutation of the c-Cbl TKB domain binding site on the Met receptor tyrosine kinase converts it into a transforming protein. *Mol Cell*. 2001;8:995-1004.
 44. Camidge DR, Ou SI, Shapiro G, et al. Efficacy and safety of crizotinib in patients with advanced C-MET amplified non-small cell lung cancer (NSCLC). 2014 ASCO Annual Meeting. *J Clin Oncol*. 2014;32:5s. Abstr 8001.
 45. Soh J, Okumura N, Lockwood WW, et al. Oncogene mutations, copy number gains and mutant allele specific imbalance (MASI) frequently occur together in tumor cells. *PLoS One*. 2009;4:e7464.
 46. Yu CC, Qiu W, Juang CS, et al. Mutant allele specific imbalance in oncogenes with copy number alterations: occurrence, mechanisms, and potential clinical implications. *Cancer Lett*. 2017;384:86-93.